

III. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Zentrums für Innere Medizin

Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

**„Die Expression des CXCR4 Chemokinrezeptors und seines
Liganden CXCL12 / SDF-1 im Modell einer experimentellen
Glomerulonephritis“**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Maximilian Ernst Dämmrich
aus Würzburg

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 21.01.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Herr Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Herr PD Dr. med. Ulf Panzer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. med. Friedrich Thaiss

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Anti- Thy- 1 Modell.....	1
1.2 Chemotaktische Zytokine.....	6
1.2.1 Chemokine und Niere.....	9
1.2.2 Charakteristika ausgewählter Chemokine und Chemokinrezeptoren	10
1.2.2.1 CC- Chemokine	10
1.2.2.2 CXC- Chemokine(rezeptoren).....	11
1.2.3 Therapeutische Aspekte der Chemokinsignalkette.....	14
1.2.3.1 Der CXCR4 Rezeptorenantagonist AMD3100	14
2. Methoden und Material.....	16
2.1 Versuchsaufbau	16
2.1.1 Quantitativ chronologische Expressionsanalyse im ATS- Modell	16
2.1.2 Die Resolutionsphase unter Verwendung eines CXCR4 Rezeptorenblockers .	16
2.2 Versuchstiere	18
2.2.1 Gewinnung von Anti- Thymozyten- 1 Serum	18
2.2.2 Induktion einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis	18
2.2.3 Applikation des Chemokinrezeptorenblockers AMD3100.....	19
2.2.4 Nephrektomie	19
2.2.4.1 Gewebezuschnitt	19
2.3 RNA- Analyse	20
2.3.1 RNA- Gewinnung durch Siebverfahren	20
2.3.1.1 Glomeruliisolation	20
2.3.1.2 Isolation der Proteine	21
2.3.1.3 Isolation der RNA.....	21
2.3.1.4 Anfertigung einer 100ng/ µl konzentrierten Lösung.....	21
2.3.2 C- DNA Synthese	22
2.3.3 Quantitative RT- PCR- Messung	22
2.3.3.1 Primersequenzen.....	22
2.3.3.2 Primerstock.....	23
2.3.3.3 Mastermixansatz.....	24
2.3.3.4 96- Well- PCR- Plate.....	24
2.3.3.5 Amplifikation und Messung.....	25
2.3.3.6 Auswertung der Messergebnisse.....	25
2.4 Histologische Analyse	25
2.4.1 Konventionelle Histologie	25
2.4.2 Immunhistologie	26
2.4.2.1 CD 3.....	26
2.4.2.2 CD 68.....	26
2.4.2.3 CD 79.....	26
2.5. Material	28
2.5.1 Chemikalien.....	28
2.5.2 Chemikalienansätze	28
2.5.3 Geräte	29
2.5.4 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.5.5 Software	30
2.5.6 Hardware.....	30

3. Ergebnisse.....	31
3.1 Quantitativ chronologische Expressionsanalyse im ATS- Modell.....	31
3.1.1 Monocyte chemoattractant protein-1 / CCL2	31
3.1.2 Interferon inducible protein-10 / CXCL10	32
3.1.3 Regulated on activated normal T cell expressed and secreted / CCL5	33
3.1.4 Angiopoietin-2.....	34
3.1.5 Transforming growth factor- beta.....	35
3.1.6 Matrixmetalloproteinase-9	36
3.1.7 Kollagen IV	37
3.1.8 Stromal cell derived factor-1a/ CXCL12	38
3.1.9 CXCR4	39
3.2 Die Resolutionsphase unter CXCR4 antagonisierender Behandlung	40
3.2.1 Ergebnisse einer präventiven Behandlung mit AMD3100	40
3.2.1.1 Chemokin-/ Zytokinanalyse.....	40
3.2.1.1.1 Expressionsanalyse des Chemokins SDF-1	42
3.2.1.1.2 Expressionsanalyse des Chemokinrezeptors CXCR4	42
3.2.1.1.3 Expressionsanalyse des Chemokins MCP-1	42
3.2.1.1.4 Expressionsanalyse des Zytokins TGF- β	42
3.2.1.2 Histologische Ergebnisanalyse	43
3.2.1.2.1 Immunhistologischer Nachweis von Monozyten/ Makrophagen.....	44
3.2.1.2.2 Immunhistologischer Nachweis von T- Lymphozyten	45
3.2.1.2.3 Immunhistologischer Nachweis von B- Lymphozyten	46
3.2.2 Ergebnisse einer interventionellen Behandlung mit AMD3100.....	47
3.2.2.1 Chemokin-/ Zytokinanalyse.....	47
3.2.2.1.1 Expressionsanalyse des Chemokins SDF-1	49
3.2.2.1.2 Expressionsanalyse des Chemokinrezeptors CXCR4	49
3.2.2.1.3 Expressionsanalyse des Chemokins MCP-1	50
3.2.2.1.4 Expressionsanalyse des Zytokins TGF- β	50
3.2.2.2 Histologische Ergebnisanalyse	51
3.2.2.2.1 Immunhistologischer Nachweis von Monozyten/ Makrophagen.....	52
3.2.2.2.2 Immunhistologischer Nachweis von T- Lymphozyten	53
3.2.2.2.3 Immunhistologischer Nachweis von B- Lymphozyten	54
4. Diskussion	55
4.1 Verlaufsdiskussion ausgewählter Chemokine, Wachstumsfaktoren und Enzyme ..	55
4.2 Der CXCR4 Antagonist AMD3100 - ein Inhibitor glomerulärer Resolution?.....	57
5. Zusammenfassung	64
6. Abbildungsverzeichnis	65
7. Tabellenverzeichnis	65
8. Literaturverzeichnis	66
9. Danksagung	75
10. Lebenslauf	76
11. Eidesstattliche Versicherung	77

Arbeitshypothese

Das Krankheitsbild der Glomerulonephritis stellt in Industrieländern die dritthäufigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz dar. Aufgrund des erheblichen medizinischen Aufwands sowie der anfallenden wirtschaftlichen Kosten einer Nierenersatzbehandlung besteht ein primäres Ziel der nephrologischen Forschung in Therapieansätzen, das Auftreten terminaler Nierenversagen zu verhindern.

Einen wichtigen Schritt aller entzündlichen Erkrankungen stellt die chemokinvermittelte Migration von Leukozyten aus der Blutbahn in das geschädigte Gewebe dar. Entsprechend dem derzeitigen Stand der Forschung sind Chemokine und deren Rezeptoren darüber hinaus an vielen weiteren (patho)physiologischen Prozessen beteiligt. Weitreichend sind somit die Folgen, die einer Blockade dieser Ligand- Rezeptor- Interaktion obliegen.

Der erste Teil dieser Arbeit widmet sich einer zeitlich orientierten mRNA Expressionsanalyse verschiedener Chemokin(rezeptoren) (MCP-1, RANTES, IP-10, SDF-1, CXCR4), des Zytokins TGF- β , des Angiogenesefaktors Angiopoietin-2, des matrixdegradierenden Enzyms Matrixmetalloproteinase-9, sowie des extrazellulären Matrixproteins Kollagen IV. Ziel der Verlaufsanalyse im Rahmen der induzierten Glomerulonephritis liegt neben der Bedeutung als Grundstein für weitere Versuche, in dem Nachweis, inwieweit im Verlauf der hervorgerufenen Entzündung eine Beteiligung des Chemokins Stromal cell derived factor- 1 (SDF-1) auf mRNA- Ebene zu detektieren ist.

Der zweite Teil dieser Arbeit dient der näheren Betrachtung der Resolutionsphase der Entzündung unter Blockade des Chemokinrezeptors CXCR4 durch den synthetischen Antagonisten AMD3100. Für das Chemokin SDF-1 stellt der Rezeptor CXCR4 einen seiner beiden signalvermittelnden Rezeptoren dar. Von Interesse erscheint hierbei neben histologischen Auswirkungen auf den Migrationsprozess leukozytärer Zellen, interventionsbedingte Expressionsänderungen des Chemokins Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), sowie des Zytokins Transforming growth factor- beta (TGF- β) nachzuweisen.

1. Einleitung

Glomerulonephritiden verlaufen häufig langsam progredient und führen in einer Vielzahl der Fälle zum terminalen Nierenversagen. In Industrieländern ist bei 10- 15% aller chronisch niereninsuffizienten Patienten eine Glomerulonephritis ätiologisch gesichert. Zur Charakterisierung der einzelnen Abschnitte dieser Erkrankung hat sich ein Stufenmodell bewährt. So lässt sich die Progression einer Glomerulonephritis vier Phasen zuordnen: der Initialphase, der Amplifikationsphase, der Progressionsphase und der Terminalphase [4].

Als Reaktion auf einen glomerulären Schädigungsprozess stellt mesangiale Zellproliferation ein entscheidendes pathologisches Charakteristikum der Amplifikationsphase vieler glomerulärer Nierenerkrankungen dar. So ist glomerulomesangialer Zellvermehrung eine Art pathogenetische Schlüsselfunktion zuzuweisen, die sich in nephrologischen Erkrankungen wie beispielsweise der IgA- Nephropathie und Lupusnephritis widerspiegelt. Neben dieser Zellvermehrung ist in mesangioproliferativen Glomerulonephritiden eine besondere Form eines aktivierenden Phänotypenwechsels zu verzeichnen, der sich lokal in einem Sekretionsüberschuss extrazellulärer Matrixkomponenten manifestiert. Folgenreich sind die hervorgerufenen Störungen für die glomeruläre Struktur und Filtrationsfunktion. Die molekularen Schlüssel für Zellproliferation, Matrixsynthese und -degradation, sowie die inter- und intrazellulären Signalübermittlungswege während des Entzündungsprozesses stellen nicht nur in der Nephrologie ein großes Feld an wissenschaftlichem Interesse des 21. Jahrhunderts dar.

1.1 Das Anti- Thy- 1 Modell

Zahlreiche Tiermodelle wurden im Laufe der Zeit entwickelt - mit dem Ziel experimentell mesangioproliferative Erkrankungen herbeizuführen. Durch das 1986 von Bagchus et. al. erstmals veröffentlichte Anti- Thy 1.1 Modell wurde für die Wissenschaft im Bezug auf morphologische, pathologische und klinische Fragestellungen das wohl bedeutendste nephrologische Tiermodell mesangioproliferativer Erkrankungssimulation beschrieben.

Das ATS - Modell ruft im Tierversuch bei der Ratte mittels einmaliger intravenöser Injektion eines kreuzreagierenden monoklonalen Kaninchenantikörpers eine akute mesangioproliferative Glomerulonephritis hervor [6, 7]. Neben dieser durch einmalige Antikörperapplikation induzierten akutreversiblen Form der Glomerulonephritis, besteht auch die Möglichkeit einen chronischen Verlauf mittels wiederholter Anti- Thy1- Gabe sowie durch Uninephrektomie herbeizuführen [85, 120]. Mesangiale Bindungsstelle des Antikörpers stellt das Thy-1 Antigen, ein Glycosyl- phosphatidyl- inositol-verankertes Membranprotein, dar [84].

Charakterisiert ist der Akuttyp dieser Form einer experimentell herbeigeführten Glomerulonephritis durch dessen zeitlich strukturierten Ablauf. Dieser wird durch eine initiale Mesangiolyse eingeleitet, gefolgt von einer mesangialen Zellproliferation und Matrixakkumulation, sowie einer überwiegenden Restitutio ad integrum des geschädigten Nierenparenchyms nach 6- 8 Wochen [57]. Während diesen histologisch nachvollziehbaren Entzündungsphasen, findet auf subzellulärer Ebene eine Vielfalt vermittelnder Prozesse und Interaktion statt. Die folgende Darstellung des Anti- Thy- 1- Modelles soll vor allem in Bezug auf den ersten Teil dieser Arbeit erfolgen - mit einer zeitlich orientierten Expressionsanalyse verschiedener Chemokine, Wachstumsfaktoren und Enzyme.

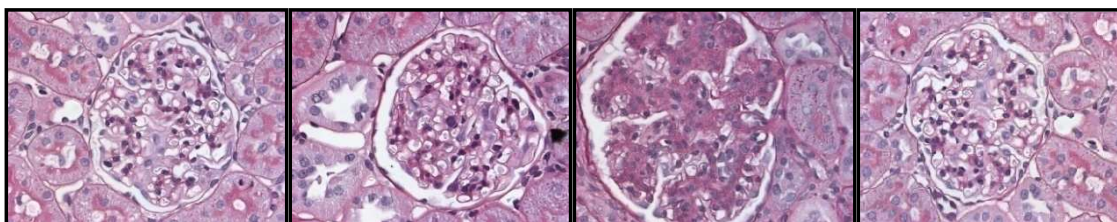


Abbildung 1

Histologische Darstellung des Verlaufs einer experimentell mesangioproliferativen GN

Bild A: Tag 0; Bild B 4Tage p.i. ATS; Bild C 14 Tage p.i. ATS; Bild D 4Monate p.i. ATS

Initialphase

Bereits kurz nach Applikation des Anti- Thy1.1- Antikörperserums erfolgt innerhalb von 24 Stunden eine komplementabhängige Mesangiolyse [18, 116, 139]. Der resultierende Zelltod äußert sich in einer apoptotisch- nekrotischen Mischform [116]. Auf subzellulärer Ebene wird diese Kaskadenreaktion der Faktoren C5b-9 des Komplementsystems durch eine mesangiale Stimulation der NO- Produktion durch die induzierbare NO- Synthetase forciert [131].

Durch die in der Initialphase verzeichnete Mesangiumzelldestruktion können Zellverluste bis zu 90% verzeichnet werden [57]. Dieser mesangiale Verlust manifestiert sich an in einem Zusammenbruch glomerulärer Stabilität. Das histologische Korrelat diesen Prozesses äußert sich in glomerulärer Mikroaneurysmatabildung [69].

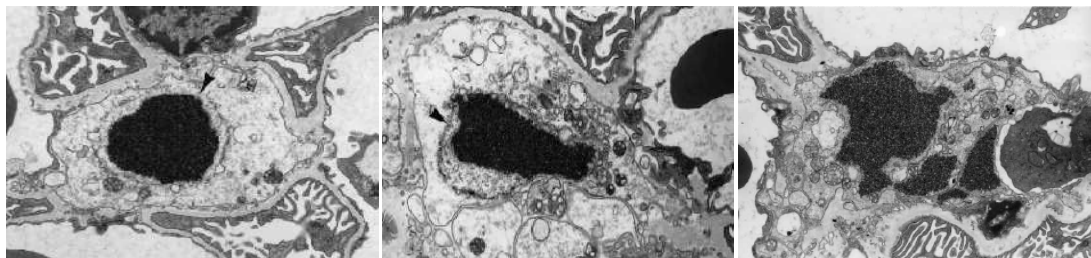


Abbildung 2
Elektronenmikroskopische Darstellung der mesangiolytischen Initialphase einer experimentell mesangioproliferativen Glomerulonephritis

Amplifikationsphase

Die frühe Infiltration von neutrophilen Granulozyten innerhalb der ersten Stunden nach Antikörperapplikation spielt in diesem Tiermodell lediglich eine untergeordnete Rolle. Bedeutende Relevanz für den weiteren Verlauf der Erkrankung ist dem gegenüber in der Beteiligung des Monozyten/Makrophagensystem zu sehen [83]. Innerhalb eines Zeitraums von 24h findet eine nachweislich vermittelte Infiltration von Makrophagen in den glomerulären Bereich statt (s. Abschnitt 1.2.2.1) [119, 134]. Diese Periode ist auf zellulärer Ebene darüber hinaus durch das Eindringen von Thrombozyten gekennzeichnet. Sowohl Monozyten als auch Thrombozyten beweisen sich im weiteren Verlauf der Erkrankung als essentiell [83, 97].

Nach einer Latenzphase von 2- 3 Tagen nach ATS- Applikation wird die verlorene Zellpopulation ersetzt [53]. Ab Tag 5 kann sogar eine mesangiale Hyperzellularität registriert werden, die die präläsionale Anzahl um das 2 bis 3fache übertrifft. Nach einem Zeitraum von 14 Tagen normalisiert sich die mesangiale Zellzahl wieder [14, 100, 114]. Während diesen Prozesses mesangialnumerischer Zellalteration werden darüber hinaus quantitative und qualitative Unterschiede in der Sekretionskapazität mesangialer Zellen verzeichnet. Erlangt wird diese Produktionstüchtigkeit durch den Erwerb „myofibroblastärer“ Eigenschaften zwischen dem 5. und 8. Tag nach ATS- Applikation in Form eines mesangialen Phänotypenwechsels [54, 59, 95].

Dieser Phänotypenwechsel basiert auf der de novo Expression von α -smooth-muscle-Aktin (α -SMA) [60] - einem Charakteristikum kontraktile Befähigung - sowie fibroblastärer Eigenschaften, die sich in einer außergewöhnlichen interstitiellen Sekretionskapazität dieser Zellen in vitro et vivo widerspiegelt [48]. Durch ein Wechselspiel abnormer Regulation der Synthese und des Abbaus extrazellulärer Matrix erlangt die mesangiale Matrixexpansion an Bedeutung [70]. Diese äußert sich neben einer erhöhten Synthese physiologisch anzutreffender Matrixkomponenten (Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin) in einer erhöhten Produktion – normalerweise glomerulär nicht anzutreffenden - interstitiellen Kollagens Typ I und III [37, 52]. Während diesen Prozesses extrazellulärer Matrixformation gewinnt auf subzellulärer Ebene eine Superfamilie profibrotischer Zytokine an Bedeutung [15, 17]. So steuert die Familie des Transforming growth factor- beta (TGF- β) einerseits durch Stimulation synthesebefähigter Zellen, andererseits durch zeitgleiche Inhibition matrixabbauender Enzyme, die extrazelluläre Matrixformation. Dies wird ermöglicht durch verminderte Proteasen-(Plasminogen Aktivatoren (PAs) und Matrixmetalloproteasenbildung (MMPs)) sowie durch die induzierte Synthese von Proteaseninhibitoren (Plasminogen activator inhibitor (PAIs), Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs), etc.) [33, 61, 115] .

Resolutionsphase

Das akute Modell einer ATS induzierten mesangioproliferativen Glomerulonephritis [6, 7] unterscheidet sich von den chronischen Modellen durch dessen restitutionelle Resolutionsphase [85, 120]. Dieser Prozess mesangial- morphologischer Schadensbehebung vollzieht sich innerhalb eines Zeitraums von 6-8 Wochen.

Endotheliale Reaktionen auf den in der Initialphase durch glomerulären Stabilitätsverlust zugezogenen Gefäßschaden lassen sich relativ schnell verzeichnen [55, 69]. Mesangiale Beteiligung ist nicht nur in der lytischen Initialphase, sondern auch in der Resolutionsphase während endothelialer Revaskularisation nachzuweisen [62]. Insgesamt betrachtet kann eine endotheliale Proliferation auf der einen Seite bereits vor dem 5. Tag, andererseits bis hin zu Tag 14 beobachtet werden [55, 117]. Dieser Prozess kapillärer Wiederherstellung weist - ähnlich postnatal glomerulokapillärer

Entwicklung - Beteiligung intussuszeptiver Angiogenese auf [90]. Eine regulatorische Schlüsselfunktion wird in diesen Prozess dem Angiopoietin (Ang)- Tie- Liganden- Rezeptorsystem zuteil [22, 23, 36]. Während Angiopoietin-1 vermittelte Tie-2 Aktivierung unter homeostatischen Bedingungen zur Aufrechterhaltung vaskulärer Integrität anzutreffen ist, wird diese agonistische Rezeptor- Ligandenbeziehung unter exogener Stimulation (Hypoxie, VEGF, TNF, IL-1, etc.) durch Angiopoietin-2 antagonisiert. So gilt Angiopoietin-1 als ein von unterschiedlichsten Zellen konstitutiv exprimierter, Angiopoietin-2 hingegen als ein inflammatorisch induzierbarer Angiogenesefaktor.

Ab Tag 10- 14 nach Nephritisinduktion beginnt sich die erhöhte mesangiale Zellproliferation zu reduzieren [10]. Die mit dem mesangialen Zellturnover einhergehende Akkumulation extrazellulärer Matrixkomponenten unterliegt in der Folgezeit während der - für dieses nephritische Tiermodell charakteristischen - Resolutionsphase, einem Wiederherstellungsprozess ursprünglich morphologischer und funktioneller Gegebenheiten. Dieser „Remodellingprozess“ im akuten Modell der mesangioproliferativen ATS-Nephritis prädisponiert zur Klärung subzellulärer Resolutionsvermittlung gegenüber dem prolongierten Verlauf im chronischen ATS- Verlaufsmodell.

Neben einer Reduktion der Synthese an Wachstumsfaktoren trägt im Rahmen des Matrixabbauvorgangs speziell das Expressionsverhältnis an matrixabbauender Proteasen (MMPs) und Plasminogen Aktivatoren (PAs) gegenüber deren Inhibitoren (TIMPs und PAIs) besondere Bedeutung [70, 121, 127]. In der Resolutionsphase erfolgt dies einerseits durch Expressionssteigerung proteolytischer Enzyme, andererseits durch verminderte Aktivität derer natürlichen Inhibitoren (Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)) [88]. Die Funktion der Matrixmetalloproteinase-9, einem wichtigen Vertreter der Matrixmetalloproteinasen, wurde in diesem Zusammenhang u.a. auch näher eruiert [77, 121]. Exprimiert wird diese in beiden Verlaufsformen des Anti- Thy- 1- Modells. Interessanterweise ist zwischen den Verläufen des akuten und chronischen Modells eine differente Expression der Matrixmetalloproeteinase-9 zu verzeichnen [127]. Die Regulation diesen Prozesses extrazellulärer Matrixdegradation obliegt unter anderem TGF- β [133]. Steigende Expressionswerte von TGF- β sind assoziiert mit einer

gesteigerten Matrixakkumulation, fallende TGF- β Level mit einer Resolution der extrazellulären Matrixexpansion.

1.2 Chemotaktische Zytokine

Der Begriff Zytokine (Cyto~ cell; kinin~ hormones) begründet sich auf den Erstbeschreiber Stanley Cohen aus dem Jahre 1974 [26, 27]. Innerhalb der vergangenen 25 Jahre erlangten Zytokine eine stetig zunehmende Relevanz in Bereichen der Diagnostik, Prognose und therapeutische Anwendbarkeit in nahezu allen menschlichen Erkrankungen. In der Vielzahl heute bekannter Zytokine summiert sich eine Gruppe hormonähnlicher, löslicher Proteine, die interzelluläre Kommunikation sowie Verständigung von Zellen mit ihrer Umwelt ermöglichen. Die Gruppe der Zytokine differenziert sich in Coloniestimulierende Faktoren (CSFs), Chemokine, Interferone (INFs), Interleukine, Lymphokine, Monokine, Tumornekrosefaktoren (TNFs) und Wachstumsfaktoren [71, 124].

Ebenso mannigfaltig wie die Vertreter dieser Gruppen regulatorisch subzellulärer Eminenz an biologisch aktiven Molekülen repräsentiert sich auch deren Aufgabenspektrum in nahezu allen physiologischen und pathologischen Prozessen. Sie induzieren und kontrollieren Bereiche der Vermittlung und Regulation spezifischer Immunabwehr, Vermittlung und Regulation unspezifischer Immunabwehr, Hämatopoese, Zellproliferation und Zelldifferenzierung [32, 124].

Besondere Beachtung soll in dieser Arbeit einer Subgruppierung dieser großen Familie der Zytokine gewidmet werden. Der Terminus der Chemokine (**chemotaktische Zytokine**) begründet sich auf ein Symposium aus dem Jahre 1992 in der Nähe von Wien (Baden, Österreich), nach dem Internationalen Immunologie Kongress 1992 [1, 64].

Charakteristika dieser beim Menschen fast 50 Vertreter umfassenden Familie chemotaktisch aktiver Moleküle sind neben ihren funktionellen, ihre biochemischen Eigenschaften [144]. Alle dieser 8- 12kDa schweren Moleküle weisen in ihrer Primärstruktur eine 20 bis 90%ige Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf [2]. Definiert sind Chemokine durch vier Cysteinreste, die über Disulfidbrücken stabilisiert werden.

Je nach Lage der ersten zwei Cysteinreste in der Primärstruktur werden Chemokine in vier Gruppen differenziert: die C-, die CC-, die CXC-, und die CX₃C- Subfamilie. Die CXC- Chemokine sind durch die Absenz zweier Cysteinreste charakterisiert. Die große Gruppe der CC- Chemokine ist durch die direkte Nachbarschaft zweier Cysteinreste gekennzeichnet. Hingegen divergieren besagte Cysteinreste in den Subfamilien der CXC und CX₃C- Chemokine durch interponierte Aminosäuren (X) [8].

Die Sekundärstruktur - bestehend aus drei β - Faltblattsträngen, C- terminaler α -Helix, und flexiblem N- Terminus – wird in der Tertiärstruktur nahezu vollständig durch zwei Disulfidbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert.

