

Phänotypische Charakterisierung und Depletion zirkulierender Fibrozyten im Modell der renalen Fibrose

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
– Biologie und Vorklinische Medizin –
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Barbara Reich
aus
Dobroje Pole, Russland

Regensburg im April 2013

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

08. April 2013

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Matthias Mack

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Hayo Castrop

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Mack
2. Gutachter: Prof. Dr. Frank Schweda
3. Prüfer: Prof. Dr. Gernot Längst

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von April 2009 bis April 2013 in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Regensburg im Rahmen des DFG-geförderten Sonderforschungsbereichs 699 „Strukturelle, physiologische und molekulare Grundlagen der Nierenfunktion“ angefertigt. Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

B. Reich, K. Schmidbauer, M. Rodriguez Gomez, F.J. Hermann, N. Göbel, H. Brühl, I. Ketelsen, Y. Talke, M. Mack. Origin and depletion of fibrocytes in a model of renal fibrosis. *Kidney Int* 2013; 84(1):78-89.

M. Niedermeier, **B. Reich**, M. Rodriguez Gomez, A. Denzel, K. Schmidbauer, N. Göbel, Y. Talke, F. Schweda, M. Mack. CD4⁺ T cells control the differentiation of Gr1⁺ monocytes into fibrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 17892-17897.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen. Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür keine entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 08.04.2013

(Barbara Reich)

Don't only practise your art.

But force your way into its secrets,

For it and knowledge can

Raise men to the Divine.

Ludwig van Beethoven

Für meine Familie

Sakeh Forcob

Erna und Waldemar Reich

Konstantin, Julia und Viktoria Reich

I Inhaltsverzeichnis

I INHALTSVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 AUFBAU UND PHYSIOLOGIE DER NIERE.....	9
1.2 NIERENFIBROSE.....	10
1.2.1 Interstitielle Entzündung der Niere	10
1.2.2 Mechanismus der renalen Fibrose	12
1.2.3 EZM-produzierende Zellen in der renalen Fibrose	14
1.3 FIBROZYTEN.....	17
1.3.1 Fibrozyten in der Nierenfibrose und anderen Erkrankungen	18
1.3.2 Monozyten als Vorläuferzellen der Fibrozyten	21
1.3.2.1 Subpopulationen der Monozyten in der Maus	22
1.3.2.2 Die Rolle von Monozyten in der Nierenfibrose.....	24
1.4 DIE ROLLE VON CD4 ⁺ T-ZELLEN BEI DER FIBROZYTENDIFFERENZIERUNG UND ENTSTEHUNG EINER NIERENFIBROSE	25
1.5 DIE ROLLE BASOPHILER GRANULOZYTEN BEI NIERENERKRANKUNGEN.....	26
1.6 UNILATERALE URETEROBSTRUKTION ALS MODELL DER RENALEN FIBROSE	27
1.7 ZIELSETZUNG	29
2 MATERIAL	31
2.1 CHEMIKALIEN	31
2.2 NARKOSE.....	32
2.3 ANTAGONIST.....	32
2.4 PUFFER	32
2.5 SONSTIGE MATERIALIEN.....	33
2.6 GERÄTE	35
2.7 KITS.....	36
2.8 ANTIKÖRPER UND ZYTOKINE.....	37
2.9 PRIMER	38
2.10 VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG.....	39
2.11 SOFTWARE	39
3 METHODEN	40
3.1 TIEREXPERIMENTE	40
3.1.1 Unilaterale Ureterobstruktion (UUO).....	40
3.1.2 <i>In vivo</i> Depletion von Monozyten	40
3.1.2.1 Depletion der CCR2 ⁺ Monozyten mit dem Antikörper MC-21	40
3.1.2.2 Herstellung der CD11b-DTR Knochenmark-chimärer Mäuse	41

3.1.2.3	Depletion von CD11b ⁺ Zellen in CD11b-DTR Knochenmark-chimären Mäusen.....	42
3.1.2.4	Depletion von Gr-1 ⁺ Zellen mit dem anti-Gr-1 Antikörper	42
3.1.3	<i>In vivo</i> Depletion von CD4 ⁺ T-Zellen	43
3.1.4	<i>In vivo</i> Depletion von Basophilen Granulozyten.....	43
3.1.5	<i>In vivo</i> Aktivierung von Basophilen Granulozyten	44
3.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	45
3.2.1	Entnahme von peripherem Blut.....	45
3.2.2	Präparation von Milz und Nieren	45
3.3	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS, FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING)	46
3.3.1	Allgemeines Prinzip	46
3.3.2	Extrazelluläre Färbung	47
3.3.3	Intrazelluläre Färbung	47
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	48
3.4.1	Isolation von Gesamt-RNA aus murinem Gewebe	48
3.4.2	Reverse Transkription – PCR (RT-PCR)	48
3.4.3	Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	49
3.5	HISTOLOGISCHE METHODEN	50
3.5.1	Herstellung von Kryostatpräparaten.....	50
3.5.2	Immunfluoreszenz-Färbung von Kollagen I.....	50
3.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG	51
4	ERGEBNISSE.....	52
4.1	URSPRUNG UND DEPLETION DER FIBROZYTEN IM MODELL DER RENALEN FIBROSE.....	52
4.1.1	Expression charakteristischer Marker auf der Zelloberfläche von murinen Fibrozyten in Niere und Milz	52
4.1.2	Depletion der CCR2 ⁺ Gr-1 ⁺ Monozyten mit MC-21	55
4.1.3	Entstehung und Migration der Fibrozyten in CCR2 defizienten Mäusen.....	59
4.1.4	Depletion der Fibrozyten in CD11b-DTR Mäusen	62
4.1.5	Depletion der Fibrozyten mit dem anti-Gr-1 Antikörper	65
4.2	ROLLE VON CD4 ⁺ T-ZELLEN BEI DER FIBROZYTENENTSTEHUNG <i>IN VIVO</i>	70
4.2.1	Depletion von CD4 ⁺ T-Zellen im peripheren Blut der C57BL/6N Mäuse.....	70
4.2.2	Reduzierte Fibrozytenzahl und Fibrose in UUO-Nieren nach CD4 ⁺ T-Zell Depletion.....	71
4.3	ROLLE VON BASOPHILEN GRANULOZYTEN BEI DER FIBROZYTENAKKUMULATION IN DER FIBROTISCHEN NIERE	72
4.3.1	Depletion Basophiler Granulozyten im Modell der UUO	73
4.3.1.1	Behandlung der Mäuse mit MAR1 depletiert Basophile Granulozyten in Blut und Milz ...	73
4.3.1.2	Einfluss Basophiler Granulozyten auf die Zahl der Monozyten	74
4.3.1.3	Basophile Granulozyten sind an der Akkumulation der Fibrozyten in der Niere im Modell der renalen Fibrose nicht beteiligt.....	75
4.3.2	Aktivierung Basophiler Granulozyten im Modell der UUO	76
4.3.2.1	Behandlung mit IL-3 steigert die Zahl der Basophilen Granulozyten in Blut und Milz	76