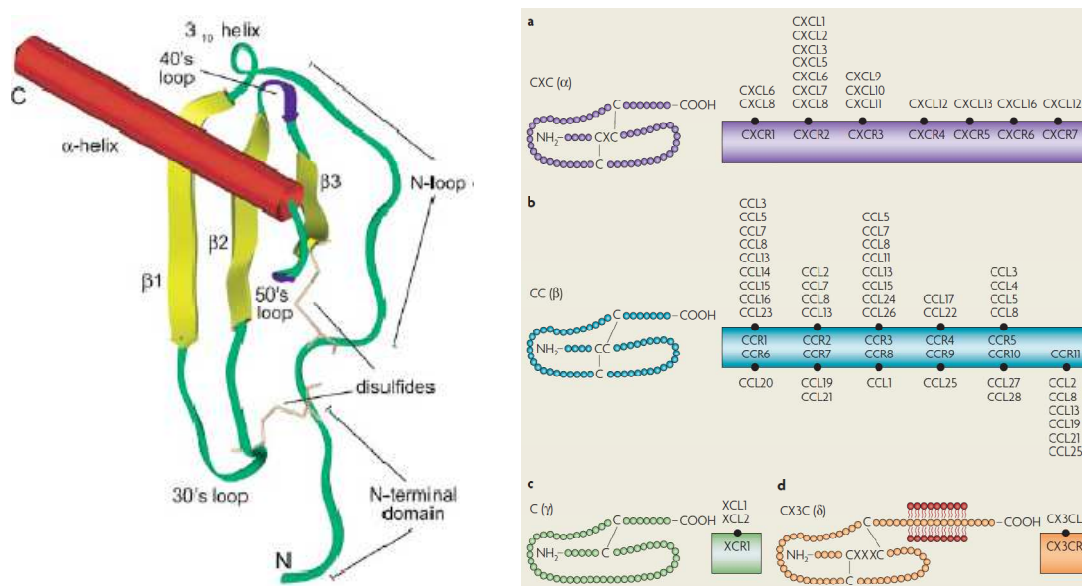


Abbildung 3
Struktur eines Chemokins

Das linke Bild zeigt die Sekundärstruktur eines jeden Chemokins, das rechte Bild die Einteilung der Chemokingruppenzugehörigkeit in CXC, CC, C, CX₃C- Chemokine sowie deren Vertreter

Chemokine üben – unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit - ihre chemotaktische Funktion durch Bindung an G- Proteingekoppelten Siebentransmembranproteinrezeptoren (7 TMR), aus. [2, 129, 144] Das N-terminale Ende, sowie 3 Schleifenbereiche verkörpern den extrazellulären Anteil des 7TM- Rezeptors; hingegen das C- terminale Ende und 3 weitere Schleifenbereiche den zytoplasmatischen Rezeptoranteil repräsentieren.

Über Aktivierung heterotrimerer ($\alpha\beta\gamma$) G- Proteine erfolgt der zytoplasmatische Anteil der Signalweiterleitung nach Bindung eines Chemokinliganden an den

extrazellulären Rezeptoranteil. Durch ein Wechselspiel der G-Proteinuntereinheiten können über Chemokin-7TMR – Interaktionen Signale unterschiedlicher Signalweiterleitungswege und dementsprechend auch eine Vielzahl biologischer Effekte induziert werden [68, 130].

Entsprechend der bindenden Liganden werden Chemokinrezeptoren (R) in vier Gruppen unterteilt: CR, CCR, CXCR, CX₃CR. Bezüglich ihrer Ligandenspezifität weisen die proinflammatorischen Chemokinrezeptoren eine breite Redundanz auf, jedoch binden stets C-C- Chemokinrezeptoren ausschließlich C-C Chemokine, und C-X-C- Chemokinrezeptoren C-X-C- Chemokine. Multispezifische Chemokinrezeptoren, die sowohl C-C als auch C-X-C- Chemokine binden, ohne durch die Bindung eine initialisierte Reaktion hervorzurufen, stellen die sog. Interzeptoren GPCAR, D6, DARC und CCX-CKR, dar [47, 74]. Chemokinrezeptoren finden sich neben ihrer Leukozytenpräsenz auch auf einer Vielzahl epithelialer, mesenchymaler und ektodermaler Zellen.

In der Niere - wie auch in anderen Organsystemen – ist die Differenzierung in inflammatorisch regulierte und homeostatische (lymphoide), konstitutiv exprimierte Chemokine, gebräuchlich.

Lokale Gewebeeinfiltration entzündungsspezifischer Zellen ist ein charakteristisches Korrelat nahezu jeden inflammatorischen Prozesses. Unter den vielfältigen Funktionen der Chemokine besitzt die Regulation der Leukozytenmigration und -aktivierung eine besondere Bedeutung für das Verständnis dieser in entzündlichen Prozessen [80, 143]. Chemokine vermitteln eine konzentrationsabhängige und zielgerichtete Migration entzündungsinvolvierter Zellen in das betroffene Areal [72]. Abhängig von der Zusammensetzung organspezifisch freigesetzter Chemokine sowie dem Vorhandensein an Chemokinrezeptoren, spiegelt sich die Aktivierung einzelner Leukozytensubspezies auf den auslösenden Reiz wider. Basale Ausschüttungslevel inflammatorisch induzierter Chemokine sind lediglich in geringem Maße zu verzeichnen. Durch ischämische, toxische oder entzündungsbedingte Schädigung findet allerdings eine massive Hochregulation dieser subzellulären Signaltransmitter statt [94, 112].

Im Gegensatz zu den inflammatorisch regulierten Chemokinen prädisponiert in der Gruppe der homeostatischen (lymphoiden) Chemokine deren konstitutiver

Expressionslevel. Ihre Produktion wird durch eine größere Anzahl spezifischer Stimuli aufrechterhalten, als dies bei den inflammatorisch- induzierten Chemokinen der Fall ist.

Innerhalb der letzten 10 Jahre erweiterte sich das Wissen über chemotaktische Zytokine, sowie die Bedeutung und Beteiligung dieser in den unterschiedlichsten physiologischen und pathologischen Prozessen jedoch weit über diese ursprünglichen Annahmen. Beispielsweise wären in diesem Zusammenhang regulative Beteiligungen von Chemokinen an Prozessen der Embryogenese, Hämatopoese, Angiogenese, Zelldifferenzierung, Kanzerogenese, und vielen weiteren zu nennen.

1.2.1 Chemokine und Niere

Wie Zellkulturversuche zeigen, sind alle intrinsisch renalen Zellen (Endothelzellen, Podozyten, Mesangiumzellen, Parietalzellen, Tubuluszellen, und interstitielle Fibroblasten) nach entsprechender Stimulation in der Lage Chemokine zu produzieren. Zu den Stimulantien zählen hierbei neben proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1 β und TNF α , Wachstumsfaktoren, LPS, Immunkomplexe, LDL, Interferon und cAMP [94]. Durch Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen erfolgt in Zellkulturen innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden ein rapider Anstieg der Chemokinproduktion. Dieser ist dann über einen Zeitraum von 24- 48 Stunden zu verzeichnen. Eine Inhibition der Expression inflammatorischer Chemokine kann andererseits erfolgen durch Glukokortikoide [35, 101], Zytokine wie TGF- β [41] und Prostaglandine wie PGE2 [110].

Der Verlauf der Chemokinexpression steht zeitlich, örtlich und mit der Stärke der renalen Schädigung in engem Zusammenhang. Sowohl bei akut glomerulären, als auch bei tubulointerstitiellen Erkrankungen wird eine „Hochregulation“ der Expression proinflammatorischer Chemokine beobachtet. Anfangs ist deren Hochregulation auf das entsprechende Kompartiment beschränkt und wird durch eine Leukozyteninfiltration begleitet. Je nach Schädigungsprozess kann eine Downregulation dieser proinflammatorischen Chemokine eine Ausheilung bedeuten, oder – im Falle eines Ausbleibens der Suppression proinflammatorischer Stimuli – eine Ausdehnung der

Chemokinproduktion und somit leukozytären Infiltration auf primär gesunde Bereiche mit sich ziehen [4].

Gemäß den differenten Tiermodellen und der Varietät entzündlicher humaner Nierenerkrankungen werden stets Unterschiede in Art, Ort und Menge der gebildeten Chemokine verzeichnet. Darüber hinaus kann sich das Expressionsmuster während der Erkrankungsperiode innerhalb einer speziellen Krankheit wandeln. Trotz allem kann die Nephrologie gerade aufgrund dieser besagten Vielfalt humaner Nierenerkrankungen und Tiermodelle dem Fortschritt der Forschung wesentlich beitragen.

1.2.2 Charakteristika ausgewählter Chemokine und Chemokinrezeptoren

Die funktionellen Aufgaben der beiden C-C- Chemokine MCP-1/ CCL2 und RANTES/ CCL5, der C-X-C – Chemokine IP-10/ CXCL10 und SDF-1/CXCL12 sowie dem CXC- Chemokinrezeptor- 4 sind überaus vielfältig. Daher sollen sie in nephrologischem Bezug, und - soweit wie möglich - auf das in dieser Arbeit verwendete experimentelle Glomerulonephritismodell näher erläutert werden.

1.2.2.1 CC- Chemokine

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2)

Die vier Mitglieder umfassende Familie der Monocyte chemoattractant proteine (MCP-1 bis 4) binden mit hoher Affinität an den Chemokinrezeptor CCR2. Besondere Bedeutung kommt in der Niere dem CCR2 bindenden Chemokin MCP-1/ CCL2 zuteil.

Glomeruläre Monozyten/ Makrophageninfiltration während der Initialphase stellt ein charakteristisches Korrelat einer durch Anti- Thymozytenserum hervorgerufenen mensangioproliferativen Glomerulonephritis bei der Ratte dar. Der hiesige Prozess glomerulärer Monozyten- /Makrophagenrekrutierung wird auf subzellulärer Ebene weitgehend durch Chemokine vermittelt, bei denen MCP-1 eine prädominante Rolle zuteil wird [119]. Durch Verwendung eines neutralisierenden MCP-1 Antikörpers wurde im Jahre 1997 nicht nur die Bedeutsamkeit dieses C-C- gruppenzugehörigen Chemokins in der M/ M- Infiltration in der Niere determiniert, sondern vielmehr auch die MCP-1 und somit monozytärvermittelte Progression von (Glomerulo)nephritiden gesichert [134]. MCP-1 stellt darüber hinaus eine Art Paradebeispiel für das komplexe

Netzwerk spezifischer Chemokin- Zytokin- Interaktionen dar. So wird auch die Resolutionsphase durch Expression von MCP-1 nicht unwesentlich beeinflusst. MCP-1 stellt nicht nur einen entscheidenden Mediator in der M/M – Infiltration dar, sondern besitzt darüber hinaus auch profibrotische Effekte – vermittelt durch TGF- β induzierte Kollagen Typ IV- Synthese [25, 111, 135].

Regulated on activated normal T cell expressed and secreted (RANTES/CCL5)

Das Chemokin RANTES/ CCL5 ist Mitglied der C-C- Chemokinfamilie und ein Ligand der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3, CCR5.

Ähnlich wie bei dem Chemokin MCP-1 wurde mittels Neutralisation die Funktion des Chemokines RANTES im ATS- Modell näher untersucht [93]. Amino-oxy-pentane Rantes (AOP- RANTES), ein modifiziertes Chemokinderivat, bindet mit hoher Affinität an den CCR5 Rezeptor an Monozyten [102]. Durch diese experimentell herbeigeführte Rezeptorblockade wird – ähnlich wie bei Verwendung eines Anti- MCP-1- Antikörpers - eine Reduktion glomerulärer M/M- Infiltration bis über 60%, sowie eine verminderte glomeruläre Kollagen Typ IV- Synthese verzeichnet. Hingegen zur spezifischen Neutralisationsreaktion durch Verwendung eines MCP-1 Antikörpers, ist durch Verwendung von AOP- RANTES jedoch mehr die Wirkung der weiteren CCR5 Liganden geblockt, denn die Wirkung von RANTES.

RANTES zeigt seine positive Reaktion vielmehr im M/M- Rekrutierungsprozess um einen Zeitpunkt von ungefähr 5Tagen post Nephritisinduktion – der jedoch im Anti- Thy 1- Modell nicht überbewertet werden darf [93].

1.2.2.2 CXC- Chemokine(rezeptoren)

Interferon (IFN) inducible protein (IP-10/CXCL10)

Das 10kDa Interferon (IFN) inducible protein (IP-10/CXCL10) ist ein bedeutender Vertreter der CXC- Chemokinfamilie, dessen Namensgebung sich als Genprodukt in Antwort auf IFN γ begründet. Als Ligand des Chemokinrezeptors CXCR3 (CXCR3A/B) teilt sich IP-10 diesen mit 3 weiteren Bindungspartner, den Chemokinen PF4/ CXCL4, MIG/ CXCL9, ITAC/ CXCL11. IP-10 gilt als potenter Vermittler differenter Leukozyten [79]. Speziell in der T-Lymphozytenabhängigen Th1- Immunantwort kommt IP-10 besondere

Bedeutung zuteil. Durch Zellkulturversuche konnte eine potentielle Expressionsfähigkeit von Mesangiumzellen und Podozyten gezeigt werden [42]. Im ATS- Modell wurde in vivo darüber hinaus mittels Immunhistochemie gezeigt, dass der CXC- Rezeptor 3 sowie dessen Ligand IP-10 von Podozyten und in geringerem Ausmaß auch von Mesangiumzellen exprimiert wird. Sowohl als basal exprimiertes homeostatisches/konstitutives, als auch inflammatorisches Chemokin erlangt es hierbei Bedeutung [45]. Durch Neutralisation mit einem monoklonalen Antikörper konnte dieselbe Arbeitsgruppe im ATS- Modell zeigen, dass Neutralisation von IP-10 in einer Exazerbation von Mesangiolyse und Matrixexpansion resultierte.

Das Chemokin Stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL12)

Das Chemokin Stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) ist ein 1993 erstmalig beschriebener Vertreter der Gruppe der CXC- Chemokine [13, 123]. Neben den beiden ursprünglich beschriebenen, unterschiedlich gespleißten Isoformen von SDF-1 existieren mittlerweile 4 weitere, deren funktionelle Signifikanz jedoch bisher ziemlich unergründet ist [28, 118, 140].

Entgegen der lange währenden Annahme zwischen SDF-1 und einzig dem Rezeptor CXCR4 bestände eine Beziehung, gilt seit dem Jahre 2006 SDF-1 als Ligand der Rezeptoren CXCR4 und 7 [11, 13, 19].

Die Expression von SDF-1 erfolgt unter physiologischen Bedingungen von Bindegewebs- und Endothelzellen der Organe Knochenmark [87], Lunge, Herz [29], Skelettmuskulatur [104], Leber [49], ZNS [9], und Niere [126].

In der Niere erfolgt die homeostatisch regulierte Expression während der Organogenese, aber auch in der adulten Niere – überwiegend in distal-tubulären Arealen. In der Literatur bestehen in diesem Zusammenhang Differenzen in der Expression im Bereich proximal- tubulärer und Sammelrohrabschnitte. Unter pathologischen Situationen lässt sich darüber hinaus eine - in der Literatur ebenfalls unterschiedlich angegebene – SDF-1 Positivität in endothelial- glomerulären bzw. parietal- epithelialen Arealen registrieren [76, 126].

Die Aufgaben des Chemokins SDF-1 sind vielfältig in der Regulation essentieller physiologischer und pathologischer Prozesse – sowohl als konstitutiv exprimiertes, als auch in geringerem Maße als inflammatorisch

induzierbares Chemokin. Neben funktionellen Aufgaben in Bereichen der Entwicklung (Embryogenese/ Organogenese/Regeneration) [66, 87, 105, 145], Stammzellmotilität[65], Tumorphagenese [63, 103] und Angiogenese [24, 67, 98] besitzt es vielfältig chemotaktische Aufgaben während inflammatorischer Prozesse. So werden einerseits im initialen Verlauf einer Entzündung die SDF-1 vermittelten chemotaktischen Eigenschaften sowie deren Bedeutung für die leukozytären Subpopulationen in verschiedenen Tier-, Organ-, und Krankheitsmodellen beschrieben [99, 132]. Andererseits scheint die funktionelle Achse von SDF-1 und dessen Rezeptor CXCR4, gerade auch für den Verlauf der regenerativen Resolutionsphase einer Entzündung bedeutende Relevanz zu besitzen. In diesem Zusammenhang sollte speziell auf die Bedeutung diesen Chemokins während Prozessen des Remodellings hingewiesen werden [5, 21, 82, 126, 138].

Der Chemokinrezeptor CXCR4

Durch seine Funktion als Korezeptor beim Eintritt des lymphotropen HIVirus wird der Chemokinrezeptor CXCR4 nicht nur durch seine Bezeichnung „Fusin“ charakterisiert, sondern gilt darüber hinaus als einer der besterforschten Chemokinrezeptoren [78]. Er ist ein 352 aminosäureumfassender G-proteingekoppelter 7- Transmembrandomänenrezeptor (s. Abschnitt 1.2), dessen ligandeninduzierte Signalweiterleitung ein komplexes Netzwerk intrazellulärer Kaskaden umfasst [20, 96]. Einziger Ligand diesen Chemokinrezeptors stellt das Chemokin Stromal cell derived factor-1 dar. Gemeinsam mit dem Chemokinrezeptor CXCR7 teilt er sich diesen Liganden [11, 13, 19, 86]. In neueren Studien wird den unterschiedlichen funktionellen Reaktionen dieser beiden Rezeptoren bezüglich des gemeinsamen Liganden SDF-1 besondere Relevanz zuteil [82, 125].

Seine Mannigfaltigkeit der ihn präsentierenden Zellen unterscheidet den Chemokinrezeptor CXCR4 von den meisten Chemokinrezeptoren. Während CXCR4 initial von Leukozyten geklont wurde, haben sich inzwischen viele Zelltypen positiv auf die Expression diesen Chemokinrezeptors bewährt [75]. Speziell sei in diesem Zusammenhang auf die physiologische CXCR4 Expression der Niere in Bereichen der proximalen und distalen Tubuli hinzuweisen [76, 126].

In heutiger Zeit steht der Chemokinrezeptor CXCR4 vor allem aufgrund seiner Expression von Tumorzellen im Mittelpunkt des medizinischen Interesses [63, 103]. Durch seine Beteiligung nicht nur in den genannten medizinischen Bereichen zeigt mehr als deutlich, welche vielfältige Funktionalität dem Chemokinrezeptor CXCR4 darüber hinaus zugeschrieben werden kann. So ist er in Ausbildung des spezifischen Rezeptor- Ligandensystems gemeinsam mit SDF-1 in Bereichen der Entwicklung (Embryogenese/ Organogenese/ Regeneration) [66, 87, 105, 145], Stammzellmotilität [65], Angiogenese [24, 67, 98] und vielen weiteren zu erwähnen.

1.2.3 Therapeutische Aspekte der Chemokinsignalkette

Theoretisch können alle Schritte der Chemokinproduktion und –wirkung als therapeutisch intervenierbare Stellen dieser Signalkette angesehen werden.

Eine Interventionsstelle durch Blockade der Chemokinproduktion stellen NF- κ B Inhibitoren dar. Primär sei hierbei die Kortikosteroidtherapie zu nennen, aber auch der durch ACE- Hemmer vermittelte renoprotektive Effekt ist u.a. auf eine Interaktion mit NF- κ B- zurückzuführen [51, 108].

Verwendung von Anti- Chemokin- Antikörper stellt eine Chemokin-neutralisationmethode dar, bereits freigesetzte Chemokine zu inaktivieren [113]. Neben Viren zeigen auch Heparin und heparinähnliche Moleküle derartige Chemokininteraktionen [4].

Chemokinrezeptorantikörper haben sich in interventionellen Tierexperimenten als wirksam erwiesen.

Chemokinrezeptorantagonisten stellen in der selektiven Inhibition der Chemokinsignalkette jedoch die weitaus größte Gruppe dar. Einerseits bleiben durch deren Anwendung weitere intrazelluläre Signalkaskaden durch spezifische Rezeptorenblockade unbeeinflusst, andererseits beweist die Ligandenredundanz oft limitierende Anwendbarkeit.

1.2.3.1 Der CXCR4 Rezeptorenantagonist AMD3100

Ungeachtet des biochemischen Hintergrundes erlangte in den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts das bicyclische Molekül AMD3100 als hochpotenter Replikationsinhibitor der HIViren Typ 1 und 2 an Bedeutung [30, 31].

AMD3100 stellt ein kleines Molekül aus der Familie der Bicyclame dar, auch bezeichnet als JM3100 oder SID791.

AMD3100 ist ein hochpotenter Rezeptorenantagonist des Chemokinrezeptors CXCR4, der eine rezeptorvermittelte Signaltransduktion und Internalisierung selektiv inhibiert [38, 50].

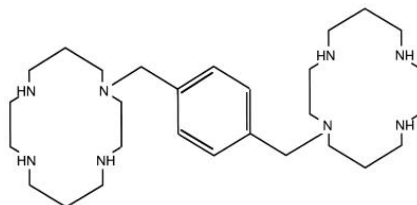


Abbildung 4

Chemische Struktur von AMD3100

Phenylbis(methylene)- bis-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane

Mit Entdeckung des durch AMD3100 antagonisierbaren Chemokinrezeptors CXCR4, dessen Liganden SDF-1, sowie der vielfältig funktionellen Bedeutung dieser Rezeptor- Liganden- Interaktion erstreckte sich das Anwendungsgebiet in der Forschung weit über die Replikationsblockade des lymphotropen HIVirus (s. Kapitel 1.2.2.2).

2. Methoden und Material

2.1 Versuchsaufbau

2.1.1 Quantitativ chronologische Expressionsanalyse im ATS- Modell

Der erste Teil dieser experimentellen Arbeit soll eine chronologische Auflistung der folgenden 9 Zytokine/ Chemokine nach quantitativem Ausmaß in der experimentell induzierten mesangioproliferativen Glomerulonephritis zu verschiedenen Zeitpunkten ermitteln. Präferentiell sollen hierbei MCP-1, IP-10, RANTES, Angiopoietin-2, TGF- β , MMP-9, Kollagen IV, SDF-1, CXCR4 näher untersucht werden.

Die quantitativ chronologische Analyse umfasst 12 Zeitpunkte des Nachweises (1, 3, 12, 24 Stunden, sowie 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 120 Tage) nach intravenöser ATS Applikation. Jedem Zeitpunkt werden vier Versuchstiere zugeordnet. Der Negativkontrolle dienen zum Zeitpunkt zwei Tage und zehn Tage jeweils vier Kontrolltiere. Der Nachweis einer erfolgreichen Induktion einer Glomerulonephritis durch die verwendeten Seren erfolgt mittels histologischem (PAS- Färbung), immunhistologischem (CD68/ ED1- Färbung), IgG- Nachweis, Komplementnachweis) und biochemischem RT- PCR Nachweis (MCP-1).

2.1.2 Die Resolutionsphase unter Verwendung eines CXCR4 Rezeptorenblockers

In diesem Teil der Arbeit soll die Resolutionsphase der glomerulären Entzündung des in Kapitel 1.1 analysierten ATS- Modells unter Verwendung des CXCR4 Chemokinrezeptorenblockers AMD3100 näher untersucht werden. Entsprechend dem ersten Teil dieser Arbeit bestimmt neben histologischen Untersuchungen eine quantitativ chronologische Zytokin-/ Chemokinanalyse die Grundlage diesen Versuchsteils. Näher untersucht werden sollen hierbei in der Resolutionsphase der Entzündung folgende 4 Zytokine und Chemokine: CXCR4, SDF-1, MCP-1, TGF- β .

Die nähere Analyse umfasst gemäß Abbildung 5, 4 Zeitpunkte des Nachweises nach intravenöser ATS Applikation (5, 10, 14, 21 Tage).

Der Zeitpunkt 5 Tage soll mit zwei Versuchsgruppen (nierengesunde und nephritische Versuchstiergruppe) primär dem Vergleich mit späteren

Versuchszeitpunkten dienen. Jedem weiteren Untersuchungszeitraum zu den Zeitpunkten 10, 14 und 21 Tage nach ATS- Injektion werden drei Versuchsgruppen mit jeweils 4 Tieren zugeordnet: nierengesunde, nephritische, und nephritische - AMD3100 behandelte Versuchsgruppe.