4.3.2.2	Einfluss von IL-3 auf die Zahl der Monozyten und andere Zellen in Blut, Milz und Niere	78
4.3.2.3	Einfluss von IL-3 auf die Entwicklung der Fibrozyten und der renalen Fibrose	80
5	DISKUSSION.....	82
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	90
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	92
8	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	101
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	103
10	ANHANG	107
10.1	DANKSAGUNG	107
10.2	PUBLIKATIONEN.....	109

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Physiologie der Niere

Die Niere reguliert neben der Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten über den Harn auch den Elektrolythaushalt (Homöostase), das Säure-Basen-Gleichgewicht sowie die Einstellung des Blutdrucks. Darüber hinaus weist die Niere endokrine Funktionen durch die Produktion verschiedener Enzyme (z.B. Renin) und Hormone (z.B. Erythropoetin) auf [1].

Das Nierenparenchym gliedert sich in Rinde (Cortex renalis) und Mark (Medulla renalis). Letzteres besteht aus sogenannten Nierenpyramiden und teilt sich in eine Außen- und Innenzone auf, wobei die Innenzone im Nierenbecken mündet. Die Rinde liegt dem Mark auf und wird außen durch die Nierenkapsel begrenzt (Abb. 1.1, A).

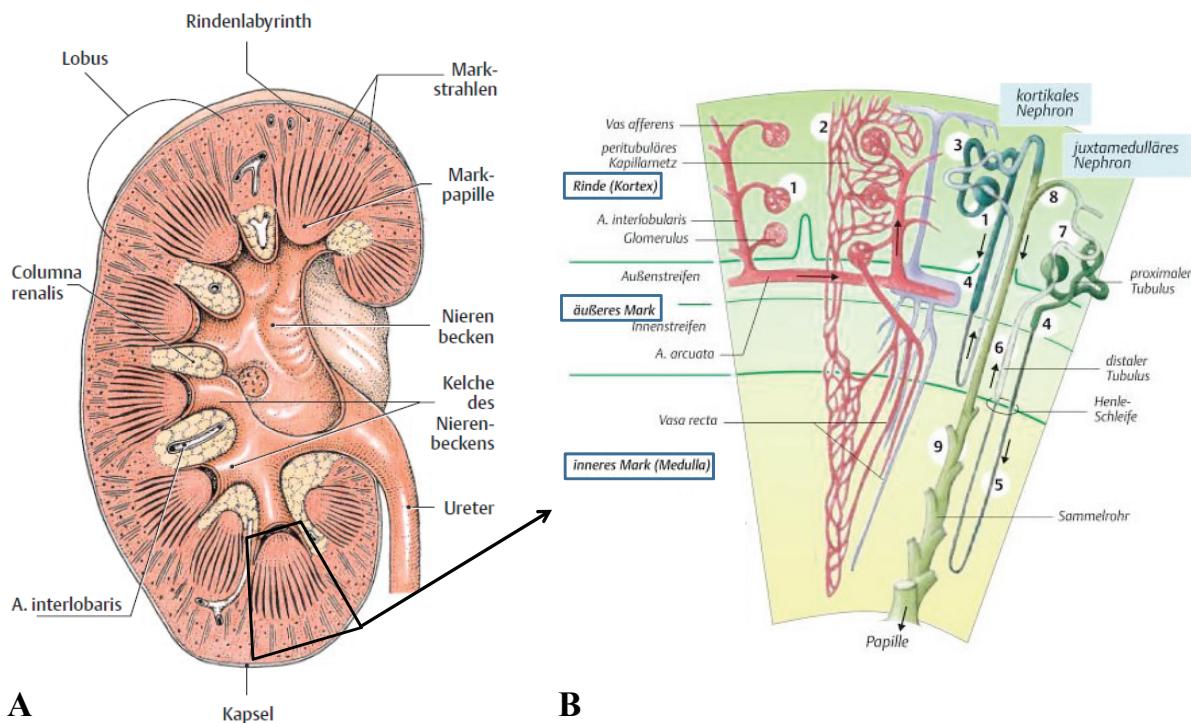


Abb. 1.1 Aufbau der Niere. (A) Längsschnitt durch die Niere (Schema) [1]. (B) Schematische Darstellung der Gefäßarchitektur in der Niere zusammen mit dem kortikalem und juxtamedullärem Nephron mit Sammelrohr [2].

Die funktionelle Grundeinheit der Niere bildet das Nephron (ca. 1 – 1,25 Mio pro menschliche Niere), das sich aus einem Nierenkörperchen, bestehend aus Glomerulus und Bowman-Kapsel, und dem Tubulussystem zusammensetzt. Das Tubulussystem besteht aus dem proximalen und distalen Tubulus, das durch den intermediären Tubulus, einem sogenannten Überleitungsstück auch Henlesche Schleife genannt, verbunden ist. Der distale Tubulus mündet in den Tubulus reuniens (Verbindungsstück), der sich an das Sammelrohr

anschließt, welches wiederum im Nierenbecken endet (Abb. 1.1, B). In den Glomeruli wird durch eine sogennante Ultrafiltration des Blutplasmas der Primärharn gebildet. Bei diesem Vorgang werden hochmolekulare Proteine (> 70 kDa) und Blutzellen zurückgehalten [1]. Durch Resorptions- und Sekretionsvorgänge im Tubulussystem und den Sammelrohren wird aus dem Primärharn der Endharn gebildet, der schließlich über das Nierenbecken in den Ureter ausgeschieden wird.

Der Raum zwischen den Nephronen und Sammelrohren heißt renales Interstitium und ist ein wichtiger Passageraum für Ionen und Wasser. Außerdem beherbergt das Interstitium verschiedene Zellen (z.B. Fibroblasten) sowie die renalen Blutgefäße. Verschiedene Bedingungen können zur Fibrosierung des Interstitiums und somit zur Dysfunktion oder gar Nierenversagen führen.

1.2 Nierenfibrose

Die renale Fibrose stellt für die meisten renalen Erkrankungen ein gemeinsames Endstadium dar. Fibrose ist ein pathologischer Prozess, der durch exzessive Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen, z.B. Kollagen und Fibronectin, in entzündeten Geweben definiert ist. Dieser Prozess kann zur irreversiblen Narbenbildung, bis hin zum Organversagen oder sogar Tod führen [3]. Die Prävalenz der chronischen Nierenerkrankungen beträgt bei Erwachsenen weltweit zwischen 10 % und 15 % [4] und zeigt in Europa jährlich eine steigende Inzidenz von 135 Patienten pro 1 Million Einwohner [5]. Mit 23 % sind Glomerulonephritiden und Diabetes mellitus Typ I und II die am häufigsten diagnostizierten Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz [6]. Laut QuaSi-Niere-Bericht von 2006/2007 weisen dabei 12 % der Dialysepatienten eine terminale Niereninsuffizienz aufgrund einer interstitiellen Nephritis auf [6]. Als Behandlungsmöglichkeiten für den Funktionsverlust der Nieren kommt dann nur noch eine Dialyse-Therapie oder die Nierentransplantation in Frage. Eine Nierenersatztherapie bedeutet neben enormen Kosten, die sich weltweit auf ca. 1 Billion Dollar belaufen, auch einen großen Verlust von Lebensqualität sowie eine geringere Lebenserwartung für den betroffenen Patienten [7].

1.2.1 Interstitielle Entzündung der Niere

In der Niere können verschiedene Schädigungsreize, wie Proteinurie [8], Wachstumsfaktoren, Hypertonie oder Hyperglykämie auf die Tubuluszellen einwirken und somit einen Entzündungsprozess auslösen (Abb. 1.2), der eine Wundheilung wie auch unter physiologischen Bedingungen initiiert. Unter physiologischen Bedingungen ist die

Wundheilung eine akute Immunantwort auf eine Verletzung und die Ablagerung von Kollagen stellt dabei einen notwendigen Prozess dar. Tritt jedoch eine gestörte Regulation der Wundheilung auf, können normale Gewebereparaturvorgänge in einer progressiven und irreversiblen Fibrosierung des Gewebes enden.

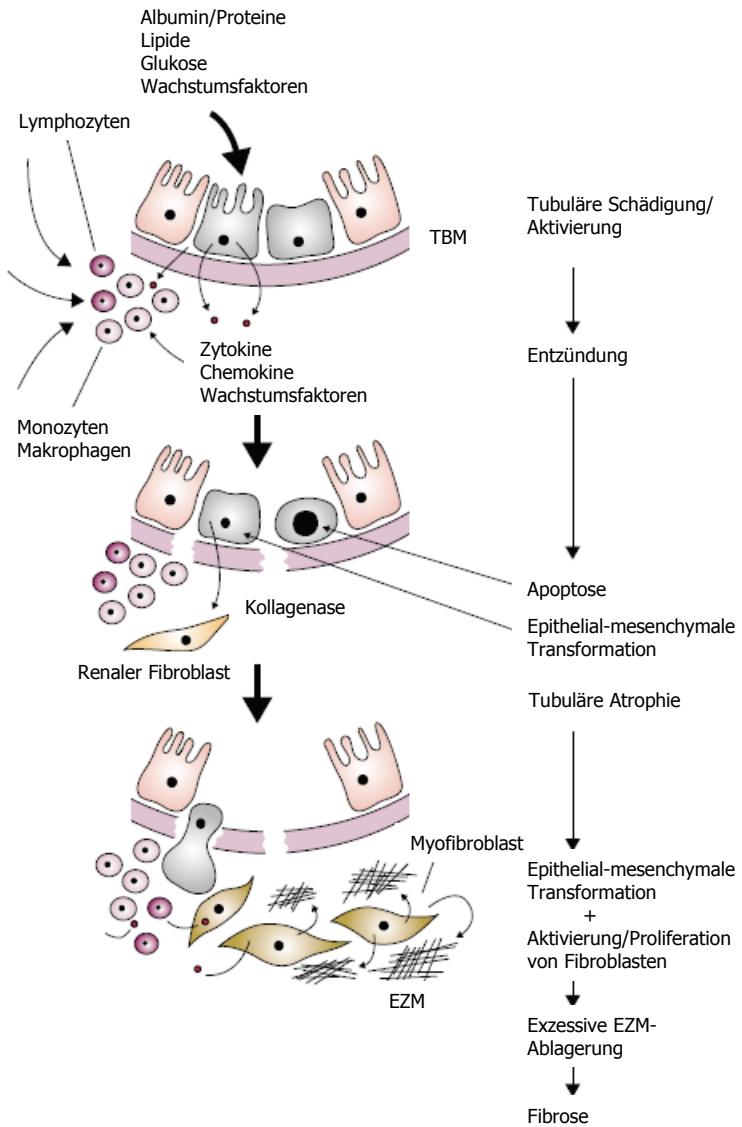


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der einzelnen Phasen in der tubulointerstitiellen Fibrose (modifiziert nach [5]).
TBM = Tubuläre Basalmembran; EZM = Extrazelluläre Matrix.