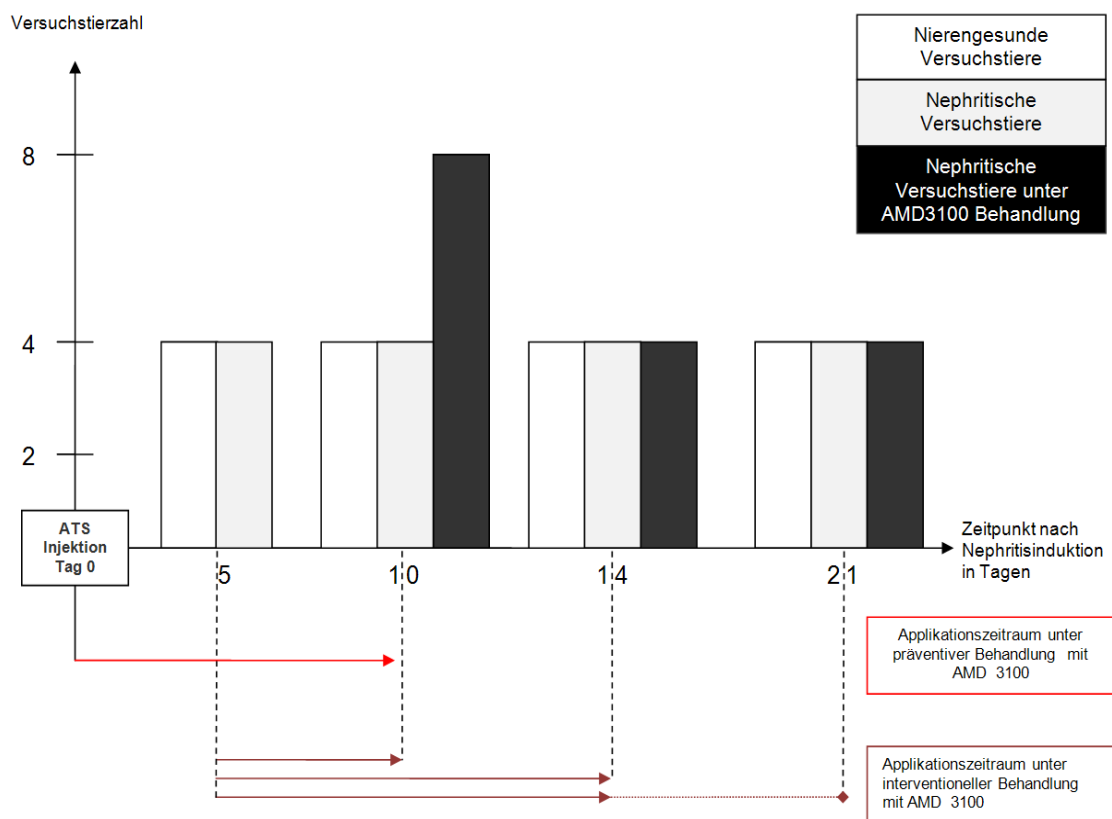


Abbildung 5
Die Resolutionsphase unter Verwendung des CXCR4 Rezeptorantagonisten AMD3100

Die nierengesunde Versuchstiergruppe bleibt innerhalb des vorgesehenen Versuchszeitraums unbehandelt.

Bei der nephritischen Versuchsgruppe wird gemäß der nephritisch- AMD3100 behandelten Versuchstiergruppe vorgegangen - lediglich wird hierbei anstelle des Rezeptorenblockers eine äquimolare Kochsalzlösung über den geplanten Zeitraum appliziert.

In der nephritischen- AMD3100 behandelten Versuchsgruppe erfolgt über den geplanten Zeitraum die Applikation von AMD3100 zweimal täglich intraperitoneal. Durch den differenten Beginn der Behandlung mit dem CXCR4 Antagonisten AMD3100 muss im Folgenden unterschieden werden zwischen einer präventiven und einer interventionellen Behandlung.

2.2 Versuchstiere

Zu beiden Versuchsteilen wurden 3 Wochen alte, weibliche Ratten vom Typ Wistar mit einem Gewicht von 100- 140g zu Versuchsbeginn verwendet. Bezogen wurden diese über Charles River Deutschland.

2.2.1 Gewinnung von Anti- Thymozyten- 1 Serum

Zur Herstellung von Anti - Thymozyten - 1 Serum werden acht bis zehn Lewis-Ratten die Thymusdrüsen entnommen um Antigen für die Herstellung von Anti-Thymozyten Antikörpern zu gewinnen. Das Thymusgewebe wird nach Zerkleinerung und Verdünnung mit jeweils 50ml PBS zwei Siebvorgängen (Porengröße 106µm und 50µm) unterzogen. Von der erhaltenen Zellsuspension wird eine Verdünnung von 1×10^8 Thymozyten pro ml PBS angefertigt und Aliquots mit einem Volumen von einem Milliliter Thymozytensuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung können die gewonnenen Antigen- Aliquots bei -20°C aufbewahrt werden.

Unmittelbar vor Gebrauch des Antigens werden pro Injektion 4×10^8 Zellen aufgetaut, bei 3500 U/min abzentrifugiert und in 0,5ml PBS aufgenommen. Als Immunisierungsadjuvants dienen 0,5ml Hunters Titer Max. Die hergestellte Thymozytenantigenemulsion wird 3-4kg schweren Kaninchen an 6-8 differenten Stellen subkutan injiziert. Dieser Vorgang wird im Abstand von vier Wochen viermalig durchgeführt, um die ausreichende Bildung von Antikörpern gegen das Injektionsagens zu gewährleisten. Nach Entbluten des Kaninchens wird das gewonnene Vollblut bei 3500U/min abzentrifugiert und das Serum für vier Stunden bei 56°C dekomplementiert. Bei Lagerung unter -20°C ist dieses etwa zwölf Monate ohne Aktivitätsverlust verwendbar.

2.2.2 Induktion einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis

Für die Induktion einer ATS induzierten Glomerulonephritis werden pro Tier 1ml des in Schritt 2.2.1 gewonnenen Anti- Thymin- 1- Serums benötigt. Als Injektionslokalität dient die prominente Vena caudalis mediana des Versuchstieres.

2.2.3 Applikation des Chemokinrezeptorenblockers AMD3100

Gemäß dem Planungsschema aus Kapitel 2.1.2 erfolgt die Applikation des Chemokinrezeptorenblockers AMD3100 zweimal täglich über den angesetzten Zeitraum. Verabreicht werden hierbei pro Tag 1,5mg des CXCR4 Rezeptorenantagonisten gelöst in 1ml Aqua ad injectabilia. Die Injektion erfolgt mit Hilfe einer Insulinspritze intraperitoneal.

2.2.4 Nephrektomie

Die zeitbezogene Entnahme der Nieren orientiert sich an den Versuchaufbauschemata des Abschnitts 2.1. Bei der Durchführung gilt ein rasches Vorgehen zu praktizieren, um den Organschaden zwischen Nephrektomie und Frieren des Gewebes auf Trockeneis so gering wie möglich zu halten.

Mittels Isofluran wird eine Allgemeinanästhesie erzeugt um die Nierenperfusion bis zur eigentlichen Entnahme beider Nieren aufrecht zu halten. Die Narkoseeinleitung erfolgt mit 1,5-3,5 Vol.%, die Narkoseerhaltung mit 0,7- 1,4 Vol.%.

Nach einer grobflächigen Desinfektion des Fellbereiches kann im Folgenden eine Freilegung beider retroperitoneal gelegenen Nieren erfolgen. Hierbei werden mit einem horizontalen Schnitt, sowie bilateral longitudinalen Schnitten die Abdominalorgane des Tieres freigelegt. Die Schnitte erstrecken sich im Longitudinalbereich vom Flankenbereich bis zur unteren Thoraxapertur - verbunden durch einen supravesikulären vertikalen Schnitt.

Nach Nephroperfusion mit 0,9% PBS durch die Aorta abdominalis kann nun die möglichst hilumnahe Abtrennung von den Vasa renalia erfolgen. Vor weiterem Organtreatment werden Nierenkapsel und renales Fettgewebe von dem eigentlichen Nierengewebe separiert.

2.2.4.1 Gewebezuschnitt

Eine der in Schritt 2.2.4 „enukleierten“ Nieren wird im Folgenden längshalbiert. Dem Mittelschnitt folgend werden zwei ca. 5- 8mm dicke Scheiben abgetrennt. Eine dieser „Gewebescheiben“ wird für die nächsten 24 Stunden in Formalin für die anstehende histologische Untersuchung aufbewahrt, die andere erneut ihrem Durchmesser nach halbiert. Nach Entfernung des makroskopisch deutlich

erkennbaren Nierenpols und Nierenmarks werden beide Nierenscheibenhälften für die anstehenden Gefrierschnitte zur Mikrodissektion in einem Tropfen Tissue- Tek von 5-10mm Durchmesser fixiert.

Die restlichen zwei Drittel des Nierengewebes werden einschließlich der zweiten Niere für die Glomeruliisolation durch Siebverfahren benötigt.

Um die Gewebedestruktion so gering wie möglich zu halten wird der gesamte Schritt der Organaufteilung auf Eis durchgeführt.

2.3 RNA- Analyse

2.3.1 RNA- Gewinnung durch Siebverfahren

2.3.1.1 Glomeruliisolation

Das aus Kapitel 2.2.4.1 erhaltene Nierengewebe wird in einer Petrischale in ca. 5- 10mm dicke Scheiben geschnitten. Diesem schließt sich eine Rinden- Mark-Separation an, wobei der medulläre Bereich verworfen werden kann. Der Rindenbereich hingegen wird mit einem Skalpell zerkleinert und unter PBS Anfeuchtung vor dem Austrocknen bewahrt.

Das zerkleinerte Rindengewebe wird nun auf einen Sieb mit 90µm Porengröße gegeben, der sich auf einem Becherglas als Auffanggefäß befindet. Mit Hilfe eines Erlenmayerkolben und unter ständiger Anfeuchtung durch PBS wird das Rindengewebe dem Siebverfahren unterzogen.

Das Filtrat des ersten Siebvorgangs wird im Folgenden auf einen 53µm Porengröße fassenden Sieb gegeben, der sich ebenfalls auf einem Becherglas als Auffangbehälter befindet. Die auf dem Sieb befindlichen Glomeruli werden erneut unter reichlicher PBS- Anfeuchtung vom übrigen Gewebe gereinigt und von der Sieboberfläche in ein frisches Becherglas separiert. Die homogene Glomerulisuspension wird in ein Falkontube überführt. Nach 15minütiger Sedimentationszeit schließt sich ein Zentrifugationsvorgang für 10 Minuten bei 12000 1/min unter 4°C an. Der Überstand wird entfernt, das Pellet mit 25ml PBS aufgeschäumt und erneut für 10 Minuten bei 12000 1/min unter 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 0,9ml PBS gelöst.[12]

2.3.1.2 Isolation der Proteine

Ein Drittel der 900µl fassenden Glomerulisuspension in PBS aus Schritt 2.3.1.2 werden im Folgenden für die Proteinisolation verwendet. Hierbei werden die 300µl 10 Minuten bei 1200 1/min unter 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bei -20°C eingefroren.

2.3.1.3 Isolation der RNA

Die restlichen zwei Drittel der Glomerulisuspension (600µl) aus Schritt 2.3.1.2 werden für die RNA Isolation der glomerulären Zellen verwendet.

Hierbei gehe man folgendermaßen vor:

1. 10minütige Zentrifugation bei 1200 1/min unter 4°C und Abdekantation
2. Pelletresuspension mit 1000µl Trizol
3. 10minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur
4. Zugabe 200 µl Chloroform
5. 3minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur
6. Zentrifugation 15 Minuten bei 10000 1/min unter 4°C und Abdekantation
7. Pelletresuspension mit 500µl Isopropanol
8. 30minütigen Inkubationszeit
9. Zentrifugation 10 Minuten bei 10000 1/min unter 4°C und Abdekantation
10. Pelletresuspension mit 1ml 75%igem Ethanol
11. Zentrifugation 10 Minuten bei 10000 1/min unter 4°C und Abdekantation
12. Pelletresuspension mit 700µl 75%igem Ethanol

Die Glomeruli- Ethanolsuspension kann nun bei -20°C konserviert werden.

2.3.1.4 Anfertigung einer 100ng/ µl konzentrierten Lösung

Die in Schritt 2.3.1.1 durch Siebtechnik erhaltenen RNA- Isolationslösungen divergierender Konzentration werden im Folgenden einer spektralphotometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 260nm unterzogen. Durch Verdünnung mit Aqua dest. werden im Folgenden konzentrationssimiläre Lösungen von 100ng/µl hergestellt.

2.3.2 C- DNA Synthese

Um in einer RT-PCR gezielt mittels Amplifikation geringe Mengen an RNA einzelner Zytokine und Chemokine nachzuweisen, muss zunächst die gesuchte RNA in c-DNA umgeschrieben werden.

1. Zugabe zu 4µl RNA- Lösung (100ng/µl) von
 - a. 2 µl Hexamer Primer
 - b. 2 µl dNTP`s
2. Zugabe von 16 µl Aqua dest.
3. 5minütige Inkubation bei 65°C in Thermocycler
4. 1-2 minütiges Abkühlen auf Eis
5. Kurzes Abzentrifugieren bei 4000 1/min
7. Versetzen jeder Probe mit einem Gemisch folgender Komponenten:
 - a. 8 µl First strand buffer
 - b. 4 µl 0,1M DTT
 - c. 2 µl RNase out
 - d. 2 µl MLV- RT
8. Zentrifugation der Lösungen 10 Sekunden bei 4000 1/min
9. c- DNA- Synthese in Thermocycler starten

2.3.3 Quantitative RT- PCR- Messung

Eine RT- PCR- Messung erlaubt quantitative Rückschlüsse auf RNA- Ebene aufgrund definierter Amplifikationsabläufe.

2.3.3.1 Primersequenzen

Primer	Sequenz
GAPDH	Fw: AGA TGG TGA AGG TCG GTG TGA Rev: GAA GGC AGC CCT GGT AAC C
RANTES	Fw: AGT CGT CTT TGT CAC TCG AAG GA Rev: GAT GTA TTC TTG AAC CCA CTT CTT CTC

MCP-1	Fw: CAG CAC CTT TGA ATG TGA ACT TG Rev: TGA GGT GGT TGT GGA AAA GAG A
IP-10	Fw: GGG CCA TAG GAA AAC TTG AAA TC Rev: CAT TGT GGC AAT GAT CTC AAC AT
MMP-9	Fw: GGC GTG CCC TGG AAC TC Rev: CAT GGC AGA AAT AGG CCT TGT C
TGF- β	Fw: CGT GGA AAT CAA TGG GAT CAG Rev: GCA GGA AGG GTC GGT TCA T
SDF-1a	Fw: TCC AAA CTG TGC CCT TCA GAT T Rev: TTC GGG TCA ATG CAC ACT TG
Angiopoietin-2	Fw: GCT GAA GAT GCA GCT GAA GG Rev: CG GAC AGG TAG AAG TGC TC
CXCR4	Fw: TCC AAC AAG GAA CCC TGC TT Rev: GGG CAG GAA GAT CCT GTT GA

2.3.3.2 Primerstock

Jeder Primer besitzt bei der Lieferung durch dessen Hersteller gemäß seiner Zusammensetzung eine eigene spezifische Stoffmenge. Um bei allen Ansätzen äquimolare Stocklösung von 100 $\mu\text{mol/l}$ zu verwenden, muss der Primerstock entsprechend seiner spezifischen Stoffmengenangabe mit der jeweils benötigten Menge Aqua dest. verdünnt werden.

Die Primerstocks dienen wiederum einer Art „Regenerationsquelle“ der niedrigermolaren (1 μMolar) Primeraliquots, die dem Nachweis der zu amplifizierenden c- DNA dienen.

2.3.3.3 Mastermixansatz

Für die Durchführung einer RT-PCR benötigt man ein Gemisch mehrerer Komponenten, die für eine erfolgreiche Amplifikation der c-DNA unentbehrlich sind - dem als solchen bezeichneten Mastermix.

Basis der zu errechneten Mastermixmenge besteht in der Anzahl nachzuweisender c-DNA- Proben auf einer 96- Well- Platte.

Pro Primer ergibt sich demzufolge dies Mastermixberechnung:

Anzahl der cDNA Proben/ pro Primer	x	6,25 µl Syber Green Mastermix 1, 25 µl Vorwärtsprimer 1µM 1,25 µl Rückwärtsprimer 1µMolar 2,25 µl Aqua dest.
------------------------------------	---	--

Die Bestandteile des Mastermixes werden einem 1,5ml Eppendorftube zugeführt. Nach einem kurzen Zentrifugationsvorgang von 10s bei 4000 1/min kann der zubereitete Mastermix vor weiterer Verwendung bis zu maximal einer Stunde bei +4°C aufbewahrt werden.

2.3.3.4 96- Well- PCR- Plate

Gemäß dem Vorlageschema der 96- Well- Platte werden 11µl des in Schritt 2.3.3.3 angesetzten primerspezifischen Mastermixes jeder Öffnung der Platte zugeführt. Mittels Doppelbestimmungen gilt es Abweichungen möglichst gering zu halten (s.Kap. 2.3.3.6). Mit 1,5µl pro Well zu amplifizierender c- DNA aus Kapitel 2.3.2 verfährt man idem.

Der Negativkontrolle (Kontaminationskontrolle) dient statt c- DNA als Zugabeagens Aqua dest.. Der Positivkontrolle sowie der qualitativen und quantitativen Analyse dient das Housekeeping- Gen GAPDH.

Nach Abdeckung der 96- Well- Platte durch eine Kontaminationsschutzklebefolie erfolgt eine 1minütige Zentrifugation bei 1000 1/min, um eine quantitativ korrekte Messung zu gewährleisten.

2.3.3.5 Amplifikation und Messung

Die in Schritt 2.3.3.4 angerichtete 96- Well- Platte wird nun mit einer „Lochfolie“ für den Messvorgang versehen und in die Messvorrichtung des ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems eingefügt.

Nach entsprechender Softwareprogrammierung des ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems (Messfeldangabe, Messvolumen) kann die Messung des quantitativen RNA- Nachweises erfolgen.

2.3.3.6 Auswertung der Messergebnisse

Durch Bestimmung eines jeden quantitativen Messwertes mittels Doppelbestimmung (s. Kap 2.3.3.4) können Messungenauigkeiten detektiert und vermieden werden.

Ergebnisunterscheide quantitativer mRNA- Bestimmung mit Differenzen größer 0,8 bedürfen einer Wiederholung der Messung.

Die Ermittlung der relativen Expressionsunterschiede erfolgt gegenüber den Expressionsergebnissen der Ausgangslage/ Kontrolle.

Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelexperimenten angegeben.

Das mittels studentischem t- Test erlangte Signifikanzniveau p wurde mit 0.05 festgelegt.

Signifikante Ergebnisse sind mit #, + oder ☆ gekennzeichnet

2.4 Histologische Analyse

Für die histologische Analyse des zweiten Versuchsteils dienen neben der konventionellen PAS- Reaktion immunhistologische Färbungen für den Pan- T- Lymphozytenmarker CD3, den Monozyten/Makrophagenmarker CD68, sowie den B- Lymphozytenmarker CD79.

2.4.1 Konventionelle Histologie

Die konventionelle Histologie umfasst im Rahmen dieser Arbeit eine PAS- Färbung. Bei der Durchführung wird mit den entparaffinierten Schnitten wie folgt vorgegangen.

Nach einer 15minütigen Inkubation mit Perjodsäure 1% erfolgt eine 40minütige Einwirkzeit für Schiff'sche Reagenz. Diesem schließt sich eine 1minütige

Versetzung mit Hämatoxylin nach Böhmer an. Diesem folgend können die Schnitte eingedeckt werden.

2.4.2 Immunhistologie

2.4.2.1 CD 3

Mit den entparaffinierten Schnitten gehe man folgendermaßen vor.

Nach einer Inkubation mit Citratpuffer (pH 6,1) für eine Kochzeit von 25 Minuten erfolgt ein Block unspezifischer Bindungen mit 1:20 normalem goat Serum für 30 Minuten. Diesem schließt sich eine Inkubation mit dem Primärantikörper (1:1000 in 1:20 normalem goat Serum) an. Nach einer Versetzung mit dem Sekundärantikörper (1:200 in 1:20 goat Serum) für 30 Minuten, erfolgt eine Inkubation mit Streptavidin- AP (1:100) in PBS für 30 Min. Nach einer Farbentwicklung mit Neufuchsin, sowie einer Inkubation in Hämalaun nach Böhmer können die Schnitte eingedeckt werden.

2.4.2.2 CD 68

Mit den entparaffinierten Schnitten gehe man wie folgt vor.

Nach einem Verdau in einer wässrigen Trypsinlösung für 10 Minuten sowie einer Blockreaktion mit 100%iger Ethanollösung kann der Schnitt mit Leitungswasser über 15Minuten gereinigt werden. Durch einen Block unspezifischer Bindungen mit 1:20 normalem Pferde Serum in PBS für 30 Min kann eine Inkubation mit dem Primärantikörper 1:200 (in 1:20 normalem Pferde Serum) für 2 Stunden erfolgen. Nach einer Inkubation mit biotinyliertem donkey anti mouse 1:200 in PBS für 30 Minuten folgt eine Versetzung mit Streptavidin- AP 1:100 in PBS für 30 Minuten. Nach einer Farbentwicklung mit Neufuchsin und einer Reinigung in wässriger Salzsäure für 15 Minuten, kann eine Färbung mit Hämalaun nach Böhmer für eine Minute erfolgen. Dem Folgend können die Schnitte eingedeckt werden.

2.4.2.3 CD 79

Mit den entparaffinierten Schnitten gehe man wie folgt vor.

Nach einer Inkubation mit TBST/ EDTA- Puffer (pH 6,1) für eine Kochzeit von 25 Minuten erfolgt ein Block unspezifischer Bindungen mit 1:20 normalem Pferdeserum in PBS für 30 Minuten. Diesem schließt sich eine Inkubation mit

dem Primärantikörper 1:100 in 1:20 normalem Pferdeserum in PBS für 1,5 Stunden an. Nach einer Versetzung mit dem Sekundärantikörper 1:200 (in 1:20 Pferdeserum) für 30 Minuten erfolgt eine Inkubation in Streptavidin- AP 1:100 in PBS für 30 Minuten. Nach einer Farbentwicklung mit Neufuchsin, sowie einer Reinigung in wässriger Salzsäure für 15 Minuten, kann eine Färbung mit Hämalan nach Böhmer für eine Minute erfolgen. Dem folgend können die Schnitte eingedeckt werden.

2.5. Material

2.5.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
AMD3100	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; D
Aqua ad injectabilia	Baxter GmbH; Unterschleißheim; D
Cutasept Forte	Merck GmbH; Darmstadt; D
dNTP` s	Invitrogen GmbH; Karlsruhe; D
DTT 0,1M	Roth; Karlsruhe; D
Ethanol 100%ig	Invitrogen GmbH; Karlsruhe; D
Forene; Wirkstoff: Isofluran	Merck; Darmstadt; D
Formalin	Invitrogen GmbH; Karlsruhe; D
First strand buffer	Lonza; D
Glucose	Invitrogen GmbH; Karlsruhe; D
Hexamer Primer	Bode Chemie; Hamburg; D
Isopropanol	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; D
ML V- RT	Sakura Finetek GmbH; Heppenheim; D
PBS	Merck; Darmstadt; D
RNAse out	Invitrogen GmbH; Karlsruhe; D
Sterilium; Händedesinfektionsmittel	Bode Chemie; Hamburg; D
SybR green Jump Start Taq Mix	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; D
Tissue Tec	Sakura Finetek GmbH; Heppenheim; D
Trizol	Merck; Darmstadt; D

2.5.2 Chemikalienansätze

Chemikalienansatz	Herstellung
Sörensen- Phosphat- Puffer	14,1365g Natrium- hydrogenphosphat – 2- hydrat +1000ml Aqua. Bidest. +0,1mM HCl bis pH 7,4
4% Formalinlösung	320ml Sörensen- Phosphat- Puffer (s.o.) +40ml Formalin
Succhrose 5%	5g Succhrose +100ml Aqua bidest.

2.5.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Eisschrank -20°C	Privileg Öko; Fürth; D
Inverses Mikroskop	Zeiss IM 35; Carl Zeiss AG; Jena; D
Klebefolie PCR Platte	Sarstedt; Nümbrecht; D
Kühlschrank +4,0°C	Liebherr; Profiline; Biberach an der Riss; D
Megafuge	Haereus; Hanau; D
Mikroskop	Zeiss; Jena; D
Mikrozentrifuge	Eppendorf 5415D; Eppendorf AG; Hamurg; D
Operationsbesteck	Aesculap; AG & Co; Braun; Mittlingen; D
Pipetboy	Gilson SAS; Villiers Le Bel; F
Pipetman 1000 µl	Gilson SAS; Villiers Le Bel; F
Pipetman 200 µl	Gilson SAS; Villiers Le Bel; F
Pipetman 100 µl	Gilson SAS; Villiers Le Bel; F
Pipetman 20 µl	Gilson SAS; Villiers Le Bel; F
Pipetman 10 µl	Gilson SAS; Villiers Le Bel; F
Schere;	Aesculap AG & Co; Braun; Mittlingen; D
Skalpell	Aesculap AG & Co; Braun; Mittlingen; D
Thermocycler T- Gradient	Biometra; Göttingen; D
Tierfixateur	Braun; Melsungen; D
Tip System Box	Sarstedt; Nümbrecht; D
Waage	Sartorius AG; Göttingen; D
Waage	Scaltec GmbH; Göttingen; D
Wasserbad WTE 3185	Wilke Med- Technik; Magdeburg; D
Whirler VF2	IKA Labortechnik GmbH; Staufen; D
Sieb 90µm Durchmesser	Fisher Scientific; Schwerte; D
Sieb 53µm Durchmesser	Fisher;Scientific; Schwerte; D

2.5.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Einmal- Insulinspritzen 1ml	BD Plasipak, Becton Dickinson; Le Claix; F
Edge Rite	Richard- Allan Scientific; Kalamazoo; USA
Falkontube 50ml	Sarstedt; Nümbrecht; D

Handschuhe puderfrei	Peha- soft; Hartmann; Heidenheim; D
Leukoplast hospital	BSN medical GmbH & Co; Hamburg; D
Mikrotubes 0,5ml	Sarstedt; Nümbrecht; D
Pipetten; 20ml	Falcon; B&D; Le Point de Claix; F
Pipetten; 10ml	Falcon; B&D; Le Point de Claix; F
Pipetten 5ml	Falcon; B&D; Le Point de Claix; F
Schälchen 8,5cm	Sarstedt; Nümbrecht; D
Schälchen 3,5cm	Sarstedt; Nümbrecht; D
Sterican Injektionskanülen Gr. 1; 20Gx1 ½"	Braun; Melsungen; D
Sterican Injektionskanülen Gr.20; 7Gx3/4"	Braun; Melsungen; D
sterile Biosphere Filter Tips 1000 µl	Sarstedt; Nümbrecht; D
sterile Biosphere Filter 200 µl	Sarstedt; Nümbrecht; D
sterile Biosphere Filter 100 µl	Sarstedt; Nümbrecht; D
sterile Biosphere Filter 20 µl	Sarstedt; Nümbrecht; D
sterile Biosphere Filter 10 µl	Sarstedt; Nümbrecht; D
Tubes 12ml Cellstar	Greiner Bio- One Int. AG; Kremsmünster; D
Tube 10ml	Sarstedt; Nümbrecht; D
Tubes 1,5ml	Sarstedt; Nümbrecht; D

2.5.5 Software

Software	Hersteller
ABI- Prism 7000SDS	Software Version 1.1; Foster City; USA
Endnote	Version X1; Thomson; Carlsbad; USA
Microsoft Office 2007	Microsoft D GmbH; Unterschleißheim; D

2.5.6 Hardware

Hardware	
ABI Prism7000	Sequence Det.Sys.Applied Biosystems; USA
Drucker	HP Inkjet 1200; H.- P. GmbH; Böblingen; D
Laptop	Dell Latitude; Dell GmbH; Halle; D
Laptop	Samsung R50; Schwalbach/Ts; D

3. Ergebnisse

3.1 Quantitativ chronologische Expressionsanalyse im ATS- Modell

Der erste Versuchsteil dieser Arbeit orientiert sich an dem in Kapitel 2.1 dargestellten Versuchsaufbau. Ziel dessen liegt in einem quantitativ expressionsorientierten Nachweis differenter Chemokine, Chemokinrezeptoren, Zytokine, Strukturproteine und Enzyme im ATS- Modell auf mRNA- Ebene.

3.1.1 Monocyte chemoattractant protein-1 / CCL2

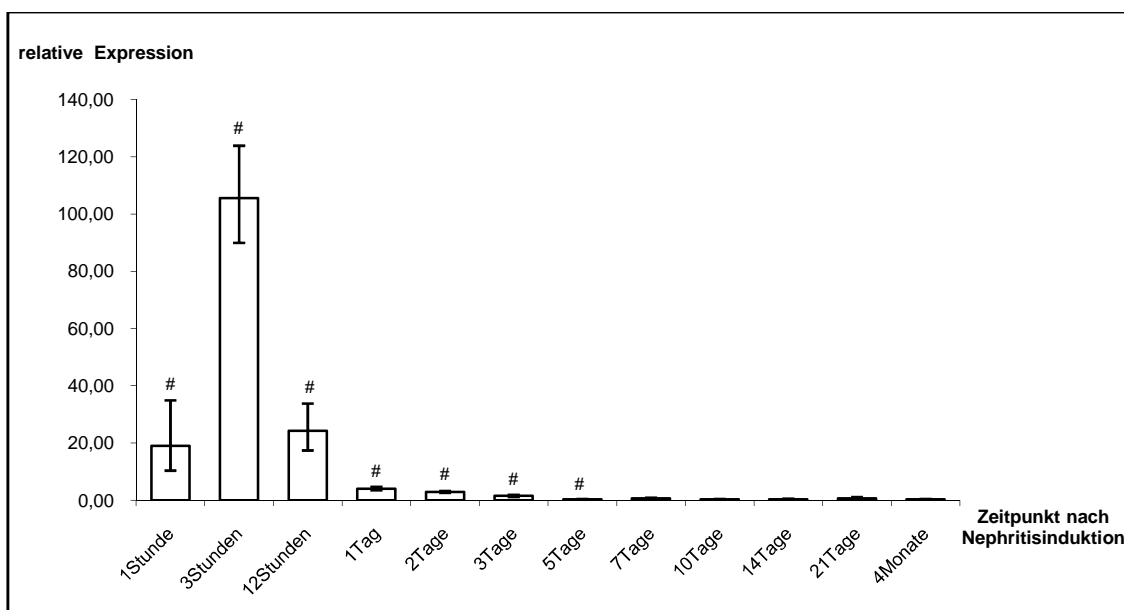


Abbildung 6
Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von MCP-1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Nephritisinduktion.

Darstellung als x- faches der Ausgangssituation (relative Expression); # = $p < 0,05$ gegenüber Ausgangssituation; $n = 4$.

Bereits zu einem Zeitpunkt eine Stunde nach Verabreichung der mesangiolytischen Antikörper ist ein 19fach signifikant erhöhtes Expressionsniveau gegenüber der Ausgangssituation zu verzeichnen. Dieses mündet in einen Höchstwert glomerulärer MCP-1 Expression zu einem Zeitpunkt von 3Stunden ($\text{relative Expression (rE)}_{\text{ATS3Stunden}} 105,5$). 9Stunden nach Erlangen diesen Höchstwertes reduziert sich die glomeruläre mRNA-Expression wieder, beträgt jedoch gegenüber der Ausgangslage immer noch eine 24,23fach erhöhte Intensität. Zu den darüber hinaus untersuchten chronologisch folgenden Zeitpunkten 1, 2 und 3Tage nach Nephritisinduktion sind weiterhin erhöhte Expressionslevel bezüglich der glomerulären mRNA des

Chemokins MCP-1 zu registrieren - trotz fallender Tendenzen ($rE_{ATS1,2,3Tage}$ 4,06; 2,95; 1,53). Von dem Messzeitpunkt 5Tage nach Versuchsbeginn bis zum Ende der Untersuchung (4Monate) variieren die relativen Expressionswerte zwischen einem 0,30- und 0,70fachen gegenüber der Ausgangssituation.

3.1.2 Interferon inducible protein-10 / CXCL10

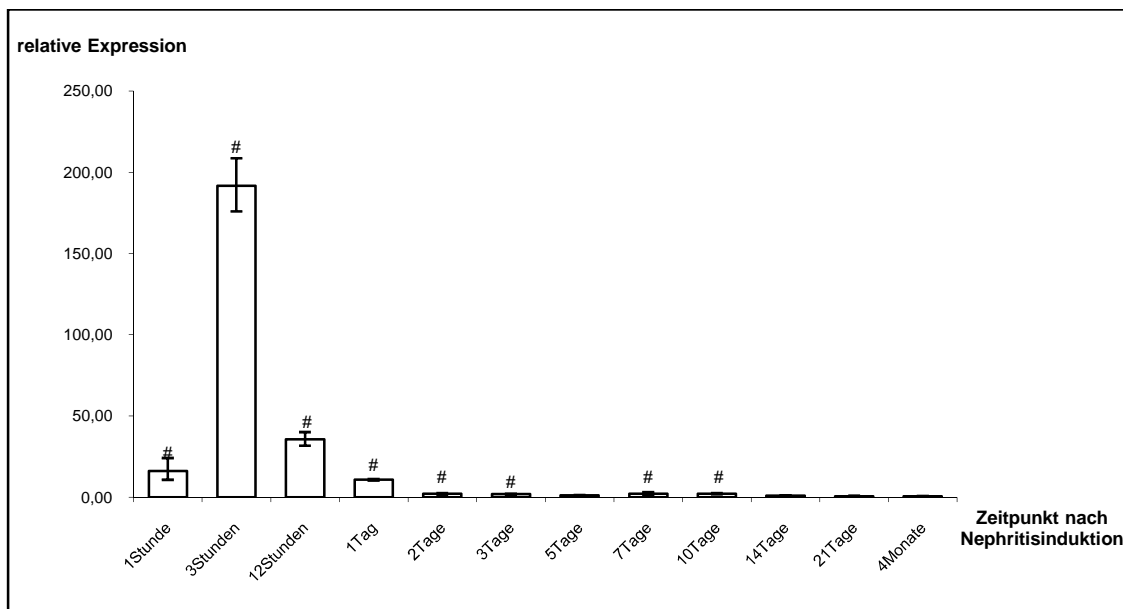


Abbildung 7

Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von IP- 10 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Nephritisinduktion.

Darstellung als x- faches der Ausgangssituation (relative Expression); # = $p < 0,05$ gegenüber Ausgangssituation; $n = 4$.

Nach einem signifikanten Anstieg zum ersten Zeitpunkt der chronologischen Messreihe ($rE_{ATS1Stunde}$ 16,22), findet das Chemokin IP-10 bereits zu einem Zeitpunkt von 3Stunden seine Maximalexpression (200fache Expressionssteigerung gegenüber der Ausgangslage). Nach einem progredient deszendierenden Verlauf über die folgenden Zeiträume 12 und 24 Stunden ($rE_{ATS12,24Stunden}$ 35,75; 10,84) zirkulieren die Messwerte der nachfolgenden Messpunkten 2, 3, 5, 7 und 10 Tage mit weitgehend signifikanten Expressionserhöhungen um das 2fache gegenüber der Ausgangssituation ($rE_{ATS2,3,5,7,10}$ 2,17; 1,98; 1,18; 2,19; 2,19). Der Untersuchungszeitpunkt 14 Tage markiert mit einer relativen Expression von 1,06 einen Wert nahe der Ausgangssituation, während hingegen zu den Zeitpunkten 21 Tage und 4 Monate verminderte Expressionsdaten gegenüber der Ausgangssituation zu verzeichnen sind ($rE_{ATS21Tage, 4Monate}$ 0,56; 0,61).

3.1.3 Regulated on activated normal T cell expressed and secreted / CCL5

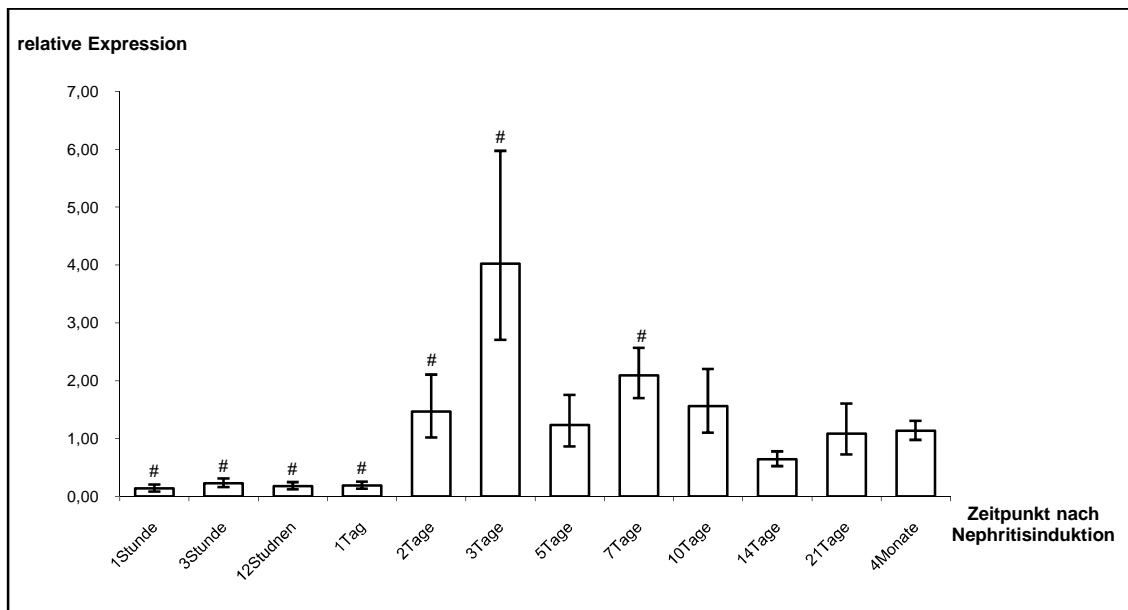


Abbildung 8
Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von RANTES zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Nephritisinduktion.

Darstellung als x-faches der Ausgangssituation (relative Expression); # = $p < 0,05$ gegenüber Ausgangssituation; $n = 4$.

Bei der expressionsorientierten Darstellung glomerulärer RNA für das Chemokin RANTES prädisponiert dessen vorerst zu verzeichnende Latenzphase. Innerhalb dieser zeigt sich über einen Zeitraum von einem Tag eine zunächst reduzierte Expression - während der Messpunkte 1, 3, 12 und 24 Stunden. Die relativen Expressionsminderungen variieren hierbei signifikant zwischen einem 0,14- und 0,23fachen gegenüber der Ausgangssituation. Diesem schließt sich eine glomerulär erhöhte, über einen Zeitraum von 9 Tagen persistierende, Expressionsphase für das untersuchte Chemokin an. So ist innerhalb diesen Zeitraums an Tag 3 ein Spitzenwert glomerulärer RANTES-Detektion zu registrieren, mit einer - gegenüber der Ausgangslage - 4,02fachen Intensität. Mit Ausnahme einer übermäßigen Expressionsreduktion an Tag 5 ($rE_{ATS5\text{Tag}} 1,24$), weisen die Tage 7 und 10 eine kontinuierliche Angleichung an das Ausgangsexpressionsniveau auf ($rE_{ATS7,10,14\text{Tag}} 2,09; 1,56$). An Tag 14 ist sogar eine Expressionsreduktion über das Maß der Ausgangslage zu beschreiben ($rE_{ATS14\text{Tag}} 0,64$). Die Zeitpunkte 21 Tage und 4 Monate zirkulieren um den Ausgangswert mit relativen Expressionen zwischen dem 1,08- und 1,13fachen.

3.1.4 Angiotensin-2

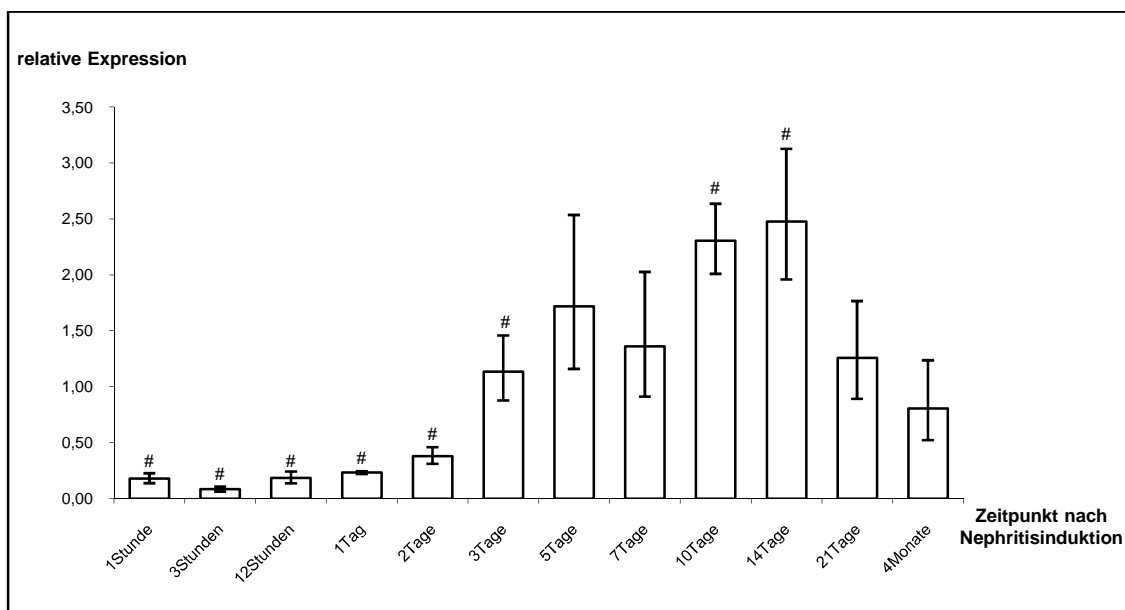


Abbildung 9
Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von Angiotensin-2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Nephritisinduktion.

Darstellung als x-faches der Ausgangssituation (relative Expression); # = $p < 0,05$ gegenüber Ausgangssituation; $n = 4$.

Innerhalb eines initialen Zeitraums von 2Tagen weist das glomeruläre Expressionsniveau für Angiotensin-2 eine signifikante Minderexpression auf. Die hierbei zu verzeichnenden relativen Expressionsreduktionen variieren zwischen einem 0,18- und 0,38fachen gegenüber der Ausgangslage. Über den folgenden Zeitraum der Tage 3, 5, 7, 10 und 14 zeigen sich gegenüber den zuvor erhobenen Daten Expressionssteigerungen. Mit Ausnahmen der Tage 5 und 7 weisen diese gegenüber der Ausgangslage ein signifikantes Ausmaß auf ($rE_{ATS3,5,7,10,14Tage}$ 1,13; 1,72; 1,36; 2,30; 2,48). Die sich anschließenden Expressionsdaten für den Tag 21, sowie den 4. Monat nach ATS- Applikation prädisponieren durch ein Expressionsniveau auf Höhe der Ausgangssituation ($rE_{ATS 21Tage;4Monate}$ 1,26; 0,81).

3.1.5 Transforming growth factor- beta

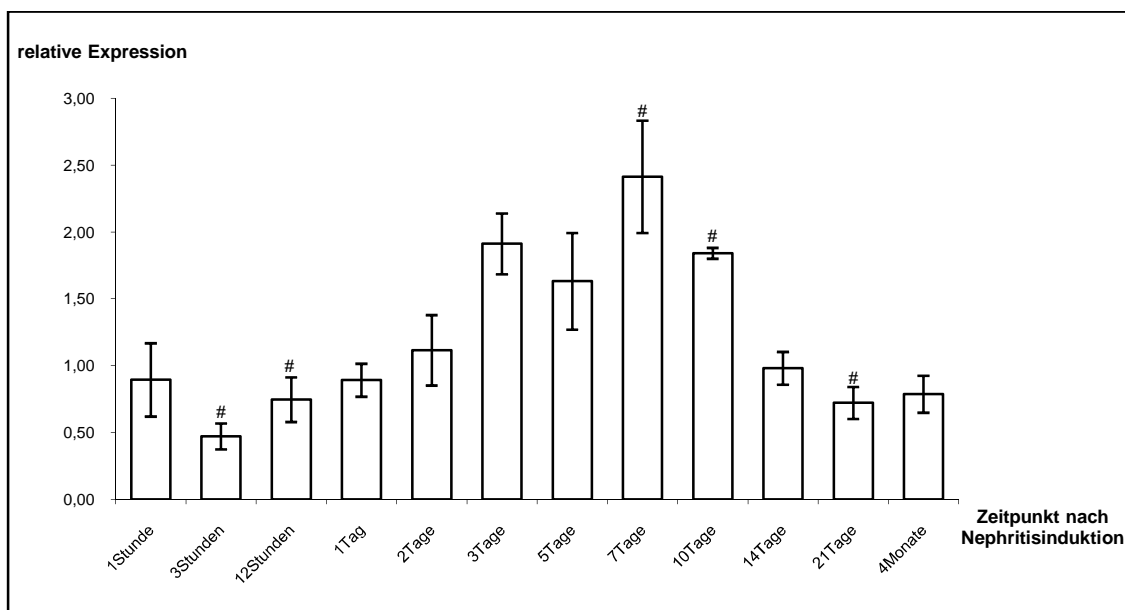


Abbildung 10
Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von TGF- β zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Nephritisinduktion.

Darstellung als x- faches der Ausgangssituation (relative Expression); # = $p < 0,05$ gegenüber Ausgangssituation; $n = 4$.

Zu einem Zeitpunkt 1 Stunde nach Applikation der nephrotoxischen Antikörper zeigt sich zunächst keine signifikante Änderung gegenüber der Ausgangssituation ($rE_{ATS1\text{Stunde}} 0,90$). Zu einem Zeitpunkt 3 Stunden nach Nephritisinduktion weist der Kurvenverlauf eine – gegenüber der Ausgangssituation signifikante - Expressionsreduktion von 0,47, auf. Diesem schließt sich an den Tagen 1/2, 1, 2 und 3 eine kontinuierliche Aszension der relativen Expressionen auf ein 0,75- (12h), 0,89- (Tag1), 1,12- (Tag2) und 1,91faches (Tag3), an. Nach einer geringen Expressionsreduktion an Tag 5 auf 163%, zeigt sich an Tag 7 ein Expressionsmaximum von 241% gegenüber der Ausgangssituation. Eine erneut abfallende Tendenz in Richtung Ausgangsniveau weisen die sich anschließenden Untersuchungstage 10 ($rE_{ATS10\text{Tag}} 1,84$) und 14 ($rE_{ATS14\text{Tag}} 0,98$), auf. Die glomeruläre Expression für TGF- β ist während der Tage 21 und 120 vermindert ($rE_{ATS21,120\text{Tag}} 0,72; 0,79$).

3.1.6 Matrixmetalloproteinase-9

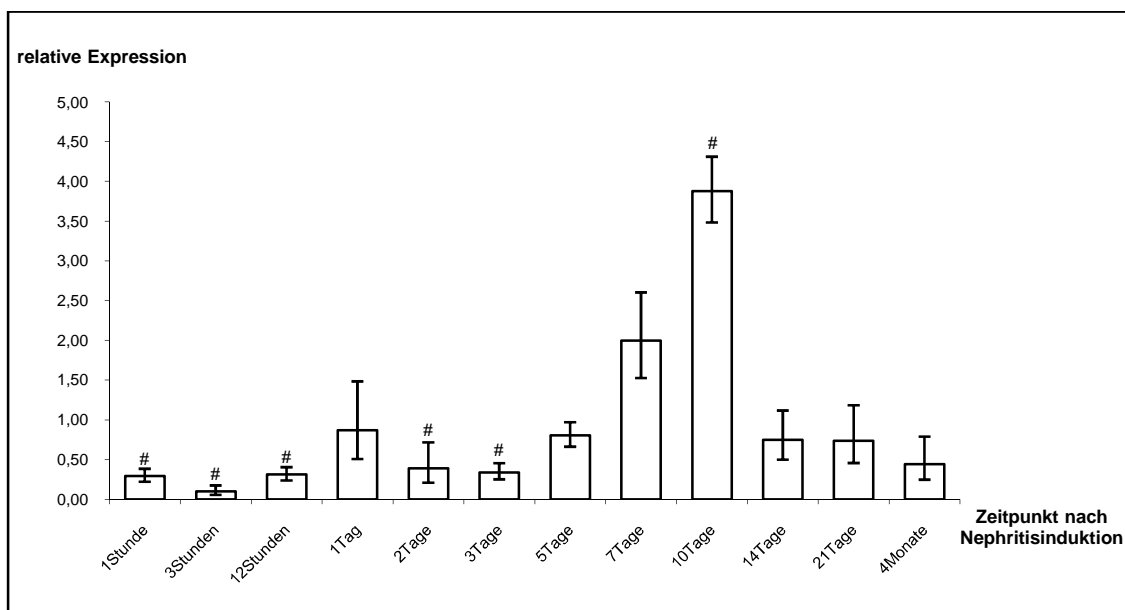
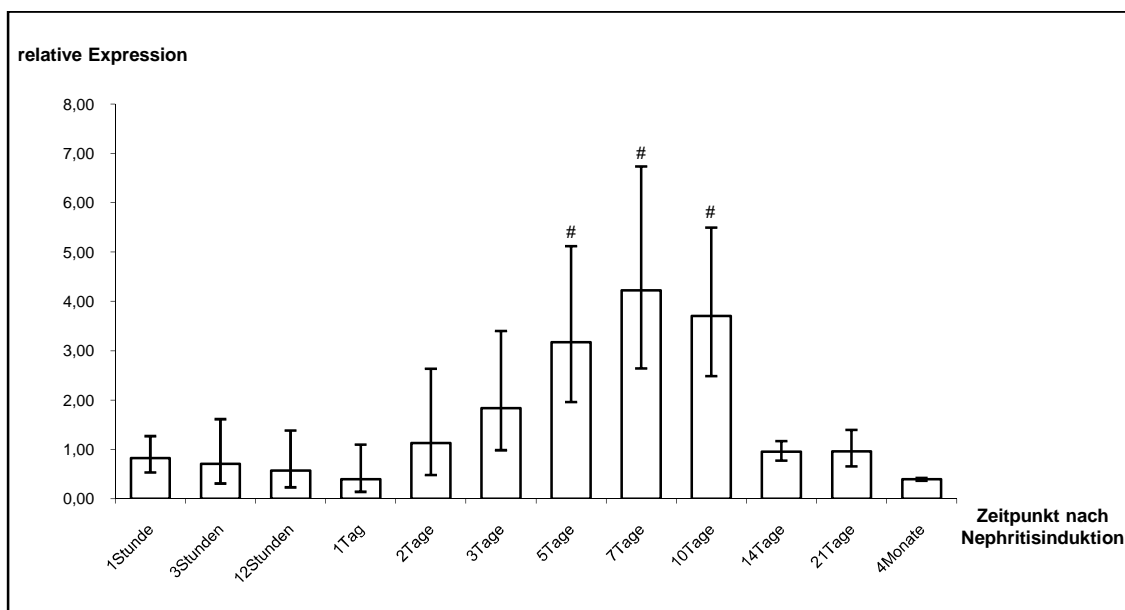


Abbildung 11
Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von MMP-9 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Nephritisinduktion.