Die physiologische Wundheilung besteht aus drei Phasen: Entzündung, Proliferation und Remodellierung [9, 10]. Die Entzündungsphase startet unmittelbar nach der Verletzung des Endothels mit der Koagulation, indem Thrombozyten aggregieren und somit zunächst die Wunde verschließen [3]. Im Folgenden werden durch Hypoxie und Vasokonstriktion die zirkulierenden Thrombozyten, das Epithel und Endothel aktiviert, sodass verschiedene Mediatoren, wie VEGF (vascular endothelial growth factor), TGF- β (transforming growth

factor-beta) sowie andere Zytokine und Chemokine, freigesetzt werden [11]. Diese freigesetzten Faktoren locken inflammatorische Monozyten und neutrophile Granulozyten an, sodass Fibroblasten aktiviert und die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen (EZM) stimuliert werden [11]. In der Proliferationsphase wird das Gewebe durch Neoangiogenese sowie Fibroblasten und anderen Zellen neu aufgebaut. In der letzten physiologischen Phase der Wundheilung wird die Proliferation der eben genannten Zellen normalisiert, die Produktion der entzündungsfördernden Faktoren reduziert, sodass die Remodellierung des Gewebes abgeschlossen werden kann [11].

Wird die Niere geschädigt, kommt es zum Verlust von funktionsfähigen Nephronen. Um diesen Verlust zu kompensieren, erfahren die restlichen Nephrone eine Hypertrophie und die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) steigt an [8]. Durch diese hämodynamischen Veränderungen werden die Poren in der glomerulären Filtrationsbarriere vergrößert, sodass nun auch großmolekulare Proteine (z.B. Albumin) passieren können. Eine Proteinurie, die eine übermäßige Ausscheidung von Proteinen über den Urin beschreibt, entsteht. Die Proteinurie kann dabei sowohl die Folge einer Nierenerkrankung sein als auch das Fortschreiten einer tubulointerstitiellen Nierenentzündung begünstigen [12]. Im Folgenden werden diese Proteine in proximalen Tubuluszellen vermehrt resorbiert, was die Produktion von inflammatorischen Mediatoren, wie MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), RANTES (regulated and normal T cell expressed and secreted) oder IL-8 (Interleukin-8) stimuliert [12, 13]. Die freigesetzten Mediatoren wiederum locken inflammatorische Zellen an, sodass Fibroblasten aktiviert, Proteine der EZM abgelagert und die Entzündungsphase initiiert werden (Abb. 1.2). Während jedoch beim akuten Wundheilungsprozess die Entzündungsphase nach Regeneration des Gewebes aufgelöst wird, entsteht bei der tubulointerstitiellen Nephritis aufgrund einer chronischen, nicht aufgelösten Entzündung ein Teufelskreis aus Entzündung, Gewebeschaden, Akkumulation von EZM und schließlich Fibrose, die mit irreversibler Vernarbung des Nierenparenchyms und Funktionsverlust einhergeht. Welche Faktoren jedoch die physiologische Wundheilung oder die pathologischen Entzündungsprozesse begünstigen, ist bis heute noch nicht umfassend verstanden.

1.2.2 Mechanismus der renalen Fibrose

Der molekulare Mechanismus der tubulointerstitiellen Fibrose und der damit einhergehende Funktionsverlust der Niere ist aufgrund der hohen Komplexität und der Beteiligung vieler verschiedener Zelltypen an diesem Prozess noch nicht vollständig geklärt. Postuliert werden hauptsächlich fünf Mechanismen, die zur verstärkten Akkumulation extrazellulärer Matrix

beitragen: Aktivierung interstitieller Fibroblasten, Differenzierung von Perizyten, phänotypische Transition von Tubulusepithel-/endothelzellen und die Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten (Abb. 1.3) [14].

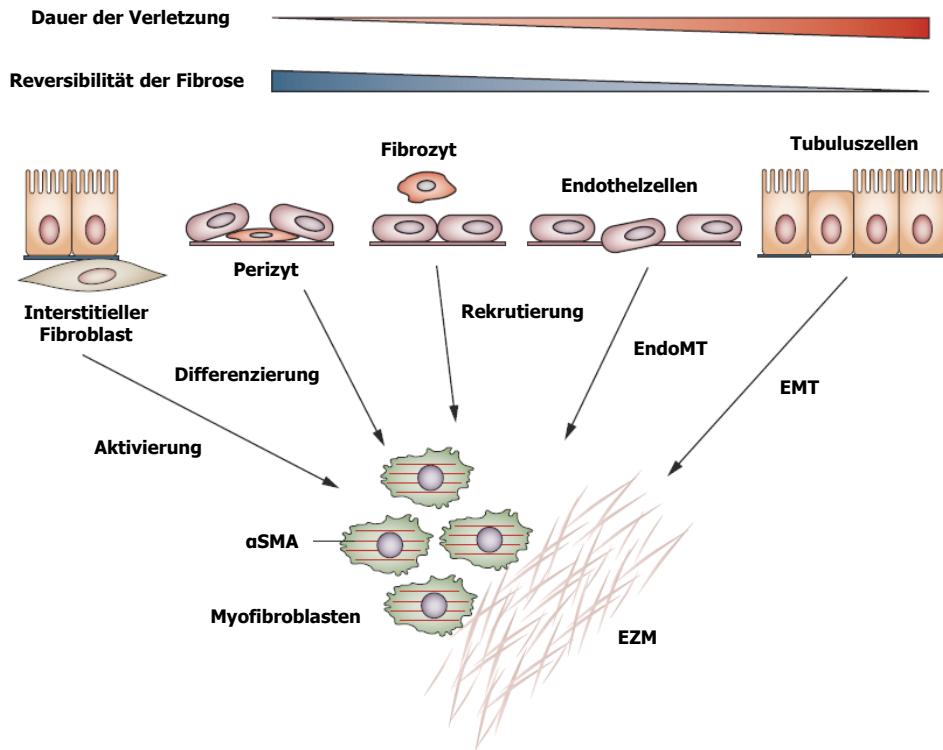


Abb. 1.3 Ursprung der Myofibroblasten in der renalen Fibrose. Myofibroblasten können aus mindestens fünf verschiedenen Zelltypen und den damit zugrundeliegenden Mechanismen entstehen: phänotypische Aktivierung von interstitiellen Fibroblasten; Differenzierung aus vaskulären Perizyten; Rekrutierung von zirkulierenden Fibrozyten; kapillare EndoMT (endothiale-mesenchymale Transition); und tubuläre EMT (epitheliale-mesenchymale Transition). α SMA = alpha-smooth muscle actin. Modifiziert nach [14].