Darstellung als x-faches der Ausgangssituation (relative Expression); # = $p < 0,05$ gegenüber Ausgangssituation; $n = 4$.

Im initialen Kurvenverlauf prädisponiert zunächst eine signifikante Reduktion glomerulärer mRNA Expression. Innerhalb der ersten 12 Stunden sind gegenüber der Ausgangslage verminderte Expressionen von 29% (1Stunde), 10% (3Stunden) und 31% (12Stunden) zu vermerken. Eine kurzzeitig zu verzeichnende Expressionssteigerung auf 0,87 während des 1.Tages hebt sich gegenüber den Tagen 2 und 3 ($rE_{ATS2,3Tage} 0,39; 0,34$) unsignifikant ab. Während der nun anschließenden Messpunkte 7 und 10Tage erfolgt ein Expressionsanstieg auf ein 2- (Tag 7) bzw. 3,88faches (Tag 10) gegenüber der Ausgangslage. Diese signifikante Expressionssteigerung währt jedoch darüber hinaus nicht mehr zu den Tagen 14 und 21 ($rE_{ATS14,21Tage} 0,74; 0,75$). Der 4 Monatswert zeigt gegenüber der Ausgangssituation mit 44%iger Expression einen reduzierten Wert.

3.1.7 Kollagen IV

**Abbildung 12**

Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von Kollagen IV zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Nephritisinduktion.

Darstellung als x-faches der Ausgangssituation (relative Expression); # = $p < 0,05$ gegenüber Ausgangssituation; $n = 4$.

Über einen Zeitraum von einem Tag – während der Messzeitpunkte 1, 3, 12 und 24 Stunden – zeigt sich zunächst eine unsignifikante Reduktion relativer Expressionswerte ($rE_{ATS1,3,12,24\text{Stunden}}$ 0,83; 0,71; 0,57 ; 0,40). Diesem Trend geringer, aber kontinuierlicher Deszension über 24 Stunden schließt sich zu dem Zeitpunkt 2 Tage ein Anstieg glomerulärer mRNA Expression für Kollagen IV an. Hierbei ist zunächst zum Zeitpunkt 2 Tage ein Expressionswert von 113% gegenüber der Ausgangssituation zu verzeichnen. Über die folgenden Messzeitpunkte 3 ($rE_{ATS3\text{Tag}}$ 1,83) und 5 Tage ($rE_{ATS5\text{Tag}}$ 3,17) gipfelt die Expressionssteigerung zu Tag 7 in einem Maximum glomerulärer Expression von Kollagen IV ($rE_{ATS7\text{Tag}}$ 4,22). Nach einer bereits zu Tag 10 zu registrierenden Expressionsreduktion ($rE_{ATS10\text{Tag}}$ 3,70), zeigt sich an Tag 14 und 21 ein Expressionsniveau ähnelnd der Ausgangssituation ($rE_{ATS14,21\text{Tag}}$ 0,95; 0,96). Der Messwert der 4 Monatsermittlung weist schlussendlich mit einer relativen Expression von 0,39 eine Minderexpression Kollagen IV vermittelnder mRNA auf.

3.1.8 Stromal cell derived factor-1a/ CXCL12

Im quantitativen Nachweis des Chemokins Stromal cell derived factor-1 (SDF-1) prädisponiert über einen Zeitraum von einem Tag zunächst dessen glomeruläre Minderexpression. Hierbei zeigen sich signifikant reduzierte Expressionen zwischen dem 0,25 und 0,41fachen der Ausgangssituation. Zu den Tagen 2, 3 und 5 lässt sich - chronologisch folgend - ein langsamer Expressionsanstieg verzeichnen ($rE_{ATS2,3,Tag} 0,69; 0,78$), der zu Tag 5 schließlich der Ausgangssituation ähnelt ($rE_{ATS5Tag} 0,97$). Zu Tag 7 protrahiert sich dieser Anstieg mit einem relativen Expressionswert von 1,42, um ein Maximum relativer Expression zu Tag 10 – mit einer Expression von 3,81 - zu erreichen. Tag 14 und 21 weisen mit 2,82facher Expression gegenüber der Ausgangslage eine Art Expressionsplateau auf. Zu dem Messpunkt 4 Monate sind die Expressionslevel für das Chemokin SDF-1a noch immer/ erneut - mit einer relativen Expression von 1,94 – unsignifikant, erhöht.

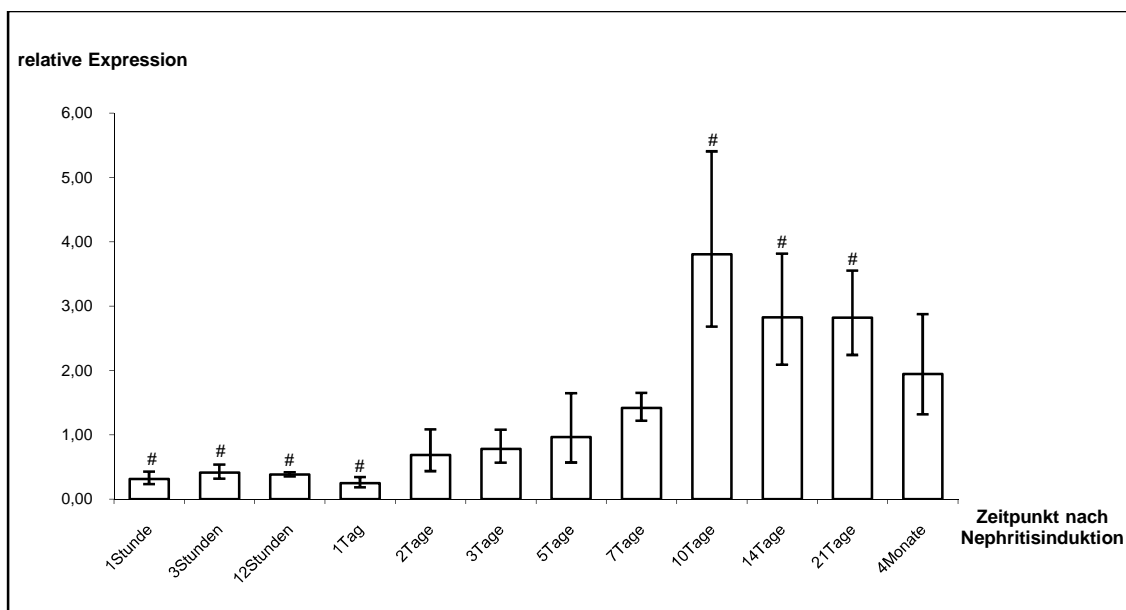


Abbildung 13

Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von SDF-1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Nephritisinduktion.

Darstellung als x-faches der Ausgangssituation (relative Expression); # = $p < 0,05$ gegenüber Ausgangssituation; $n = 4$.

3.1.9 CXCR4

Nach einer anfänglich signifikanten Mindereexpression mit Werten zwischen 0,35 und 0,46 zu den Zeitpunkten 1, 3 und 12 Stunden, lässt sich zu den nachfolgenden Zeitpunkten 1, 2 und 3 Tagen ein Anstieg des glomerulären Expressionsniveaus verzeichnen ($rE_{ATS1,2,3Tage}$ 0,72; 1,07; 1,58). Dieses weist nicht nur in seinem Verlauf Progredienz auf, sondern überschreitet auch die Ausgangssituation bis um ein signifikant 1,58faches (3Tage). Die Zeitpunkte 5 und 7 Tage sind gekennzeichnet durch ihr erneutes Annähern an die Ausgangssituation mit relativen Expressionswerten von 1,16 und 1,03. Nach einer signifikanten Expressionssteigerung zum Zeitpunkt 10 Tage ($rE_{ATS10Tage}$ 1,74) ist ein erhöhtes Expressionsniveau auch zum Zeitpunkt 14Tage ($rE_{ATS14Tage}$ 1,38) zu verzeichnen, bevor die relativen Expressionen sich denjenigen der Ausgangssituation zum Zeitpunkt 21Tage ($rE_{ATS21Tage}$ 0,98) und 4Monate ($rE_{ATS4Monate}$ 0,93) angleichen.

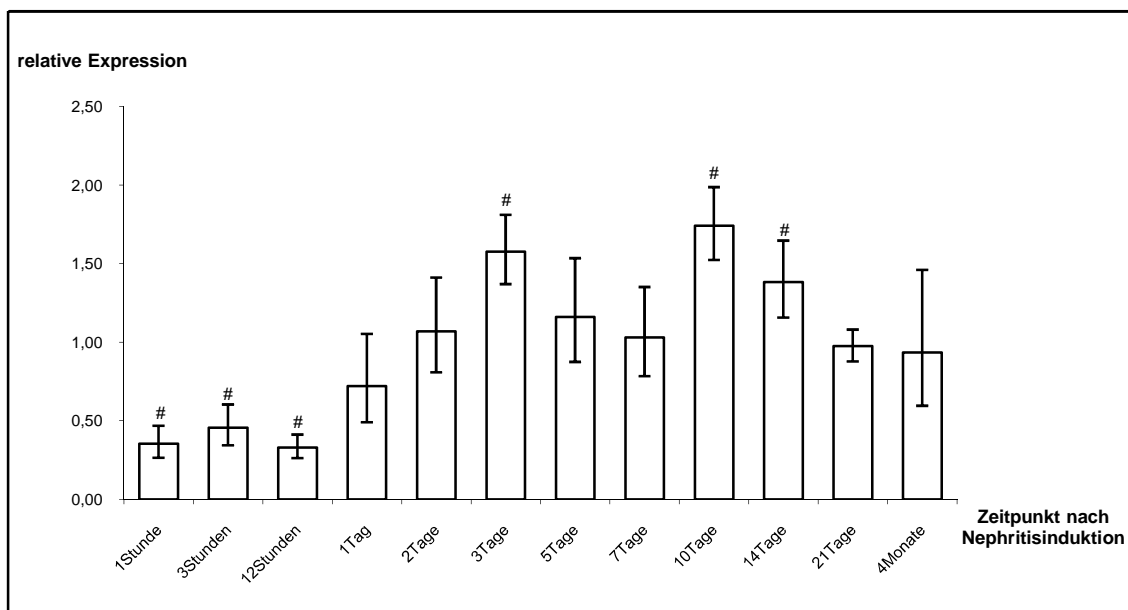


Abbildung 14
Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von CXCR4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Nephritisinduktion.

Darstellung als x-faches der Ausgangssituation (relative Expression); # = $p < 0,05$ gegenüber Ausgangssituation; $n = 4$.

3.2 Die Resolutionsphase unter CXCR4 antagonistischer Behandlung

Gemäß dem in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Versuchsaufbau sind in diesem Teil der Arbeit verschiedene Untersuchungszeitpunkte zu 10, 14 und 21 Tagen nach Nephritisinduktion angesetzt. Im Gegensatz zu Kapitel 3.1 sind den verschiedenen Untersuchungszeiten eigene Kontrolltiergruppen zugeordnet.

So gewähren die gewählten Zeitpunkte auf mRNA- Ebene die Möglichkeit einer expressionsorientierten Differenzierung zwischen nephritischen, sowie nephritischen und AMD3100 behandelten Versuchstieren. Die Darstellung erfolgt hierbei als relative Expressionsanalyse gegenüber nierengesunden Versuchstieren.

Auf zellulärer Ebene kann demgegenüber mittels immunhistologischer Analyse zwischen nierengesunden, nephritischen, sowie nephritisch - AMD3100 behandelten Versuchstiergruppen unterschieden werden.

Unter Behandlung mit dem CXCR4 Chemokinrezeptorenblocker AMD3100 muss im Folgenden entsprechend der Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 differenziert werden zwischen einer präventiven - mit Nephritisinduktion begonnenen - und einer interventionellen – zu Tag 5 nach Nephritisinduktion - begonnenen Therapie.

3.2.1 Ergebnisse einer präventiven Behandlung mit AMD3100

In diesem Versuchsteil präventiver Chemokinrezeptorenblockade erfolgt eine subzelluläre und zelluläre Ergebnisanalyse unter Behandlung mit dem CXCR4 Antagonisten AMD3100. Der Zeitpunkt der Nephritisinduktion spiegelt unter präventiver Behandlung den Beginn der zehntägigen chemokinrezeptorenantagonistischen Behandlung wieder.

3.2.1.1 Chemokin-/ Zytokinanalyse

Dargestellt sei in Abbildung 15 ein direkter Vergleich der relativen Expressionswerte nephritischer Kontrolltiere mit nephritischen Versuchstieren unter präventiver Therapie mit AMD3100. Von Interesse sei hierbei das Expressionsverhalten des Chemokinrezeptors CXCR4, der Chemokine SDF-1 und MCP-1, sowie des Zytokins TGF- β .

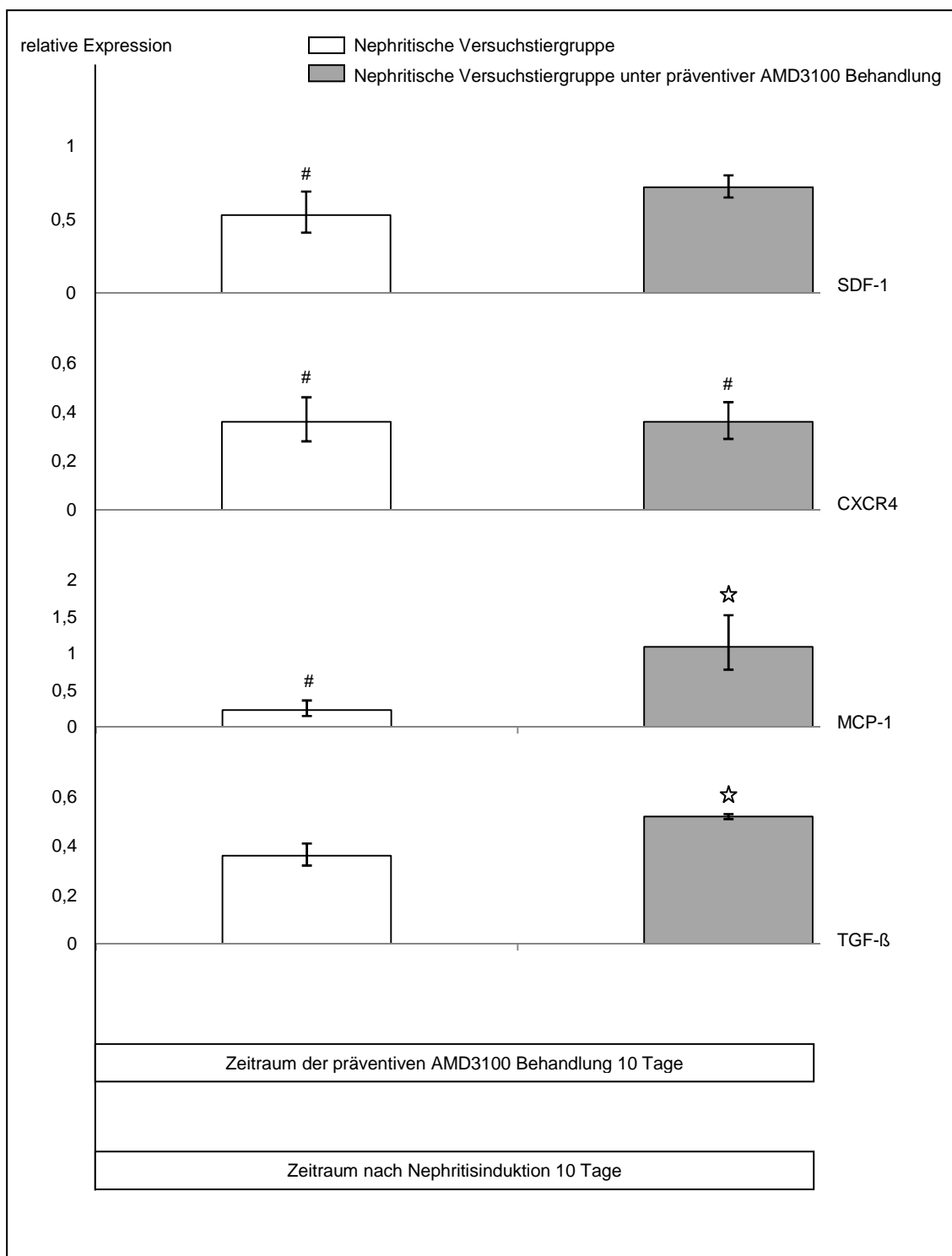


Abbildung 15

Vergleichende quantitative mRNA-Expressionsanalyse zu dem Zeitpunkt 10 Tage nach Nephritisinduktion unter präventiver Behandlung mit AMD3100. Die AMD3100 Applikationsperiode erstreckt sich über einen Zeitraum der Tage 0 bis 10 nach Nephritisinduktion. Dargestellt sind die relativen Expressionsergebnisse des Chemokinrezeptors CXCR4, der Chemokine SDF-1 und MCP-1, sowie des Zytokins TGF-β

Expressionsdarstellung als x-faches nierengesunder Tiere (relative Expression); # = $p < 0,05$: signifikante Expressionsdivergenz gegenüber nichtnephritischen Tieren; ☆ = $p < 0,05$: signifikante Expressionsdivergenz zwischen nephritischen Versuchstieren unter präventiver AMD3100 Behandlung und nephritischen Kontrolltieren; Versuchsgruppentierzahl $n = 4$.

3.2.1.1.1 Expressionsanalyse des Chemokins SDF-1

Gemäß Abbildung 15 ist bei nephritischen Versuchstieren an Tag 10 nach Nephritisinduktion eine Reduktion glomerulärer mRNA- Expression für das Chemokin SDF-1 zu verzeichnen ($rE_{ATS10Tag} 0,53$).

10 Tage nach Applikation mesangiolytischer Anti- Thy- 1 Antikörper ist unter präventiver Behandlung mit AMD3100 ebenfalls ein Rückgang glomerulärer Expression für das Chemokin SDF-1 zu detektieren. Dieser äußert sich in einer 0,72fachen relativen Expression.

3.2.1.1.2 Expressionsanalyse des Chemokinrezeptors CXCR4

Gemäß Abbildung 15 ist bei nephritischen Versuchstieren an Tag 10 nach Nephritisinduktion eine signifikante Reduktion glomerulärer mRNA- Expression für den Chemokinrezeptor CXCR4 zu verzeichnen ($rE_{ATS10Tag} 0,36$).

Präventiv mit AMD3100 behandelte Versuchstiere weisen an Tag 10 nach Nephritisinduktion gleichfalls signifikant reduzierte Expressionswerte von 0,36 für den Chemokinrezeptor CXCR4 auf.

3.2.1.1.3 Expressionsanalyse des Chemokins MCP-1

Gemäß Abbildung 15 ist an Tag 10 nach Nephritisinduktion bei nephritischen Versuchstieren eine signifikante Reduktion glomerulärer mRNA- Expression für das Chemokin MCP-1 zu verzeichnen ($rE_{ATS10Tag} 0,23$).

Unter einer präventiven Behandlung mit AMD3100 weisen demgegenüber nephritische Tiere eine glomeruläre Präsenz für MCP-1 ähnlich nierengesunder Tiere auf ($rE_{ATS10Tag+AMD10Tag} 1,09$).

Unter präventiver Behandlung mit AMD3100 bestehen gegenüber lediglich nephritischen Versuchstieren signifikante Divergenzen in der glomerulären Expression des Chemokins MCP-1.

3.2.1.1.4 Expressionsanalyse des Zytokins TGF- β

Gemäß Abbildung 15 ist an Tag 10 nach Nephritisinduktion bei nephritischen Versuchstieren eine Reduktion glomerulärer mRNA- Expression für das Zytokin TGF- β zu verzeichnen ($rE_{ATS10Tag} 0,36$).

Zu selbigem Untersuchungszeitpunkt weisen präventiv mit AMD3100 behandelte Versuchstiere eine relative TGF- β Expressionsreduktion von 0,52 auf.

Unter präventiver Behandlung mit AMD3100 bestehen gegenüber lediglich nephritischen Versuchstieren signifikante Divergenzen in der glomerulären Expression des Chemokins TGF- β .

3.2.1.2 Histologische Ergebnisanalyse

Für die histologische Analyse wurden immunhistologische Färbungen für Monozyten/Makrophagen (CD68), T- Lymphozyten (CD3) und B- Lymphozyten (CD 79) vorgenommen.

Zu dem angesetzten Messzeitpunkt werden für jeden Vertreter der jeweiligen Versuchsgruppe 30 Glomeruli nach einer glomerulären und periglomerulären Zellinfiltration untersucht. Darüber hinaus werden pro Versuchsgruppe 15 Gesichtsfelder nach einem interstitiellen Auftreten des jeweilig nachzuweisenden Entzündungszelltyp analysiert.

Untersucht werden sollen im Folgenden die verschiedenen Versuchstiergruppen zu dem Zeitpunkt 10 Tage nach Nephritisinduktion.

Die Versuchsgruppen umfassen zu diesem Zeitpunkt nierengesunde, nephritische, sowie nephritische und präventiv AMD3100 behandelte Versuchstiergruppen.

3.2.1.2.1 Immunhistologischer Nachweis von Monozyten/ Makrophagen

Dem immunhistologischen Nachweis von Monozyten/ Makrophagen dient das zelluläre Antigen CD68.

Gemäß Tabelle 1 ist bei den verschiedenen Versuchsgruppen zu einem Zeitpunkt 10 Tage nach Nephritisinduktion in keinem der untersuchten renokortikalen Kompartimente eine signifikant erhöhte Monozyten-/ Makrophageninfiltration nachzuweisen.

Monozyten/ Makrophagen (CD68)	
Intraglomeruläre Infiltration	
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,03±0,02
Nephritische VT (NVT)	0,03±0,03
NVT unter präventiver Behandlung mit AMD3100	0,07±0,05
Periglomeruläre Infiltration	
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,12±0,10
Nephritische VT (NVT)	0,09±0,06
NVT unter präventiver Behandlung mit AMD3100	0,17±0,16
Interstitielle Infiltration	
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,11±0,09
Nephritische VT (NVT)	0,11±0,07
NVT unter präventiver Behandlung mit AMD3100	0,12±0,11

Tabelle 1

Tabellarische Darstellung des immunhistologischen Nachweises der Gewebeeinfiltration von Monozyten/Makrophagen (CD68) bei nierengesunden Versuchstieren (VT), nephritischen Versuchstieren (NVT) und nephritischen Versuchstieren (NVT) unter präventiver Behandlung mit AMD3100.

Dargestellt sind Mittelwert (pro Glomerulum) und Standardabweichung der Zählung glomerulärer, periglomerulärer und interstitieller Entzündungszellen. Ausgezählt wurden zu jedem Zeitpunkt pro Versuchstier (n=4) 30 Glomeruli (glomerulär/periglomerulär) bzw. 15 Gesichtsfelder (interstitiell) bei 40facher Auflösung. # = Signifikantes Ergebnis gegenüber der Kontrolltiergruppe mit $p < 0,05$.

3.2.1.2.2 Immunhistologischer Nachweis von T- Lymphozyten

Dem immunhistologischen Nachweis von T- Lymphozyten dient das zelluläre Pan- T-Lymphozytenantigen CD3.

Gemäß Tabelle 2 ist an Tag 10 nach Nephritisinduktion bei nephritischen Versuchstieren eine signifikant erhöhte T- Lymphozytenpersistenz im periglomerulären Nierengewebe nachzuweisen. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt zeigen nephritische Tiere unter präventiver Behandlung mit AMD3100 keine signifikante Infiltrationssteigerung für T- Lymphozyten auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Versuchsgruppen ist jedoch nicht zu verzeichnen.