Jeder dieser fünf möglichen Mechanismen führt zunächst zur Entwicklung/Differenzierung in Myofibroblasten, die schließlich zur vermehrten Akkumulation der EZM führen. Myofibroblasten sind als aktivierte Kollagen-produzierende und α SMA⁺ (alpha smooth muscle actin) Fibroblasten definiert [15] und sind nur unter pathologischen Bedingungen zu finden [16, 17]. Sie werden als Hauptproduzenten der EZM im Rahmen der tubulointerstitiellen Fibrose vermutet [18]. Eine Studie von Lin *et al.* zeigte in Reportermäusen, in denen die eGFP (enhanced green fluorescent protein)-Expression unter der Kontrolle des Kollagen I α 1 Promotors steht, dass 7 Tage nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO) fast alle (98 %) Kollagen I α 1⁺ Zellen im Interstitium α SMA exprimierten. Jedoch zeigte sich umgekehrt keine vollkommene Korrelation. Denn in 25 % der α SMA⁺ Zellen wurde keine eGFP-Expression, d.h. keine Kollagen I-Expression, mittels Immunfluoreszenz detektiert [19].

Welchen Beitrag die einzelnen Mechanismen tatsächlich zur vermehrten Akkumulation der EZM im Fibrosierungsprozess leisten, ist noch nicht abschließend geklärt. Im Folgenden Kapitel werden die fünf möglichen Ursprungszellen der Myofibroblasten kurz beschrieben.

1.2.3 EZM-produzierende Zellen in der renalen Fibrose

In der Nierenfibrose wurden verschiedenen Zellpopulationen beschrieben, die zur exzessiven Ablagerung von Kollagen I führen. Um den Beitrag der einzelnen Zelltypen für die Fibrosierung des Organs zu erforschen, fehlen jedoch zellspezifische Marker, die nur das Ausschalten der jeweiligen Zelle in dem komplexen Prozess ermöglichen. Allerdings gestattet die Kombination von mehreren Oberflächenmolekülen die Analyse der EZM-produzierenden Zellen.

Fibroblasten

Fibroblasten sind mesenchymale sternförmige Zellen, die sich im Interstitium der gesunden Niere befinden und für die Aufrechterhaltung der Gewebestruktur zuständig sind [14, 17]. Fibroblasten exprimieren CD73 (Ekto-5'-Nukleotidase), PDGFR β (Platelet-derived growth factor receptor β) und FSP1 (fibroblast-specific protein 1) [20]. Diese und andere Marker charakterisieren zwar den Phänotyp der Fibroblasten, jedoch werden sie auch auf anderen Zellpopulationen innerhalb der Niere exprimiert (s. Tab. 1.1). Bis heute fehlen spezifische Oberflächenmarker, um Fibroblasten eindeutig von anderen Zelltypen abzugrenzen. Erschwert wird die Identifizierung der Fibroblasten unter anderem auch durch ihre Heterogenität innerhalb eines Gewebes, auch topographische Differenzierung genannt [21]. Fibroblasten werden durch verschiedene Mitogene, wie PDGF, TGF- β , FGF2 (fibroblast growth factor 2), CTGF (connective tissue growth factor) oder t-PA (tissue-type plasminogen activator) aktiviert und sind daraufhin durch zwei Eigenschaften charakterisiert: Proliferation und einen α SMA $^+$ Myofibroblasten-Phänotyp [14]. Insbesondere bei der Wundheilung wird den Fibroblasten eine wichtige Rolle zugeschrieben, aber sie werden auch mit verschiedenen Krankheiten, wie Fibrose, assoziiert [21]. Zudem produzieren Fibroblasten das Glykoprotein-Hormon Erythropoietin (EPO) [22] und sind damit maßgeblich an der Erythropoese beteiligt. In der renalen Fibrose reduzieren Fibroblasten ihre EPO-Produktion drastisch, sodass Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung meistens eine renale Anämie entwickeln [7].

Perizyten

Perizyten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs mit mehreren Zellfortsätzen. Sie lagern sich von außen um die Endothelzellwände der Blutgefäße an und erhöhen somit deren Stabilität. In der Niere sind Perizyten um die peritubulären Kapillaren lokalisiert und laut Lin *et al.* der primäre Ursprung für Myofibroblasten, aber auch für die exzessive Ablagerung von Kollagen I in der renalen Fibrose verantwortlich [19]. Es wird vermutet, dass Perizyten vor allem durch Verletzungen der Blutgefäße und der dabei freigesetzten vaskulären Faktoren zur Ablösung von der Gefäßwand, Migration und Differenzierung in Myofibroblasten angeregt werden. Es bleibt die Frage offen, ob die Entwicklung der Fibrose zur Ablösung der Perizyten von den Gefäßwänden, somit zur Destabilisierung und Rarefizierung der Gefäße und folglich zu chronisch-ischämischen Prozessen in Nierenerkrankungen führen. Wie bei den Fibroblasten fehlen auch hier zellspezifische Marker, die Perizyten eindeutig von anderen Zellen abgrenzen.