T- Lymphozyten (CD3)	
Intraglomeruläre Infiltration	
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,16±0,12
Nephritische VT (NVT)	0,20±0,07
NVT unter präventiver Behandlung mit AMD3100	0,17±0,12
Periglomeruläre Infiltration	
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,23±0,20
Nephritische VT (NVT)	0,62±0,23 #
NVT unter präventiver Behandlung mit AMD3100	0,48±0,18
Interstitielle Infiltration	
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	1,07±0,87
Nephritische VT (NVT)	1,02±0,80
NVT unter präventiver Behandlung mit AMD3100	0,95±0,85

Tabelle 2

Tabellarische Darstellung des immunhistologischen Nachweises der Gewebeeinfiltration von T- Lymphozyten (CD3) bei nierengesunden Versuchstieren (VT), nephritischen Versuchstieren (NVT) und nephritischen Versuchstieren (NVT) unter präventiver Behandlung mit AMD3100.

Dargestellt sind Mittelwert (pro Glomerulum) und Standardabweichung der Zählung glomerulärer, periglomerulärer und interstitieller Entzündungszellen. Ausgezählt wurden zu jedem Zeitpunkt pro Versuchstier (n=4) 30 Glomeruli (glomerulär/periglomerulär) bzw. 15 Gesichtsfelder (interstitiell) bei 40facher Auflösung. # = Signifikantes Ergebnis gegenüber der Kontrolltiergruppe mit $p < 0,05$.

3.2.1.2.3 Immunhistologischer Nachweis von B- Lymphozyten

Der immunhistologische von Nachweis von B- Lymphozyten erfolgt durch das zelluläre Antigen CD79.

Gemäß Tabelle 3 sind zu einem Zeitpunkt 10 Tage nach Nephritisinduktion in den untersuchten renokortikalen Kompartimenten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Infiltration von B- Lymphozyten nachzuweisen.

B- Lymphozyten (CD79)	
Intraglomeruläre Infiltration	
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,04±0,03
Nephritische VT (NVT)	0,06±0,04
NVT unter präventiver Behandlung mit AMD3100	0,03±0,02
Periglomeruläre Infiltration	
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,04±0,03
Nephritische VT (NVT)	0,03±0,02
NVT unter präventiver Behandlung mit AMD3100	0,03±0,02
Interstitielle Infiltration	
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,03±0,02
Nephritische VT (NVT)	0,04±0,03
NVT unter präventiver Behandlung mit AMD3100	0,02±0,02

Tabelle 3

Tabellarische Darstellung des immunhistologischen Nachweises der Gewebeeinfiltration von B- Lymphozyten (CD79) bei nierengesunden Versuchstieren (VT), nephritischen Versuchstieren (NVT) und nephritischen Versuchstieren (NVT) unter präventiver Behandlung mit AMD3100.

Dargestellt sind Mittelwert (pro Glomerulum) und Standardabweichung der Zählung glomerulärer, periglomerulärer und interstitieller Entzündungszellen. Ausgezählt wurden zu jedem Zeitpunkt pro Versuchstier (n=4) 30 Glomeruli (glomerulär/periglomerulär) bzw. 15 Gesichtsfelder (interstitiell) bei 40facher Auflösung. # = Signifikantes Ergebnis gegenüber der Kontrolltiergruppe mit p<0,05.

3.2.2 Ergebnisse einer interventionellen Behandlung mit AMD3100

In diesem Versuchsteil interventioneller Chemokinrezeptorenblockade erfolgt eine subzelluläre und zelluläre Ergebnisanalyse unter Behandlung mit dem CXCR4 Antagonisten AMD3100.

3.2.2.1 Chemokin-/ Zytokinanalyse

Dargestellt sei in Abbildung 16 ein direkter Vergleich der relativen Expressionswerte ausschließlich nephritischer Versuchstiere mit nephritischen Versuchstieren unter interventioneller AMD3100 Therapie. Von Interesse sei hierbei das Expressionsverhalten des Chemokinrezeptors CXCR4, der Chemokine SDF-1 und MCP-1, sowie des Zytokins TGF- β .

Die Darstellung erfolgt als Verlaufsanalyse zu den Zeitpunkten 10, 14 und 21 Tage nach Nephritisinduktion. Die AMD3100 Applikationsperiode erstreckt sich über einen Zeitraum der Tage 5 bis 10 zu dem Untersuchungszeitpunkt 10 Tage nach Nephritisinduktion, der Tage 5 bis 14 zu dem Untersuchungszeitpunkt 14 Tage nach Nephritisinduktion, und der Tage 5 bis 14 zu dem Untersuchungszeitpunkt 21 Tage nach Nephritisinduktion.

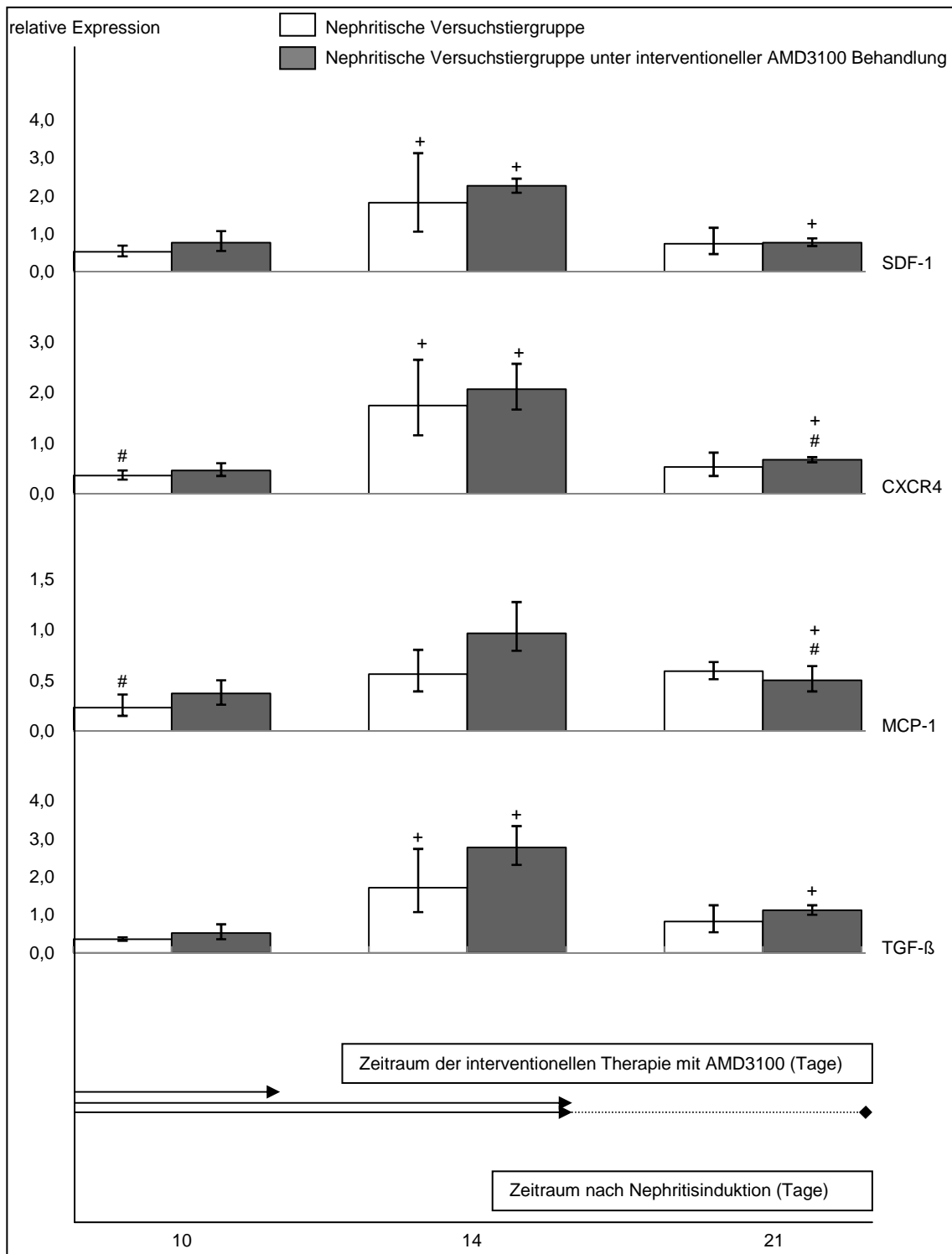


Abbildung 16

Vergleichende quantitative m-RNA Expressionsanalyse für den Chemokinrezeptor CXCR4, die Chemokine SDF-1 und MCP-1, sowie das Zytokin TGF- β unter interventioneller Behandlung mit AMD3100. Die Darstellung erfolgt als Verlaufsanalyse zu den Zeitpunkten 10, 14 und 21 Tage nach Nephritisinduktion. Die AMD3100 Applikationsperiode erstreckt sich über einen Zeitraum der Tage 5-10 (Untersuchungszeitpunkt Tag 10 nach Nephritisinduktion), 5-14 (Untersuchungszeitpunkt Tag 14 nach Nephritisinduktion) und 5-14 (Untersuchungszeitpunkt Tag 21 nach Nephritisinduktion) nach Nephritisinduktion.

Expressionsdarstellung als x-faches nierengesunder Tiere (relative Expression); # = $p < 0,05$: signifikante Expressionsdivergenz gegenüber nichtnephritischen Tieren; + = $p < 0,05$: signifikante Gruppenexpressionsdivergenz zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten; Versuchsgruppentierzahl $n = 4$.

3.2.2.1.1 Expressionsanalyse des Chemokins SDF-1

Gemäß Abbildung 16 ist bei nephritischen Versuchstieren an Tag 10 nach Nephritisinduktion eine Reduktion glomerulärer mRNA- Expression für das Chemokin SDF-1 zu verzeichnen ($rE_{ATS10\text{Tage}} 0,53$). Nephritische Tiere unter interventioneller Therapie mit AMD3100 weisen zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung relative Expressionen von 0,77 auf.

Der Zeitpunkt 14 Tage nach Anti- Thy-1 Antikörperapplikation prädisponiert bei nephritischen Versuchstieren durch eine 1,82fach erhöhte Expression für das Chemokin SDF-1 gegenüber nierengesunden Tieren. Nephritische Tiere unter CXCR4 antagonistischer Behandlung unterscheiden sich durch eine relative glomeruläre SDF-1 Expression von 2,26.

Zu einem Zeitpunkt 21 Tage nach Mesangiolyse ist bei nephritischen Versuchstieren eine Expressionsreduktion von 0,74 zu dokumentieren. Unter Therapie mit AMD3100 ist eine Expressionsreduktion von 0,77 zu verzeichnen. Im Vergleich der Gruppenexpressionen differenter Zeitpunkte weisen nephritische Tiere der Tage 10 und 14 signifikanten Expressionsunterschiede auf.

Unter interventioneller AMD3100 Behandlung sind zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikante Gruppenexpressionsunterschiede zu verzeichnen.

3.2.2.1.2 Expressionsanalyse des Chemokinrezeptors CXCR4

Gemäß Abbildung 16 ist bei nephritischen Versuchstieren an Tag 10 nach Nephritisinduktion eine signifikante Reduktion glomerulärer mRNA- Expression für den Chemokinrezeptor CXCR4 zu verzeichnen ($rE_{ATS10\text{Tage}} 0,36$). Nephritische Tiere unter interventioneller Therapie mit AMD3100 weisen zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung relative Expressionen von 0,46 auf.

Der Zeitpunkt 14 Tage nach Anti- Thy-1 Antikörperapplikation prädisponiert bei nephritischen Versuchstieren durch eine 1,74fach erhöhte Expression gegenüber nierengesunden Tieren. Nephritische Tiere unter CXCR4 antagonistischer Behandlung unterscheiden sich durch eine relative glomeruläre CXCR4 Expression von 2,06.

Zu einem Zeitpunkt 21 Tage nach Mesangiolyse ist bei der nephritischen Versuchsgruppe eine erneute Expressionsreduktion von 0,52 zu

dokumentieren. Unter Therapie mit AMD3100 ist eine signifikante Expressionsreduktion für CXCR4 von 0,67 zu verzeichnen.

Im Vergleich der Gruppenexpressionen differenter Zeitpunkte weisen nephritische Tiere der Tage 10 und 14 signifikanten Expressionsunterschiede auf.

Unter interventioneller AMD3100 Behandlung sind zu allen Untersuchungszeitpunkten gleicher Behandlung signifikante Gruppenexpressionsunterschiede zu verzeichnen.

3.2.2.1.3 Expressionsanalyse des Chemokins MCP-1

Gemäß Abbildung 16 ist bei nephritischen Versuchstieren an Tag 10 nach Nephritisinduktion eine signifikante Reduktion glomerulärer mRNA- Expression für das Chemokin MCP-1 zu verzeichnen ($rE_{ATS10\text{Tag}}0,23$). Nephritische Tiere unter interventioneller Therapie mit AMD3100 weisen zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung relative Expressionen von 0,37 auf.

Der Zeitpunkt 14 Tage nach Anti- Thy-1 Antikörperapplikation prädisponiert bei nephritischen Versuchstieren durch eine 0,56fach reduzierte Expression für MCP-1 gegenüber nierengesunden Tieren. Nephritische Tiere unter CXCR4 antagonistischer Behandlung unterscheiden sich durch eine relative glomeruläre MCP-1 Expression von 0,96.

21 Tage nach mesangiolytischer Initiation ist bei der nephritischen Versuchsgruppe eine Expressionsreduktion von 0,59 zu dokumentieren. Unter Therapie mit AMD3100 ist eine signifikante Expressionsreduktion von 0,50 zu verzeichnen.

Unter einem gleichen interventionellen Behandlungszeitraum mit AMD3100 ist ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Tagen 14 und 21 nach Nephritisinduktion zu beschreiben.

3.2.2.1.4 Expressionsanalyse des Zytokins TGF- β

Gemäß Abbildung 16 ist bei nephritischen Versuchstieren an Tag 10 nach Nephritisinduktion eine signifikante Reduktion glomerulärer mRNA- Expression für das Zytokin TGF- β zu dokumentieren ($rE_{ATS10\text{Tag}}0,36$). Nephritische Tiere unter interventioneller Therapie mit AMD3100 weisen zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung relative Expressionen von 0,52 auf.

Nephritische Tiere zu einem Zeitpunkt 14 Tage nach Anti- Thy-1 Antikörperapplikation prädisponieren durch eine 1,71fach erhöhte relative Expression für TGF- β . Nephritische Tiere unter CXCR4 antagonistischer Behandlung unterscheiden sich durch eine relative glomeruläre TGF- β Expression von 2,77.

Zu einem Zeitpunkt 21 Tage nach Mesangiolyse ist bei der nephritischen Versuchsgruppe eine Expressionsreduktion zu dokumentieren ($rE_{ATS21\text{Tage}}$ 0,82). Unter interventioneller Therapie mit AMD3100 ist eine signifikante Expressionserhöhung von 1,12 zu verzeichnen.

Im Vergleich der Gruppenexpressionen differenter Zeitpunkte weisen nephritische Tiere der Tage 10 und 14 signifikanten Expressionsunterschiede auf.

Unter interventioneller AMD3100 Behandlung sind zu allen Untersuchungszeitpunkten gleicher Behandlung signifikante Gruppenunterschiede zu verzeichnen.

3.2.2.2 Histologische Ergebnisanalyse

Für die histologische Analyse wurden immunhistologische Färbungen für Monozyten/Makrophagen (CD68), T- Lymphozyten (CD3) und B- Lymphozyten (CD 79) vorgenommen.

Zu den angesetzten Messzeitpunkten werden für jeden Vertreter der jeweiligen Versuchsgruppe 30 Glomeruli nach einer glomerulären und periglomerulären Zellinfiltration untersucht. Darüber hinaus werden pro Versuchsgruppe 15 Gesichtsfelder nach einem interstitiellen Auftreten des jeweilig nachzuweisenden Entzündungszelltyps untersucht.

Näher analysiert werden sollen im Folgenden die verschiedenen Versuchstiergruppen zu den Zeitpunkten 10 und 14 Tage nach Nephritisinduktion.

Die Versuchsgruppen umfassen zu diesen Zeitpunkten nierengesunde, nephritische, sowie nephritische und interventionell AMD3100 behandelte Versuchstiergruppen.

3.2.2.2.1 Immunhistologischer Nachweis von Monozyten/ Makrophagen

Der immunhistologische Nachweis von Monozyten/ Makrophagen erfolgt durch das zelluläre Antigen CD68.

Gemäß Tabelle 4 sind an Tag 10 und 14 nach Nephritisinduktion in den verschiedenen Versuchsgruppen zu keinem Zeitpunkt der histomorphologischen Untersuchung Unterschiede in der Infiltration von Monozyten/ Makrophagen in den betrachteten renokortikaler Arealen nachzuweisen.

Monozyten/ Makrophagen (CD68)		
Intraglomeruläre Infiltration		
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage	14Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,03±0,02	0,01±0,01
Nephritische VT (NVT)	0,03±0,03	0,04±0,03
NVT unter interventioneller Behandlung mit AMD3100	0,07±0,06	0,06±0,04
Periglomeruläre Infiltration		
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage	14Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,12±0,10	0,06±0,05
Nephritische VT (NVT)	0,09±0,06	0,07±0,05
NVT unter interventioneller Behandlung mit AMD3100	0,19±0,02	0,06±0,04
Interstitielle Infiltration		
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage	14Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,11±0,09	0,14±0,06
Nephritische VT (NVT)	0,11±0,07	0,13±0,11
NVT unter interventioneller Behandlung mit AMD3100	0,19±0,10	0,16±0,07

Tabelle 4

Tabellarische Darstellung des immunhistologischen Nachweises der Gewebeeinfiltration von Monozyten/Makrophagen (CD68) bei nierengesunden Versuchstieren (VT), nephritischen Versuchstieren (NVT) und nephritischen Versuchstieren (NVT) unter präventiver Behandlung mit AMD3100.

Dargestellt sind Mittelwert (pro Glomerulum) und Standardabweichung der Zählung glomerulärer, periglomerulärer und interstitieller Entzündungszellen. Ausgezählt wurden zu jedem Zeitpunkt pro Versuchstier (n=4) 30 Glomeruli (glomerulär/periglomerulär) bzw. 15 Gesichtsfelder (interstitiell) bei 40facher Auflösung. # = Signifikantes Ergebnis gegenüber der Kontrolltiergruppe mit p<0,05.

3.2.2.2.2 Immunhistologischer Nachweis von T- Lymphozyten

Dem immunhistologischen Nachweis von T- Lymphozyten dient das zelluläre Pan- T- Lymphozytenantigen CD3.

Gemäß Tabelle 5 ist in der histologischen Auswertung zu einem Zeitpunkt von 10 Tagen nach Nephritisinduktion eine signifikant erhöhte periglomeruläre T- Lymphozyteninfiltration bei nephritischen und nephritischen Versuchstieren unter interventioneller AMD3100 Behandlung nachzuweisen. In selbigen Versuchsgruppen ist in periglomerulären Kompartimenten zu dem Zeitpunkt 14 Tage nach Nephritisinduktion ebenfalls eine – wenn auch auf unsignifikantem Niveau – gering erhöhte T- Lymphozyteninfiltration zu verzeichnen.

T- Lymphozyten (CD3)		
Intraglomeruläre Infiltration		
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage	14Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,16±0,12	0,20±0,13
Nephritische VT (NVT)	0,20±0,07	0,17±0,13
NVT unter interventioneller Behandlung mit AMD3100	0,14±0,08	0,29±0,26
Periglomeruläre Infiltration		
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage	14Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,23±0,20	0,38±0,19
Nephritische VT (NVT)	0,62±0,23 #	0,56±0,14
NVT unter interventioneller Behandlung mit AMD3100	0,53±0,16 #	0,55±0,14
Interstitielle Infiltration		
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage	14Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	1,07±0,87	1,18±0,57
Nephritische VT (NVT)	1,02±0,8	0,71±0,25
NVT unter interventioneller Behandlung mit AMD3100	0,91±0,46	0,80±0,45

Tabelle 5

Tabellarische Darstellung des immunhistologischen Nachweises der Gewebeeinfiltration von T- Lymphozyten (CD3) bei nierengesunden Versuchstieren (VT), nephritischen Versuchstieren (NVT) und nephritischen Versuchstieren (NVT) unter präventiver Behandlung mit AMD3100.

Dargestellt sind Mittelwert (pro Glomerulum) und Standardabweichung der Zählung glomerulärer, periglomerulärer und interstitieller Entzündungszellen. Ausgezählt wurden zu jedem Zeitpunkt pro Versuchstier (n=4) 30 Glomeruli (glomerulär/periglomerulär) bzw. 15 Gesichtsfelder (interstitiell) bei 40facher Auflösung. # = Signifikantes Ergebnis gegenüber der Kontrolltiergruppe mit p<0,05.

3.2.2.2.3 Immunhistologischer Nachweis von B- Lymphozyten

Der immunhistologische von Nachweis von B- Lymphozyten erfolgt durch das zelluläre Antigen CD79.

Gemäß Tabelle 6 sind in den untersuchten renokortikalen Kompartimenten zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung signifikante Unterschiede bezüglich der Infiltration von B- Lymphozyten nachzuweisen.

B- Lymphozyten (CD79)		
Intraglomeruläre Infiltration		
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage	14Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,04±0,03	0,06±0,02
Nephritische VT (NVT)	0,06±0,04	0,07±0,05
NVT unter interventioneller Behandlung mit AMD3100	0,08±0,06	0,06±0,02
Periglomeruläre Infiltration		
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage	14Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,04±0,03	0,07±0,04
Nephritische VT (NVT)	0,03±0,02	0,05±0,02
NVT unter interventioneller Behandlung mit AMD3100	0,04±0,03	0,05±0,04
NVT unter interventioneller Behandlung mit AMD3100		
Interstitielle Infiltration		
Zeitpunkt nach Nephritisinduktion	10Tage	14Tage
Nierengesunde Versuchstiere (VT)	0,03±0,02	0,02±0,01
Nephritische VT (NVT)	0,04±0,03	0,04±0,03
NVT unter interventioneller Behandlung mit AMD3100	0,02±0,01	0,02±0,02

Tabelle 6

Tabellarische Darstellung des immunhistologischen Nachweises der Gewebeeinfiltration von B-Lymphozyten (CD79) bei nierengesunden Versuchstieren (VT), nephritischen Versuchstieren (NVT) und nephritischen Versuchstieren (NVT) unter präventiver Behandlung mit AMD3100.

Dargestellt sind Mittelwert (pro Glomerulum) und Standardabweichung der Zählung glomerulärer, periglomerulärer und interstitieller Entzündungszellen. Ausgezählt wurden zu jedem Zeitpunkt pro Versuchstier (n=4) 30 Glomeruli (glomerulär/periglomerulär) bzw. 15 Gesichtsfelder (interstitiell) bei 40facher Auflösung. # = Signifikantes Ergebnis gegenüber der Kontrolltiergruppe mit $p < 0,05$.

4. Diskussion

Entsprechend dem in Kapitel 3 praktizierten Vorgehen soll auch dieses Kapitel untergliedert werden. Zunächst soll hierbei eine ergebnisorientierte Diskussion der quantitativ-chronologischen Darstellung aus Teil 1 dieser Arbeit erfolgen. Der folgende Teil dieser Arbeit diskutiert die durch Verwendung des Chemokinrezeptorantagonists AMD3100 gewonnenen Ergebnisse in Zusammenhang mit dem derzeitigen Stand der Forschung.

4.1 Verlaufsdiskussion ausgewählter Chemokine, Wachstumsfaktoren und Enzyme

Neben leukozytären Zellen sind renal interstitielle und glomeruläre Zellen (Mesangiumzellen, Podozyten) zur Produktion des Chemokins Interferon (IFN) inducible protein-10 befähigt [40, 45, 106]. Durch die Arbeitsgruppe Han et al. konnte im Jahre 2003 gezeigt werden, dass die Expression von IP-10 mit der Ausbildung einer korrelierenden Proteinurie im Anti-Thy-1 Modell einhergeht [45]. IP-10 wird in diesem Zusammenhang regulatorische Funktion im Bereich der Schlitzmembran zwischen Podozytenfortsätzen zugeschrieben [46]. Ähnlich den durch diese Arbeitsgruppe beschriebenen Expressionsdaten konnte in unserem Versuchsaufbau das Expressionsverhalten von IP-10 analysiert werden. Im Gegensatz zu den hierbei analysierten Expressionsdaten – mit einer höchst zu verzeichnenden Expression an Tag 5 – konnten durch uns glomeruläre Maximallevel für das Chemokin IP-10 bereits 3 Stunden nach Nephritisinduktion registriert werden [34]. Durch dieses Expressionsmaximum mit einem 200fachen der Ausgangssituation könnte dies mit der von Han et al. unter Verwendung IP-10 neutralisierender Antikörper postulierten Exazerbation an Mesangiolyse in Verbindung stehen, somit jedoch einem konvergenten Verhalten von Proteinurie und glomerulärer IP-10 Expression widersprechen. Im Jahre 1993 wurde durch die Arbeitsgruppe Stahl et al. dem Chemokin Monocyte chemoattractant protein-1 in glomerulärer Infiltrationsvermittlung von Monozyten/ Makrophagen besondere Bedeutung zugeschrieben [119, 134]. Entsprechend der hierbei beschriebenen Expressionsdaten, lassen die gewonnenen glomerulären mRNA Expressionsdaten innerhalb der ersten

Stunden nach Nephritisinduktion einen kontinuierlichen Expressionsanstieg vermerken, um zu einem Zeitpunkt 3 Stunden nach Nephritisinduktion einen Maximalwert glomerulärer Expression aufzuweisen. Dieser äußert sich demzufolge in einer glomerulären Infiltrationsvermittlung CD68 positiver Monozyten/ Makrophagen. Über die folgenden Untersuchungszeitpunkte gehen mit sich reduzierender glomerulärer mRNA für MCP-1, ansteigende Expressionen für TGF- β einher. Dieses Verhalten unabdingbarer Korrelanz wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit in verschiedenen Ansätzen diskutiert [111, 135].

Dem ebenfalls am M/M- Rekrutierungsprozess beteiligten Chemokin RANTES wird demgegenüber während des ersten Tages im Anti- Thy- 1- Nephritismodell eine eher untergeordnete Bedeutung zuteil [93]. So zeigt dieses während der Frühphase des glomerulären M/M- Rekrutierungsprozesses über einen Zeitraum von 24 Stunden signifikant erniedrigte Expressionsdaten. Diese verzögerte Expression gegenüber MCP-1 könnte – ähnlich anderer experimenteller Nephritismodelle – einer Abhängigkeit dem jeweils sezernierenden Zelltypus unterliegen [44]. Über einen Zeitraum zwischen 2 und 7 Tagen findet auf mRNA- Ebene eine glomeruläre Expressionssteigerung für das Chemokin RANTES statt. RANTES scheint neben seiner chemotaktischen Bedeutsamkeit besonders während der glomerulär endothelialen Resolutionsphase eine wichtige Rolle zuteil zu werden [3, 107]. So könnte die in unserem Versuchsaufbau zu verzeichnende Expressionssteigerung von RANTES in ihrem zeitlichen Rahmen als Reaktion auf den vaskulären Schaden in Einklang mit beschriebenem endothelialen Stammzellhoming gesehen werden [3, 55, 107, 128].

Das Angiopoietin/ Tie Rezeptor- Liganden- System dient als Proliferationsmarker vaskulärer Resolution. So wird Angiopoietin-2 während des vaskulären Wiederherstellungsprozesses exprimiert - zu Zeiten physiologischer Entwicklungsprozesse und/ oder pathologischer Bedingungen [141, 142]. Im Gegensatz zu dem von der Arbeitsgruppe Campean et al. verzeichneten maximalen Expressionsniveau für Angiopoietin-2 an Tag 6, zeigt sich in unserem Versuchsaufbau ein Scheitelpunkt glomerulärer mRNA- Präsenz zu einem Zeitpunkt 14Tage nach Nephritisinduktion [22]. So ist zwar ab einem Zeitpunkt von 3Tagen eine kontinuierliche Aszension im Verlauf der

Angiopoietin-2 Expression zu verzeichnen, jedoch weist diese im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten eine verzögerte Tendenz auf. Ein Rückgang auf ein Expressionsniveau der Ausgangslage zeigt – entsprechend der obig beschriebenen Latenzperiode - erst ein Zeitpunkt ab 21Tage. Ursache dieser bei uns stärker zu verzeichnenden proangiogenen Reaktion könnte neben dem Ausmaß der endothelialen Schädigung die Verwendung unterschiedlicher Tiergattungen zur Klärung beitragen.

Transforming growth factor beta gilt als Paradigma profibrotischer Zytokine, dessen pathophysiologische Funktion bei Nierenerkrankungen auf den Forschungsergebnissen von Border et al. aus dem Jahre 1990 beruht [15, 17]. So wird TGF- β als bedeutendem Mediator extrazellulärer Matrixdeposition eine wichtige Rolle in verschiedenen Modellen glomerulärer Schädigung zuteil [16, 137]. So repräsentieren die von uns erlangten Ergebnisse den chronologisch funktionellen Zusammenhang zwischen TGF- β 1 und Kollagen IV- Expression auf mRNA- Ebene, der letzten Endes zu beschriebener pathognomischen Matrixakkumulation führt [56, 89, 92, 109]. In Korrelation mit der Reduktion des glomerulären TGF- β Expressionsniveaus steht die Aktivität matrixdegradierender Enzyme im Vordergrund. So können – speziell an Tag 10 - ansteigende Expressionen glomerulärer mRNA für die Matrixmetalloproteinase-9 verzeichnet werden [127].

4.2 Der CXCR4 Antagonist AMD3100 - ein Inhibitor glomerulärer Resolution?

Die Beteiligung der funktionellen Achse des Chemokinliganden-/rezeptorenpaars SDF-1/ CXCR4 ist neben dessen Expression in vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Situationen, auch im Rahmen entzündlicher Prozesse anzutreffen (s. Kap. 1).

So zeigt der erste Teil dieser Arbeit über einen Zeitraum von 10 bis einschließlich 21 Tage nach Nephritisinduktion eine signifikante Anhebung des Expressionsniveaus für das Chemokin Stromal cell derived factor-1. Eine Expressionserhöhung für dessen Rezeptor CXCR4 konnte neben einer kurzzeitigen Expressionserhöhung - 3Tage nach Nephritisinduktion – zu ähnlichen Zeitpunkten registriert werden.

Im Jahre 2004 konnte die Arbeitsgruppe Ceradini et al. beweisen, dass unter hypoxischen und / oder apoptotischen Zuständen eine direkte Korrelation

zwischen dem Grad der Hypoxie und der Expression von SDF-1 besteht [24]. Neben einer in diesem Fall durch das Zytokin Hypoxia inducible Factor- 1 (HIF-1) vermittelten Expression sind eine Vielzahl weiterer Zytokine befähigt, eine Expression von SDF-1 zu initiieren [43, 58]. Innerhalb der vergangenen Jahre mehrten sich die Hinweise einer funktionellen Bedeutung der Rezeptor-Ligandeninteraktion von SDF-1 und CXCR4 im Rahmen postläsionaler Reparaturprozesse. So konnte unter anderem in verschiedenen nephrologischen Tiermodellen der Nachweis einer SDF-1 vermittelten Mobilisation und Infiltration CXCR4 positiver Progenitor- und Stammzellen erbracht werden [39, 73, 82, 91, 126]. Speziell in Bereichen endothelialer Resolution scheint dem SDF-1/ CXCR4 Liganden- Rezeptorsystem darüber hinaus eine wichtige Rolle zuteil zu werden [24, 67, 98]. Interessanterweise wird in dem Anti- Thy- 1 Versuchsmodell während endothelialer Wiederherstellungsprozesse den induzierbaren Angiogenesefaktoren VEGF und Angiopoietin-2 eine bedeutende Funktion zugesprochen [22, 55, 81]. Eine bestehende Interaktion zu der - ebenfalls unter hypoxischen Zuständen induzierbaren - Expression von SDF-1 und dem hierbei vermittelten Infiltrationsprozess endothelialer Progenitorzellen, wäre in diesem Falle naheliegend [43, 58].

Mit Hilfe der in dieser Arbeit erarbeiteten und in Abbildung 17 dargestellten, quantitativ- chronologischen Expressionsprofile von MCP-1, SDF-1, CXCR4 und Angiopoietin-2 soll dies näher veranschaulicht werden. So zeigt sich in Korrelanz zu aszendierenden glomerulären MCP-1 Expressionsdaten eine signifikante Expressionsreduktion für das Chemokin SDF-1 und dessen Rezeptor CXCR4. Mit deszendierendem MCP-1 Expressionsverlauf und dem Übergang in funktionell glomeruläre Wiederherstellungsprozesse kann eine zeitgetreue Expressionssteigerung für SDF-1 verzeichnet werden. Die Folge einer erhöhten glomerulären SDF-1 Expression manifestiert sich in einer gesteigerten Infiltration CXCR4 positiver Zellen, deren proangiogene Fähigkeiten wiederholt beschrieben worden sind [24, 67, 98].

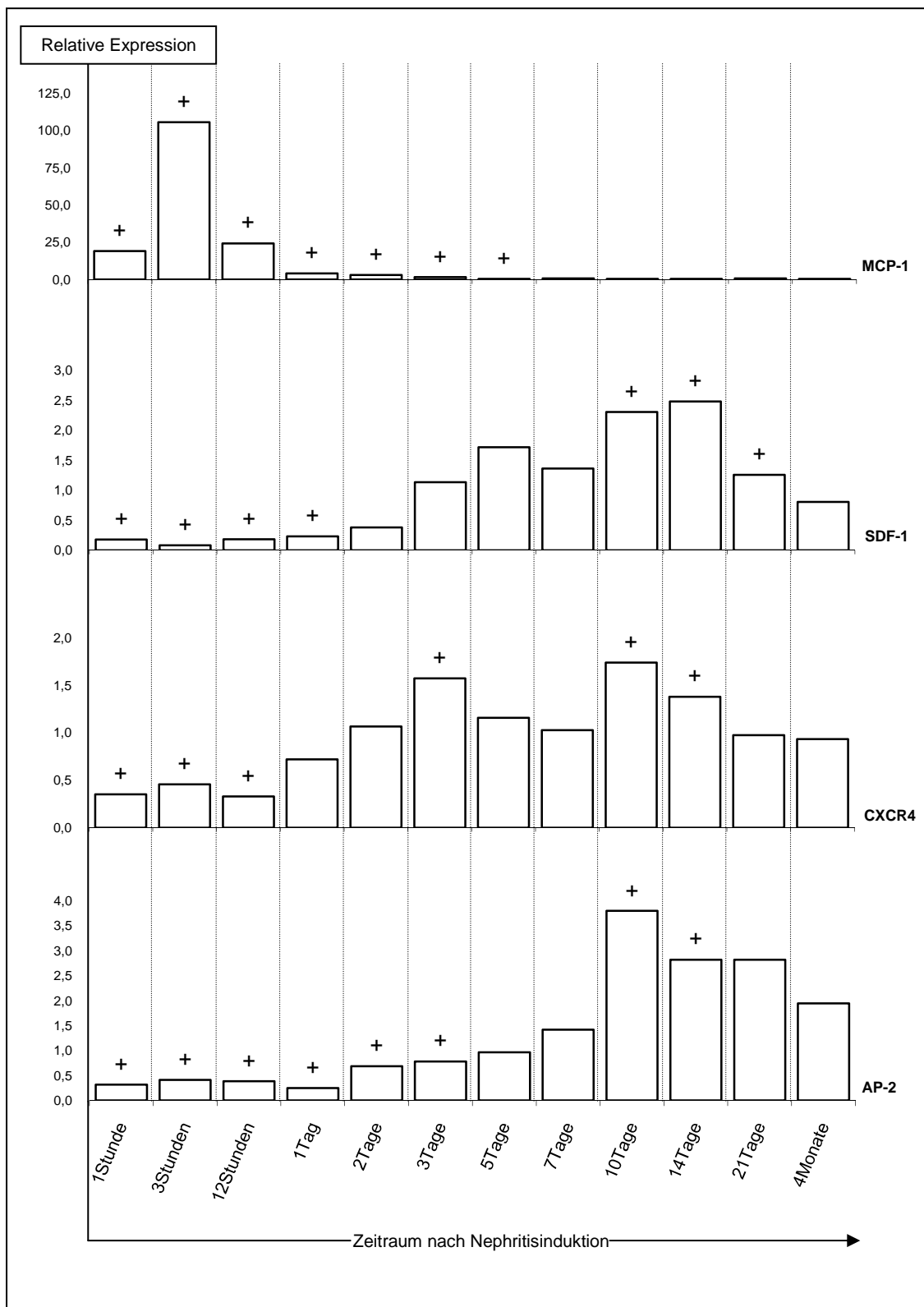


Abbildung 17
Vergleichende quantitative chronologische Expressionsanalyse glomerulärer mRNA des Chemokinrezeptors CXCR4, der Chemokine SDF-1 und MCP-1, sowie des Zytokins Angiopoietin-2 im akuteversiblen Modell der Anti- Thy-1- Glomerulonephritis.

Ein Anstieg glomerulärer mRNA für MCP-1 weist signifikante Korrelanz zu reduzierter glomerulärer SDF-1 Expression auf. Mit deszendierenden Expressionsleveln für MCP-1 kann zeitgleich ein Anstieg glomerulärer SDF-1 Expression verzeichnet werden, deren Auswirkung sich in der Infiltration CXCR4 positiver Zellen mit proangiogenen Fähigkeiten manifestiert.

N=4/ Untersuchungszeitpunkt; + = p<0,05 im Vergleich zu nierengesunden Versuchstieren.

Um – den Ergebnissen aus Teil 1 dieser Arbeit folgernd - proinflammatorische und resolutionsphasenverzögernde Auswirkungen eines spezifischen CXCR4 Antagonismus auf die initiierte Entzündung näher zu analysieren, wurden gemäß Kapitel 3.2 verschiedene Behandlungsmuster einer Chemokinrezeptorblockade bei glomerulonephritischen Versuchstieren gewählt. Herbeigeführt wurden diese durch das Bicyclam AMD3100 [38, 50].

Durch Antagonisierung des Chemokinrezeptors CXCR4 kann mittels des gewählten Versuchsaufbaus eine reaktive Expressionssteigerung für dessen einzigen Ligand SDF-1 verzeichnet werden - wenngleich die im Folgenden analysierten Expressionsänderungen in ihrem Gesamtbild signifikante Expressionsunterschiede ersetzen müssen.

So prädisponieren nephritische Versuchstiere an Tag 10 ihrer Erkrankung durch ein signifikant reduziertes Expressionsprofil für SDF-1 - unter *präventiver Behandlung* mit AMD3100 weisen diese Tiere hingegen reaktiv eine Anhebung des Expressionsniveaus auf, welches sich nunmehr unsignifikant von nierengesunden Tieren unterscheidet.

Unter *interventioneller Behandlung* mit AMD3100 können Expressionssteigerungen für SDF-1 zu den Zeitpunkten 10 und 14 Tage nach mesangiolytischer Antikörperapplikation, im Sinne einer blockadeinitiierten Ligandenexpressionssteigerung, erzielt werden. Darüber hinaus kann in der Folge einer Stagnation interventioneller AMD3100 Behandlung innerhalb von Tagen eine signifikante Expressionsangleichung glomerulärer SDF-1 Expressionswerte dargestellt werden. So wird unter CXCR4 antagonisierender Maßnahmen an Tag 14 nach Nephritisinduktion eine 1,24fach erhöhte Expression gegenüber ausschließlich nephritischen Tieren verzeichnet. Nach einem Ausbleiben rezeptorantagonisierender Maßnahmen kann über die folgenden 7Tage eine 96%ige Annäherung der Expressionsdaten beider Versuchsgruppen beobachtet werden.

Insgesamt könnten die erlangten Ergebnisse als reaktives Korrelat des praktizierten Antagonismus angesehen werden. Diese Beobachtungen können in Einklang mit aktueller Literatur anderer Versuchsmodelle gesehen werden, würden jedoch gleichzeitig die Bedeutung SDF-1 vermittelter Infiltration CXCR4 positiver Zellen in hiesigem Modell einer ATS- vermittelten mesangioproliferativen Glomerulonephritis determinieren.

Aktuelle Studien konnten beweisen, dass eine Expressionsinduktion von SDF-1 der resolutionsphasenfördernden Vermittlung von Prozessen wie Zellmobilisation, Angiogenese und Gewebereparatur dient [5, 21, 98, 122, 126, 138]. Andere Studien der vergangenen Jahre konnten wiederum proinflammatorische Auswirkungen einer gestörten SDF-1 - CXCR4 Interaktion zeigen [132]. In wieweit durch ein komplexes Netzwerk an subzellulären Interaktionen fließenden Übergänge zwischen diesen beiden Phasen einer Entzündungsreaktion gewährt sein müssen, kann im Folgenden mit Hilfe dieser Arbeit verdeutlicht werden.

Entsprechend der in Kapitel 3.1.1 quantitativ- chronologischen Darstellung des Expressionsverhaltens von MCP-1, kann ein glomeruläres Expressionsmaximum innerhalb von wenigen Stunden nach mesangiolytischer Initiation verzeichnet werden. Dieses zeigt charakteristischerweise in dessen weiteren zeitlichen Verlauf eine Expressionsreduktion, um ab einem Zeitpunkt von ca. 5 Tagen reaktiv das Expressionsniveau nierengesunder Tiere zu unterschreiten. Umso interessanter stellt sich in der Folge das durch *interventionellen Rezeptorantagonismus* erlangte Expressionsprofil für MCP-1 dar. So kann unter Verwendung von AMD3100 zu den Zeitpunkten 10 und 14 Tage nach Nephritisinduktion ein erhöhtes Expressionsniveau für MCP-1 gegenüber ausschließlich nephritischen Versuchstieren registriert werden, während jedoch an Tag 21 - nach 7tägigen Ausbleiben eines Rezeptorantagonismus - vielmehr ein reziprokes Expressionsprofil erstellt werden kann. Durch präventive Behandlung mit AMD3100 kann darüber hinaus an Tag 10 nach Nephritisinduktion eine nahezu 5fach signifikant erhöhte glomeruläre Expression für MCP-1 verzeichnet werden.

Vergleicht man gemäß Abbildung 18 die Resultate zeitlich differenter Eingriffe in die vorherrschende Rezeptor- Liganden- Interaktion zwischen SDF-1 und CXCR4, so widersprechen diese Ergebnisse in keinster Weise einer proinflammatorischen Auswirkung einer CXCR4 Rezeptorenblockade, sondern determinieren vielmehr die funktionell homeostatische Bedeutung von SDF-1 und CXCR4 auch in frühen Phasen einer Entzündung.

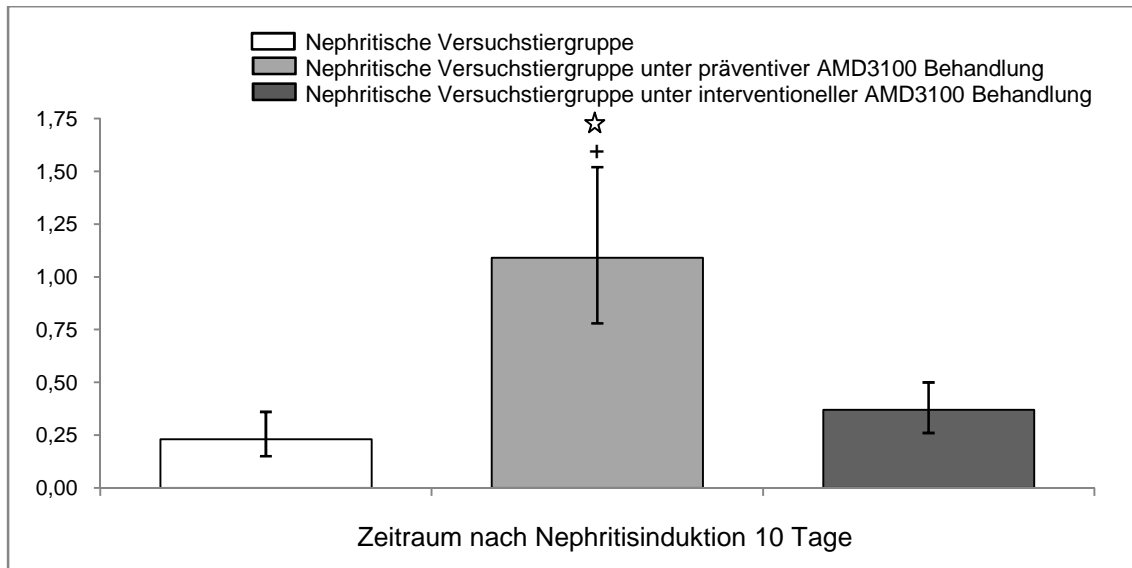


Abbildung 18

Vergleichende quantitative mRNA- Expressionsanalyse des Chemokins MCP-1 zwischen nephritischen Versuchstieren, nephritischen Versuchstieren unter präventiver Behandlung mit AMD3100 und nephritischen Versuchstieren unter interventioneller Behandlung mit AMD3100. Zeitpunkt nach Nephritisinduktion 10 Tage.

Expressionsdarstellung als x- faches nierengesunder Tiere (relative Expression); + = $p < 0,05$: signifikante Expressionsdivergenz zwischen nephritischen Versuchstieren unter präventiver und interventioneller Behandlung mit AMD3100; ☆ = $p < 0,05$: signifikante Expressionsdivergenz zwischen nephritischen Versuchstieren unter präventiver AMD3100 Behandlung und nephritischen Kontrolltieren; Versuchsgruppenentzifferung n = 4.

So könnten die für MCP-1 erlangten signifikanten Expressionsdivergenzen als Residuen proinflammatorischer Auswirkung einer CXCR4- Rezeptorblockade angesehen werden, wenngleich zu den untersuchten Zeitpunkten auf zellulärer Ebene keine verstärkte Infiltration monozytärer Zellen (mehr) nachzuweisen ist. Anhand dieser Ergebnisse könnte - in ihrer Gesamtheit - eine Rückkopplungsreaktion zwischen der SDF-1 vermittelten Infiltration resolutionsphasenfördernder, CXCR4 positiver, Zellen und dem proinflammatorischen Chemokin MCP-1 postuliert werden. Ob die unter AMD3100 Behandlung glomerulär erhöhten TGF- β Expressionsdaten in diesem Zusammenhang eine Art funktionelles Bindeglied, die Reaktion auf eine erhöhte SDF-1 Expression oder lediglich die Auswirkung einer erhöhten MCP-1 Expression darstellen, kann mit Hilfe diesen Versuchsaufbaus nicht beantwortet werden [25, 111, 135, 136]

Insgesamt betrachtet kann - gegenüber den relativ eindeutigen Ergebnissen des vorangehenden Versuchsteils - in diesem Versuchsteil keine eindeutig weiterführende Aussage bezüglich der funktionellen Aktivität des SDF-1 - CXCR4 - Rezeptorligandensystems im mesangioproliferativen Modell der Anti-

Thy- 1 Nephritis getroffen werden. Durch die unterschiedlich praktizierten Behandlungsformen einer CXCR4 Rezeptorenblockade können die erarbeiteten Ergebnisse jedoch unwidersprüchliche Tendenzen aufzeigen. So kann durch die angewandte Rezeptorantagonisierung zwar die Existenz eines Feedbacks zwischen der Infiltrationsvermittlung CXCR4 positiver Zellen und der renalen Expression von MCP-1 postuliert werden, jedoch hätte angesichts der in Kapitel 3.2 erlangten Ergebnisse gerade der Frühphase der Entzündung (Tag 0 bis 3 nach Nephritisinduktion) eventuell mehr Beachtung geschenkt werden müssen. Hinsichtlich einer Beteiligung des SDF-1/ CXCR4 Liganden- Rezeptor- Systems an Prozessen endothelialer Resolution erübrigte sich angesichts des histologischen Bildes und der beschriebenen Ergebnisse ein weiteres diagnostisches Vorgehen. Gerade in Bereichen resolutionsphasenorientierter Forschung wäre jedoch unter der derzeitigen Zunahme an Erkenntnissen ein erneutes experimentelles Vorgehen erstrebenswert.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit ermöglicht im Verlauf einer experimentell induzierten Glomerulonephritis eine quantitativ chronologische mRNA Expressionsanalyse verschiedener Chemokine (IP-10, MCP-1, RANTES, SDF-1), Chemokinrezeptoren (CXCR4), Wachstumsfaktoren (TGF- β , Angiopoietin-2), Strukturproteine (Kollagen IV) und Enzyme (MMP-9). Besondere Bedeutung wird hierbei der glomerulären Expression des Chemokinrezeptor-Ligandenpaares CXCR4/ SDF-1 zuteil. Während der Resolutionsphase der glomerulären Entzündung kann eine signifikante Expressionserhöhung über einen Zeitraum von 10 bis 14 Tage für den Chemokinrezeptor CXCR4, bzw. 10 bis 21 Tage für dessen Liganden SDF-1 verzeichnet werden.

Um proinflammatorische und profibrotische Auswirkungen dieser Chemokin(rezeptor)expression während der Resolutionsphase der Glomerulonephritis näher zu untersuchen, verwendeten wir in einer weiteren Versuchsanordnung AMD3100 – einen synthetischen CXCR4 Antagonisten. Hierbei wurde zwischen zwei unterschiedlichen Behandlungsstrategien differenziert: einer präventiven mit Nephritisinduktion begonnenen, und einer interventionellen zu Tag 5 nach Nephritisinduktion initialisierten Behandlung mit AMD3100.

Auf subzellulärer Ebene konnten in diesem Versuchsteil postnephritisch lediglich unsignifikant erhöhte glomeruläre Expressionen für SDF-1 und CXCR4 erzielt werden. Trotz diesen Befundes konnte unter präventiver Behandlung mit AMD3100 an Tag 10 nach Nephritisinduktion eine signifikant erhöhte Expression für das proinflammatorische Chemokin MCP-1, sowie das profibrotische Zytokin TGF- β verzeichnet werden. Unter interventioneller Behandlung mit AMD3100 waren gegenüber nephritischen Versuchstieren zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung signifikante Expressionsunterschiede für MCP-1 und TGF- β zu verzeichnen.