EMT (Epitheliale-mesenchymale Transition)

EMT beschreibt eine Transdifferenzierung von Epithelzellen durch phänotypische und morphologische Änderungen der epithelialen Eigenschaften in einen mesenchymalen Zelltyp [20, 23, 24]. Dabei verlieren die Epithelzellen ihre Polarität und Adhäsion durch Herunterregulation der Genexpression von Adhäsionsproteinen, z.B. E-Cadherin [25], und exprimieren im Gegenzug charakteristische Myofibroblastenmarker, wie FSP1, Vimentin und α SMA. *In vitro* konnte dieser Vorgang insbesondere durch die Zugabe von TGF- β stimuliert werden [25, 26]. *In vivo* konnte jedoch keine Bestätigung für EMT in der interstitiellen Fibrose geliefert werden [26].

EndoMT (Endothiale-mesenchymale Transition)

Ähnlich der EMT findet bei der EndoMT eine Transdifferenzierung von tubulären Endothelzellen zu Myofibroblasten statt. Die Transition wird ebenfalls durch TGF- β gefördert, BMP-7 (Bone morphogenetic protein-7) hingegen inhibiert die phänotypische Differenzierung der Endothelzellen zu Myofibroblasten sowie die Progression der Fibrose [27-29].

Fibrozyten

Fibrozyten sind ebenfalls als Ursprungszellen der Myofibroblasten bekannt [30] und werden als aus dem Knochenmark stammende Zellen definiert, die Kollagen I und andere

Bindegewebsproteine, wie Vimentin, Kollagen III und Fibronectin, produzieren [31, 32]. Sie wurden zum ersten Mal 1994 von Bucala *et al.* als zirkulierende spindelförmige Leukozytenpopulation beschrieben, die nicht nur charakteristische mesenchymale Marker exprimieren, sondern auch positiv für eine Reihe hämatopoetischer Oberflächenmarker, wie CD45, CD11b und CD34, sind [31]. Das Vorhandensein dieser Marker ist vom Differenzierungsstatus der Fibrozyten abhängig, denn die Expression einiger hämatopoetischer Marker verliert sich im Laufe des Reifungsprozesses [33-35]. Den Fibrozyten wird eine wichtige Rolle sowohl bei der physiologischen Wundheilung als auch eine Beteiligung an pathologischen Prozessen zugeschrieben. Eine genauere Beschreibung dieser Zellpopulation erfolgt im nächsten Kapitel.

Zur besseren Übersicht sind in Tab. 1.1 die verschiedenen EZM-produzierenden Zellpopulationen und die von ihnen exprimierten Marker zusammengefasst.

Tab. 1.1 Marker einiger EZM-produzierender Zellen in der renalen Fibrose (nach [7, 14, 33]).

Marker	Myofibroblast	Fibroblast	Perizyt	Fibrozyt	Expression in anderen Zellpopulationen
αSMA	✓	-	✓	✓	Glatte Muskelzellen, verletzte Mesangialzellen
Vimentin	✓	✓	✓	✓	Glatte Muskelzellen, Mesenchymale Stammzellen, Mesangialzellen, Podozyten, verletzte Tubuli
PDGFRβ	✓	✓	✓	-	Glatte Muskelzellen, Mesenchymale Stammzellen, Mesangialzellen, Makrophagen
S100A4	✓	✓	-	-	Glatte Muskelzellen, Inflammatorische Zellen, Tubuluszellen
CD73	✓	✓	✓	-	T-Zellen, Tubuluszellen, Mesangialzellen
CD45	-	-	-	✓	alle Leukozyten
CD34	-	-	-	✓	hämatopoetische Zellen, Endothelzellen, Stromazellen
CD11b	-	-	-	✓	Monozyten, NK-Zellen, Granulozyten
Kollagen I	✓	✓	-	✓	

1.3 Fibrozyten

Wie in Kapitel 1.2.3 bereits erwähnt, wurden zirkulierende Fibroblasten-ähnliche Blutzellen, die spezifisch in entzündetes Gewebe einwandern, zum ersten Mal 1994 von Bucala *et al.* charakterisiert [31]. Der Name „Fibrozyt“ für diese besonderen und mit ungefähr 0,5 % der Gesamtleukozyten seltenen Zellen war etabliert. In dieser Studie konnte sowohl im humanen als auch im murinen System gezeigt werden, dass Fibrozyten zahlreiche Fibroblasten-ähnliche Komponenten exprimieren, wie Vimentin, Kollagen I und III, Fibronektin, aber auch den Leukozytenmarker CD45 sowie den hämatopoetischen Stammzellmarker CD34. Zudem wurden auf humanen Fibrozyten die Marker CD11b, CD13, CD18, CD71 und auf murinen Fibrozyten CD11b und CD18 beschrieben. Darüber hinaus infiltrieren Fibrozyten zusammen mit anderen Zellen (u.a. Monozyten) innerhalb der ersten zwei Tage in eine Wundkammer, die Mäusen implantiert wurde. Die Abgrenzung der Fibrozyten von adhärierenden monozytären Zellen erfolgte dabei durch das Enzym Esterase, das unter anderem von Monozyten exprimiert wird.