Auf zellulärer Ebene konnte unter Behandlung mit AMD3100 in der Resolutionsphase der glomerulären Entzündung kein signifikanter Einfluss auf histomorphologische Veränderungen oder leukozytäre Infiltrationsprozesse (Monozyten/Makrophagen, T- Lymphozyten, B- Lymphozyten) nachgewiesen werden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologische Darstellung einer MPGN bei der Ratte	2
Abbildung 2: EM Darstellung der Initialphase einer MPGN bei der Ratte.....	3
Abbildung 3: Struktureller Aufbau eines Chemokins und Gruppenzugehörigkeit.....	7
Abbildung 4: Chemische Struktur von AMD3100.....	15
Abbildung 5: Versuchsaufbau unter Verwendung von AMD3100	17
Abbildung 6: Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von MCP-1	31
Abbildung 7: Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von IP-10	32
Abbildung 8: Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von RANTES	33
Abbildung 9: Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von Angiopoietin-2.....	34
Abbildung 10: Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von TGF- β	35
Abbildung 11: Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von MMP-9	36
Abbildung 12: Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von Kollagen IV	37
Abbildung 13: Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von SDF-1	38
Abbildung 14: Expressionsanalyse glomerulärer mRNA von CXCR4	39
Abbildung 15: Expressionsanalyse unter präventiver Behandlung mit AMD3100	41
Abbildung 16: Expressionsanalyse unter interventioneller Behandlung mit AMD3100.....	48
Abbildung 17: Vergleichende Expressionsanalyse-Darstellung von SDF-1, CXCR4, MCP-1 und Angiopoietin-2.....	59
Abbildung 18: Vergleichende Expressionsanalyse-Darstellung von MCP-1 zwischen nephritischen Versuchstieren (VT) und nephritischen VT unter präventiver und interventioneller Behandlung mit AMD3100	62

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Infiltration von Monozyten/Makrophagen..	44
Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der Infiltration von T- Lymphozyten	45
Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der Infiltration von B- Lymphozyten.....	46
Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Infiltration von Monozyten/Makrophagen ..	52
Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der Infiltration von T- Lymphozyten.....	53
Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Infiltration von T- Lymphozyten.....	54

8. Literaturverzeichnis

1. *Abstracts of the 3rd International Symposium on Chemotactic Cytokines. Baden bei Wien, Austria, August 30-September 1, 1992.* Adv Exp Med Biol, 1993. **351**: p. 1-227.
2. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism.* Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 787-820.
3. Anders, H.J., et al., *CC chemokine ligand 5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration.* J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5658-66.
4. Anders, H.J., V. Vielhauer, and D. Schlondorff, *Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease.* Kidney Int, 2003. **63**(2): p. 401-15.
5. Askari, A.T., et al., *Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy.* Lancet, 2003. **362**(9385): p. 697-703.
6. Bagchus, W.M., et al., *The specificity of nephritogenic antibodies. II. Immune complex glomerulopathy in rats induced by heterologous antithymocyte serum.* Transplantation, 1984. **38**(2): p. 165-9.
7. Bagchus, W.M., et al., *Glomerulonephritis induced by monoclonal anti-Thy 1.1 antibodies. A sequential histological and ultrastructural study in the rat.* Lab Invest, 1986. **55**(6): p. 680-7.
8. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic.* Nature, 1998. **392**(6676): p. 565-8.
9. Bagri, A., et al., *The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells.* Development, 2002. **129**(18): p. 4249-60.
10. Baker, A.J., et al., *Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis.* J Clin Invest, 1994. **94**(5): p. 2105-16.
11. Balabanian, K., et al., *The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes.* J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35760-6.
12. Beck, S., et al., *Upregulation of group IB secreted phospholipase A(2) and its M-type receptor in rat ANTI-THY-1 glomerulonephritis.* Kidney Int, 2006. **70**(7): p. 1251-60.
13. Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry.* Nature, 1996. **382**(6594): p. 829-33.
14. Bokemeyer, D., et al., *The map kinase ERK regulates renal activity of cyclin-dependent kinase 2 in experimental glomerulonephritis.* Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(12): p. 3431-41.
15. Border, W.A. and N.A. Noble, *Cytokines in kidney disease: the role of transforming growth factor-beta.* Am J Kidney Dis, 1993. **22**(1): p. 105-13.
16. Border, W.A., N.A. Noble, and M. Ketteler, *TGF-beta: a cytokine mediator of glomerulosclerosis and a target for therapeutic intervention.* Kidney Int Suppl, 1995. **49**: p. S59-61.

17. Border, W.A., et al., *Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1*. *Nature*, 1990. **346**(6282): p. 371-4.
18. Brandt, J., et al., *Role of the complement membrane attack complex (C5b-9) in mediating experimental mesangioproliferative glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 1996. **49**(2): p. 335-43.
19. Burns, J.M., et al., *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development*. *J Exp Med*, 2006. **203**(9): p. 2201-13.
20. Busillo, J.M. and J.L. Benovic, *Regulation of CXCR4 signaling*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(4): p. 952-63.
21. Butler, J.M., et al., *SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(1): p. 86-93.
22. Campean, V., et al., *Angiopoietin 1 and 2 Gene and Protein Expression Is Differentially Regulated in Acute Anti-Thy 1.1 Glomerulonephritis*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008.
23. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 653-60.
24. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. *Nat Med*, 2004. **10**(8): p. 858-64.
25. Cheng, J., et al., *TGF-beta1 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells through a phosphodiesterase isoenzyme 4-dependent process*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. **289**(4): p. C959-70.
26. Cohen, S., *Cytokine: more than a new word, a new concept proposed by Stanley Cohen thirty years ago*. *Cytokine*, 2004. **28**(6): p. 242-7.
27. Cohen, S., P.E. Bigazzi, and T. Yoshida, *Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production*. *Cell Immunol*, 1974. **12**(1): p. 150-9.
28. Colobran, R., et al., *The chemokine network. II. On how polymorphisms and alternative splicing increase the number of molecular species and configure intricate patterns of disease susceptibility*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **150**(1): p. 1-12.
29. Damas, J.K., et al., *Myocardial expression of CC- and CXC-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure*. *Cardiovasc Res*, 2000. **47**(4): p. 778-87.
30. De Clercq, E., *The bicyclam AMD3100 story*. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(7): p. 581-7.
31. De Clercq, E., et al., *Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994. **38**(4): p. 668-74.
32. Dinarello, C.A., *Historical insights into cytokines*. *Eur J Immunol*, 2007. **37 Suppl 1**: p. S34-45.
33. Douthwaite, J.A., et al., *Effects of transforming growth factor-beta1 on renal extracellular matrix components and their regulating proteins*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(10): p. 2109-19.

34. Duque, N., C. Gomez-Guerrero, and J. Egido, *Interaction of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor-kappa B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-inducible protein 10*. J Immunol, 1997. **159**(7): p. 3474-82.
35. Feng, L., et al., *Interleukin-1 alpha stimulates KC synthesis in rat mesangial cells: glucocorticoids inhibit KC induction by IL-1*. Am J Physiol, 1994. **266**(5 Pt 2): p. F713-22.
36. Fiedler, U. and H.G. Augustin, *Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation*. Trends Immunol, 2006. **27**(12): p. 552-8.
37. Floege, J., et al., *Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis*. Kidney Int, 1991. **40**(3): p. 477-88.
38. Fricker, S.P., et al., *Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(5): p. 588-96.
39. Gao, C. and J. Huan, *SDF-1 plays a key role in chronic allograft nephropathy in rats*. Transplant Proc, 2008. **40**(5): p. 1674-8.
40. Gasperini, S., et al., *Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4928-37.
41. Gerritsma, J.S., et al., *Transforming growth factor-beta 1 regulates chemokine and complement production by human proximal tubular epithelial cells*. Kidney Int, 1998. **53**(3): p. 609-16.
42. Gomez-Chiarri, M., et al., *Expression of IP-10, a lipopolysaccharide- and interferon-gamma-inducible protein, in murine mesangial cells in culture*. Am J Pathol, 1993. **142**(2): p. 433-9.
43. Grunewald, M., et al., *VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells*. Cell, 2006. **124**(1): p. 175-89.
44. Haberstroh, U., et al., *Expression of the chemokines MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 is differentially regulated by infiltrating inflammatory cells*. Kidney Int, 2002. **62**(4): p. 1264-76.
45. Han, G.D., et al., *IFN-inducible protein-10 has a differential role in podocyte during Thy 1.1 glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(12): p. 3111-26.
46. Han, G.D., et al., *IFN-inducible protein-10 plays a pivotal role in maintaining slit-diaphragm function by regulating podocyte cell-cycle balance*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(2): p. 442-53.
47. Haraldsen, G. and A. Rot, *Coy decoy with a new ploy: interceptor controls the levels of homeostatic chemokines*. Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1659-61.
48. Harendza, S., et al., *In vitro characterization of the mesangial phenotype in a proliferative glomerulonephritis of the rat*. Nephrol Dial Transplant, 1997. **12**(12): p. 2537-41.
49. Hatch, H.M., et al., *SDF-1alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats*. Cloning Stem Cells, 2002. **4**(4): p. 339-51.

50. Hatse, S., et al., *Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4*. FEBS Lett, 2002. **527**(1-3): p. 255-62.
51. Heck, S., et al., *I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor*. EMBO J, 1997. **16**(15): p. 4698-707.
52. Hricik, D.E., M. Chung-Park, and J.R. Sedor, *Glomerulonephritis*. N Engl J Med, 1998. **339**(13): p. 888-99.
53. Hugo, C., et al., *Extraglomerular origin of the mesangial cell after injury. A new role of the juxtaglomerular apparatus*. J Clin Invest, 1997. **100**(4): p. 786-94.
54. Ichimura, K., H. Kurihara, and T. Sakai, *Involvement of mesangial cells expressing alpha-smooth muscle actin during restorative glomerular remodeling in Thy-1.1 nephritis*. J Histochem Cytochem, 2006. **54**(11): p. 1291-301.
55. Iruela-Arispe, L., et al., *Participation of glomerular endothelial cells in the capillary repair of glomerulonephritis*. Am J Pathol, 1995. **147**(6): p. 1715-27.
56. Ito, Y., et al., *Kinetics of connective tissue growth factor expression during experimental proliferative glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(3): p. 472-84.
57. Jefferson, J.A. and R.J. Johnson, *Experimental mesangial proliferative glomerulonephritis (the anti-Thy-1.1 model)*. J Nephrol, 1999. **12**(5): p. 297-307.
58. Jin, D.K., et al., *Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes*. Nat Med, 2006. **12**(5): p. 557-67.
59. Johnson, R.J., et al., *The activated mesangial cell: a glomerular "myofibroblast"?* J Am Soc Nephrol, 1992. **2**(10 Suppl): p. S190-7.
60. Johnson, R.J., et al., *Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation*. J Clin Invest, 1991. **87**(3): p. 847-58.
61. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
62. Kitahara, T., et al., *Mesangial cells stimulate differentiation of endothelial cells to form capillary-like networks in a three-dimensional culture system*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(1): p. 42-9.
63. Kryczek, I., et al., *Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(3): p. C987-95.
64. Kunkel, S.L., et al., *Chemokines: new ligands, receptors and activities*. Immunol Today, 1995. **16**(12): p. 559-61.
65. Lapidot, T., A. Dar, and O. Kollet, *How do stem cells find their way home?* Blood, 2005. **106**(6): p. 1901-10.
66. Lazarini, F., et al., *Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system*. Glia, 2003. **42**(2): p. 139-48.
67. Lee, S.P., et al., *Integrin-linked kinase, a hypoxia-responsive molecule, controls postnatal vasculogenesis by recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissue*. Circulation, 2006. **114**(2): p. 150-9.

68. Lefkowitz, R.J., *Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(8): p. 413-22.
69. Lemley, K.V., et al., *The glomerular mesangium: capillary support function and its failure under experimental conditions*. Clin Investig, 1992. **70**(9): p. 843-56.
70. Lenz, O., S.J. Elliot, and W.G. Stetler-Stevenson, *Matrix metalloproteinases in renal development and disease*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(3): p. 574-81.
71. Leonard, W.J., *Fundamental Immunology, fourth ed.* Lippincott- Raven-Publishers, Philadelphia, 1999.
72. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
73. Little, M.H., *Regrow or repair: potential regenerative therapies for the kidney*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(9): p. 2390-401.
74. Locati, M., et al., *Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(6): p. 679-86.
75. Loetscher, M., et al., *Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes*. J Biol Chem, 1994. **269**(1): p. 232-7.
76. Lotan, D., et al., *Expression of SDF-1/CXCR4 in injured human kidneys*. Pediatr Nephrol, 2008. **23**(1): p. 71-7.
77. Lovett, D.H., et al., *Structural characterization of the mesangial cell type IV collagenase and enhanced expression in a model of immune complex-mediated glomerulonephritis*. Am J Pathol, 1992. **141**(1): p. 85-98.
78. Lusso, P., *HIV and the chemokine system: 10 years later*. EMBO J, 2006. **25**(3): p. 447-56.
79. Luster, A.D. and J.V. Ravetch, *Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10)*. J Exp Med, 1987. **166**(4): p. 1084-97.
80. Mantovani, A., R. Bonecchi, and M. Locati, *Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(12): p. 907-18.
81. Masuda, Y., et al., *Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis*. Am J Pathol, 2001. **159**(2): p. 599-608.
82. Mazinghi, B., et al., *Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells*. J Exp Med, 2008. **205**(2): p. 479-90.
83. Minto, A.W., L.P. Erwig, and A.J. Rees, *Heterogeneity of macrophage activation in anti-Thy-1.1 nephritis*. Am J Pathol, 2003. **163**(5): p. 2033-41.
84. Morioka, T., et al., *The characterization of a specific Thy-1 molecular epitope expressed on rat mesangial cells*. Kidney Int, 2004. **66**(6): p. 2214-23.
85. Morita, H., et al., *Induction of irreversible glomerulosclerosis in the rat by repeated injections of a monoclonal anti-Thy-1.1 antibody*. Nephron, 1992. **60**(1): p. 92-9.

86. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 145-76.
87. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 635-8.
88. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.
89. Nakayama, H., et al., *Comparative nephritogenicity of two monoclonal antibodies that recognize different epitopes of rat Thy-1.1 molecule*. Nephron, 1998. **78**(4): p. 453-63.
90. Notoya, M., et al., *Intussusceptive capillary growth is required for glomerular repair in rat Thy-1.1 nephritis*. Kidney Int, 2003. **63**(4): p. 1365-73.
91. Ohnishi, H., S. Mizuno, and T. Nakamura, *Inhibition of tubular cell proliferation by neutralizing endogenous HGF leads to renal hypoxia and bone marrow-derived cell engraftment in acute renal failure*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(2): p. F326-35.
92. Okuda, S., et al., *Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix*. J Clin Invest, 1990. **86**(2): p. 453-62.
93. Panzer, U., et al., *The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis*. Kidney Int, 1999. **56**(6): p. 2107-15.
94. Panzer, U., et al., *Kidney diseases and chemokines*. Curr Drug Targets, 2006. **7**(1): p. 65-80.
95. Patel, K., et al., *Regulation of the mesangial cell myofibroblast phenotype by actin polymerization*. J Cell Physiol, 2003. **195**(3): p. 435-45.
96. Patrussi, L. and C.T. Baldari, *Intracellular mediators of CXCR4-dependent signaling in T cells*. Immunol Lett, 2008. **115**(2): p. 75-82.
97. Peters, H., et al., *Platelet inhibition limits TGF-beta overexpression and matrix expansion after induction of anti-thy1 glomerulonephritis*. Kidney Int, 2004. **65**(6): p. 2238-48.
98. Petit, I., D. Jin, and S. Rafii, *The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis*. Trends Immunol, 2007. **28**(7): p. 299-307.
99. Petty, J.M., et al., *Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8148-57.
100. Pippin, J.W., et al., *Direct in vivo inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase antagonist*. J Clin Invest, 1997. **100**(10): p. 2512-20.
101. Poon, M., et al., *In vivo and in vitro inhibition of JE gene expression by glucocorticoids*. J Biol Chem, 1991. **266**(33): p. 22375-9.
102. Proudfoot, A.E., et al., *Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32478-85.

103. Raman, D., et al., *Role of chemokines in tumor growth*. Cancer Lett, 2007. **256**(2): p. 137-65.
104. Ratajczak, M.Z., et al., *Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles*. Stem Cells, 2003. **21**(3): p. 363-71.
105. Ratajczak, M.Z., et al., *The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis*. Leukemia, 2006. **20**(11): p. 1915-24.
106. Romagnani, P., et al., *Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(12): p. 2518-26.
107. Rookmaaker, M.B., et al., *Met-RANTES reduces endothelial progenitor cell homing to activated (glomerular) endothelium in vitro and in vivo*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(2): p. F624-30.
108. Ruiz-Ortega, M., et al., *Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney*. Kidney Int Suppl, 2002(82): p. S12-22.
109. Sadlier, D.M., et al., *Microarray and bioinformatic detection of novel and established genes expressed in experimental anti-Thy1 nephritis*. Kidney Int, 2005. **68**(6): p. 2542-61.
110. Satriano, J.A., et al., *Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells*. J Immunol, 1993. **150**(5): p. 1971-8.
111. Schneider, A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta*. Kidney Int, 1999. **56**(1): p. 135-44.
112. Segerer, S., *The role of chemokines and chemokine receptors in progressive renal diseases*. Am J Kidney Dis, 2003. **41**(3 Suppl 1): p. S15-8.
113. Segerer, S., P.J. Nelson, and D. Schlondorff, *Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(1): p. 152-76.
114. Shankland, S.J., et al., *Changes in cell-cycle protein expression during experimental mesangial proliferative glomerulonephritis*. Kidney Int, 1996. **50**(4): p. 1230-9.
115. Sharma, K. and F.N. Ziyadeh, *The emerging role of transforming growth factor-beta in kidney diseases*. Am J Physiol, 1994. **266**(6 Pt 2): p. F829-42.
116. Shimizu, A., et al., *Complement-mediated killing of mesangial cells in experimental glomerulonephritis: cell death by a combination of apoptosis and necrosis*. Nephron, 2000. **86**(2): p. 152-60.
117. Shimizu, A., et al., *Recovery of damaged glomerular capillary network with endothelial cell apoptosis in experimental proliferative glomerulonephritis*. Nephron, 1998. **79**(2): p. 206-14.
118. Shirozu, M., et al., *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene*. Genomics, 1995. **28**(3): p. 495-500.

119. Stahl, R.A., et al., *Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 1993. **44**(5): p. 1036-47.
120. Stahl, R.A., et al., *Morphologic and functional consequences of immune-mediated mesangiolysis: development of chronic glomerular sclerosis*. *J Am Soc Nephrol*, 1992. **2**(10 Suppl): p. S144-8.
121. Steinmann-Niggli, K., et al., *Inhibition of matrix metalloproteinases attenuates anti-Thy1.1 nephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 1998. **9**(3): p. 397-407.
122. Takahashi, T., et al., *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. *Nat Med*, 1999. **5**(4): p. 434-8.
123. Tashiro, K., et al., *Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins*. *Science*, 1993. **261**(5121): p. 600-3.
124. Tayal, V. and B.S. Kalra, *Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **579**(1-3): p. 1-12.
125. Thelen, M. and S. Thelen, *CXCR7, CXCR4 and CXCL12: An eccentric trio?* *J Neuroimmunol*, 2008. **198**(1-2): p. 9-13.
126. Togel, F., et al., *Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury*. *Kidney Int*, 2005. **67**(5): p. 1772-84.
127. Tomita, M., et al., *Decreased collagen-degrading activity could be a marker of prolonged mesangial matrix expansion*. *Clin Exp Nephrol*, 2004. **8** (1): p. 17-26.
128. Topham, P.S., et al., *Lack of chemokine receptor CCR1 enhances Th1 responses and glomerular injury during nephrotoxic nephritis*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(11): p. 1549-57.
129. Viola, A. and A.D. Luster, *Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008. **48**: p. 171-97.
130. Wang, Y. and H.G. Dohlman, *Regulation of G protein and mitogen-activated protein kinase signaling by ubiquitination: insights from model organisms*. *Circ Res*, 2006. **99**(12): p. 1305-14.
131. Wang, Y., et al., *The complement C5b-9 complexes induced injury of glomerular mesangial cells in rats with Thy-1 nephritis by increasing nitric oxide synthesis*. *Life Sci*, 2006. **79**(2): p. 182-92.
132. Watanabe, M., et al., *Dual effect of AMD3100, a CXCR4 antagonist, on bleomycin-induced lung inflammation*. *J Immunol*, 2007. **178**(9): p. 5888-98.
133. Watanabe, T., et al., *Transforming growth factor-beta receptors in self-limited vs. chronic progressive nephritis in rats*. *J Pathol*, 2002. **198**(3): p. 397-406.
134. Wenzel, U., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 1997. **51**(3): p. 770-6.
135. Wolf, G., et al., *Existence of a regulatory loop between MCP-1 and TGF-beta in glomerular immune injury*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. **283**(5): p. F1075-84.

136. Wright, N., et al., *Transforming growth factor-beta1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion*. Blood, 2003. **102**(6): p. 1978-84.
137. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 199-210.
138. Xu, J., et al., *Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(3): p. 291-9.
139. Yamamoto, T. and C.B. Wilson, *Quantitative and qualitative studies of antibody-induced mesangial cell damage in the rat*. Kidney Int, 1987. **32**(4): p. 514-25.
140. Yu, L., et al., *Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1*. Gene, 2006. **374**: p. 174-9.
141. Yuan, H.T., et al., *Angiopoietin correlates with glomerular capillary loss in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis*. Kidney Int, 2002. **61**(6): p. 2078-89.
142. Yuan, H.T., S.P. Yang, and A.S. Woolf, *Hypoxia up-regulates angiopoietin-2, a Tie-2 ligand, in mouse mesangial cells*. Kidney Int, 2000. **58**(5): p. 1912-9.
143. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.
144. Zlotnik, A., O. Yoshie, and H. Nomiyama, *The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution*. Genome Biol, 2006. **7**(12): p. 243.
145. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 595-9.

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl für die Möglichkeit die vorliegende Dissertation in seinem Labor durchführen zu können. Ihm möchte ich ganz besonders für die erfahrene Förderung, sein fortwährendes Interesse an meiner Arbeit, sowie seine ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft danken.

Darüber hinaus möchte ich danken:

Herrn Prof. Dr. med. Friedrich Thaiss für seine stetige Hilfsbereitschaft in der Durchführung meiner Versuche.

Herrn PD Dr. med. André Schneider für seine stetige Hilfsbereitschaft als Ansprechpartner während der Durchführung meiner Versuche.

Frau Dr. med. Catherine Meyer - Schwesinger für die Unterstützung in der histologischen Aufarbeitung.

Frau Anett Peters für ihre Freundschaft und ihre stetige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung meiner Versuche.

Herrn Dr. rer. nat. Hans - Joachim Paust für seine Freundschaft und seine stetige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung meiner Versuche

Herrn PD Dr. med. Ulf Panzer

Herrn Dr. med. Oliver Steinmetz

Herrn Dr. rer. nat. Gunther Zahner

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel

Frau PD Dr. med. Sigrid Harendza

Frau Mariola Reszka

Frau Melanie Scharper

Schließlich möchte ich in diesem Zusammenhang meinen Eltern **Herrn Prof. Dr. med. Jobst Dämmrich** und **Frau Elisabeth Dämmrich** meinen ganz besonderen Dank aussprechen, ohne deren Unterstützung ich niemals mein Studium und diese Arbeit hätte verwirklichen können.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Maximilian Ernst Dämmrich
Geburtsdatum: 06.10.1979
Geburtsort: Würzburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig

Ausbildungsdaten

1990 - 1998 Friedrich- Koenig- Gymnasium, Würzburg
1998 - 2000 Walther- Rathenau- Gymnasium, Schweinfurt
2000 - 2001 Zivildienst St. Josef- Krankenhaus, Schweinfurt
2001 - 2002 Ausbildung zum medizinisch – technischen Assistenten für
Radiologie, Universitätsklinikum Würzburg
2002 - 2009 Medizinstudium am Universitätsklinikum Hamburg

Studienverlauf

09/ 2004 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006 - 2007 Doktorarbeit: Nephrologie, Universitätsklinikum Hamburg
Doktorvater: Prof. Dr. med. R.A.K. Stahl
Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. R.A.K. Stahl
2008 - 2009 Praktisches Jahr
Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg/ Eppendorf
Innere Medizin, Asklepios Klinik Hamburg/ Altona
Chirurgie, Krankenhaus Alte Eichen, Hamburg
10 - 12/2009 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/2009 Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeit

Ab 01/2010 Fortbildung zum Facharzt für Pathologie
Medizinische Hochschule Hannover
Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. H.H. Kreipe

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....
Maximilian Ernst Dämmrich