Fibrozyten zeigen viele Eigenschaften, die für die physiologische Wundheilung von Bedeutung sind [36]. Nach Stimulation mit IL-1 β , einem der ersten Mediatoren in der Wundheilung, sekretieren Fibrozyten proinflammatorische Zytokine, wie TNF, IL-6, IL-8 und IL-10 [32, 36]. Des Weiteren entwickeln sie einen proangiogenen Phänotyp durch die Sekretion von verschiedenen Faktoren, wie VEGF, FGF2, IL-8, PDGF und hämatopoetische Wachstumsfaktoren [37]. Durch die Freisetzung dieser Faktoren fördern Fibrozyten die Migration, Proliferation und die Bildung von Kapillar-ähnlichen Strukturen durch Endothelzellen. Diese Prozesse sind für die Neoangiogenese in der Proliferationsphase der Wundheilung von enormer Bedeutung [11]. Chesney *et al.* konnten zudem zeigen, dass Fibrozyten Oberflächenmarker exprimieren, die für eine Antigenpräsentierung notwendig sind, nämlich Moleküle des MHC-Klasse-II-Komplexes (HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR) und die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 [38]. Außerdem konnten Fibrozyten eine Antigen-spezifische T-Zell Proliferation induzieren. Diese Eigenschaften zeichnen die Fibrozyten als wichtige Zellpopulation in der Progression der Wundheilung und der Remodellierung des Gewebes aus [36]. Bucala *et al.* suggerierten jedoch, dass Fibrozyten nicht nur in der frühen Phase der physiologischen Wundheilung von Bedeutung sind, sondern auch in einer Reihe pathologischer Prozesse (z.B. Autoimmunerkrankungen, s. Abb. 1.4), wie Fibrose, involviert sein könnten [31]. Daraufhin beschäftigten sich zahlreiche Studien sowohl mit dem Ursprung der Fibrozyten als auch mit ihrer Rolle bei inflammatorischen Erkrankungen.

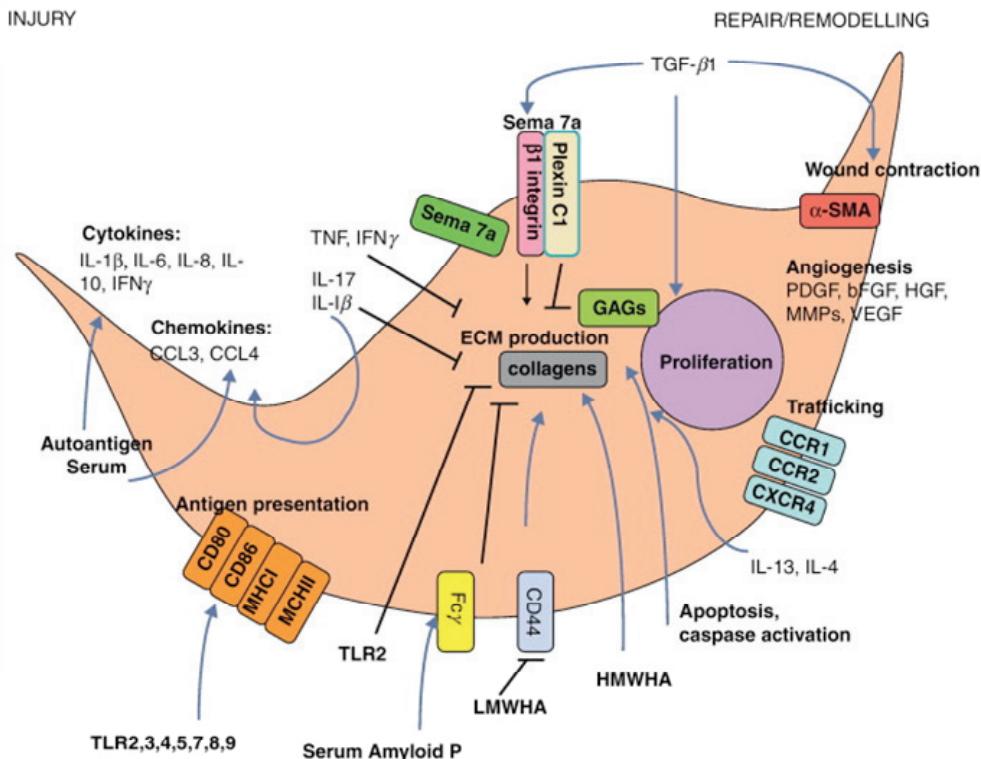


Abb. 1.4 Potentieller Einfluss von Fibrozyten in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. In Abhängigkeit vom lokalen Milieu weisen Fibrozyten eine starke phänotypische Plastizität auf. Nach akuter Verletzung, IL-1 β , IL-17, Serumfaktoren, Stimuli der angeborenen Immunität mit Toll-like Rezeptoren (TLR) und viralen Infektionen, nehmen die Fibrozyten einen proinflammatorischen Phänotyp an. Dies ist durch die Sekretion von IFN γ , IL-6, IL-8, CCL3, CCL4 und durch die gesteigerte Expression von MHC I, MHC II und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 charakterisiert. Nach Stimulation mit T_H2-Zytokinen, wie IL-4 und IL-13, ergibt sich ein eher reparativer Phänotyp der Fibrozyten, der durch die Produktion von EZM-Komponenten, z.B. Kollagen oder Glykosaminoglykan (GAGs), gekennzeichnet ist. Die Produktion von Kollagen wird durch hochmolekulare Hyaluronsäure (HMWHA) begünstigt und durch niedermolekulare Hyaluronsäure (LMWHA) inhibiert. Eine Reduktion von CD44 durch LMWHA hemmt dabei die Differenzierung der Fibrozyten. Eine TLR2-Aktivierung und Serum Amyloid A (SAP) mindern ebenfalls das Auswachsen der Fibrozyten. Die SAP-Effekte treten durch die Komponenten des Fc γ Rezeptors auf. Die Kollagen-Produktion wird zudem auch durch TGF- β 1 mittels Semaphorin 7a (Sema 7a) stimuliert. Dieser Effekt erfolgt durch die $\beta 1$ Integrin Untereinheit und wird von Plexin C1 verhindert. Des Weiteren stimuliert TGF- β 1 die Proliferation der Fibrozyten und die Wundkontraktion durch α SMA-Produktion. Die Angiogenese wird durch Sekretion von PDGF α , IL-10, VEGF, HGF, b-FGF gefördert und die Migration der Fibrozyten erfolgt durch die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CXCR4 [39].

1.3.1 Fibrozyten in der Nierefibrose und anderen Erkrankungen

In den letzten Jahren wurden Fibrozyten mit der Pathogenese von vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie Asthma, pulmonale Fibrose, kardiale Erkrankungen, nephrogene systemische Fibrose (NSF) und Leberfibrose in Verbindung gebracht [40] und in verschiedenen tierexperimentellen Modellen nachgewiesen [41-45]. Die Migration der Fibrozyten in die betroffenen Organe erfolgt dabei in Abhängigkeit der Chemokinrezeptoren CCR1 [46], CCR2 [46-49], CCR5 [50, 51] und CCR7 [52] sowie der Chemokine CCL3 [50], CCL21 [52], CCL12 [53], CXCL16 [54] und CXCL12 [35].

Broekema *et al.* analysierten im Modell der einseitigen renalen Ischämie-Reperfusion (IR) der Ratte, inwiefern die aus dem Knochenmark-stammende Zellen (BMDC, bone marrow derived cells) zu der Myofibroblasten-Population im Interstitium und zu der EZM-Produktion nach Ischämie Reperfusionsschaden (IRI) in der Niere beitragen [41]. Es wurden zunächst Knochenmark-chimäre Tiere generiert, indem Wildtyp-Ratten lethal bestrahlt wurden und mit Knochenmarkszellen aus R26-hPAP (humane plazentare alkalische Phosphatase) transgenen Ratten rekonstituiert wurden. Vier Wochen nach der Knochenmarkstransplantation wurde die linke renale Arterie für 45 Minuten abgeklemmt. Anschließend folgte die Reperfusion. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass nach Induktion des IRI BMD-Myofibroblasten (hPAP⁺ α SMA⁺ Zellen) über 30 % der gesamten α SMA⁺ Zellen im Interstitium der Niere ausmachen. Die BMDC in diesem Modell produzierten zudem Proteine der EZM und begünstigten damit die Wundheilung nach IRI. Da sowohl die Zahl der BMDC und die Expression der EZM Proteine postischämisch wieder abnahmen, postulierte die Gruppe eine vorteilhafte Rolle der BMDC in der Remodellierung des Gewebes nach IRI.

Bereits im Jahr 2003 wurden CD34⁺ spindelförmige Zellen im Interstitium von Glomerulonephritis-Patienten detektiert [55], jedoch erst 2006 von Sakai *et al.* im murinen UUO-Modell als Fibrozyten identifiziert. Dabei infiltrierten CD45⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten vermehrt in das Interstitium der ligierten Niere und die Zahl der infiltrierten Fibrozyten stieg mit der Progression der Nierenfibrose bis Tag 7 nach Ureterobstruktion kontinuierlich an [52]. Zusätzlich wurde mittels Immunfluoreszenz die Anwesenheit von CCR7⁺ CCR2⁺ CXCR4⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten festgestellt. Aus diesem Grund wurde die UUO in CCR7-defizienten Mäusen und anti-CCL21 Antikörper-behandelten Mäusen durchgeführt. CCL21 ist der Ligand für CCR7 und wurde unter anderem als chemotaktischer Stimulus für Fibrozyten beschrieben [34]. Die Zahl der CD45⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten sowie die Ausbildung der renalen Fibrose war sowohl in anti-CCL21 Antikörper-behandelten als auch CCR7-defizienten Mäusen signifikant reduziert [52]. In einer weiteren Studie wurden die aus dem Knochenmark stammenden Fibrozyten ebenfalls in der ligierten Niere und Milz von Kollagen I-GFP Knochenmark-chimären Mäusen detektiert [19]. Die Autoren postulierten jedoch, dass Fibrozyten nur einen kleinen Teil der Kollagen I-produzierenden Zellen in der Nierenfibrose ausmachen und andere Zellen zur Progression der Erkrankung führen müssen.

Die Beteiligung der aus dem Knochenmark-stammenden Fibrozyten an der Pathogenese der kardialen Fibrose wurde anhand der Überexpression der proapoptotischen Proteinkinase Mst1

(Mammalian sterile 20-like Kinase 1) in transgenen Mäusen, einem Modell der dilatierten Kardiomyopathie, eingehend untersucht [45]. Nach der Herstellung von GFP Knochenmark-chimären Mst1- und Wildtyp-Mäusen wurde die Infiltration von GFP⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten im Myokardium analysiert. Es zeigte sich, dass in Mst1 Knochenmark-chimären Mäusen im Vergleich zu gesunden Herzen der Wildtyp-Mäuse signifikant mehr Fibrozyten in die betroffenen Herzen rekrutiert wurden. Dabei wurde in 17 % aller Kollagen I⁺ Zellen ebenfalls eine GFP Expression detektiert und damit demonstriert, dass ein beträchtlicher Anteil der Fibroblasten aus Vorläufern, die aus dem Knochenmark rekrutiert werden, entsteht. Gleichzeitig wurde in Mst1-Mäusen eine höhere Expression des Chemokins SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) festgestellt. Da Fibrozyten den Chemokinrezeptor CXCR4 für den Liganden SDF-1 exprimieren, wurde die erhöhte Rekrutierung der Fibrozyten in Mst1-Mäusen mit diesem Faktor in Verbindung gebracht. Darüber hinaus wurde in Patienten mit einem Herzfehler eine höhere Konzentration von SDF-1 im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen. Diese Resultate unterstützen die Hypothese der SDF-1 abhängigen Fibrozyten-Rekrutierung in der kardialen Fibrose.

Im Modell der Bleomycin-induzierten pulmonalen Fibrose bei GFP Knochenmark-chimären Mäusen zeigten Hashimoto *et al.*, dass mehr als 27 % der GFP⁺ Zellen im fibrotischen Lungengewebe Kollagen I exprimieren [42]. Diese Zellen stellten 80 % der gesamten Kollagen I-produzierenden Zellen in der fibrotischen Lunge dar. Damit ließ sich suggerieren, dass der größte Teil der Kollagen-produzierenden Zellen in der Fibrose aus dem Knochenmark stammt und in die Lunge rekrutiert wird.

Die Studie von Schmidt *et al.* demonstrierte das Vorhandensein CD34⁺ Prokollagen I⁺ Fibrozyten in der Bronchialschleimhaut von chronischen Asthma-Patienten [44]. Die Zahl der doppelt-positiven Fibrozyten stieg nach Inhalation eines klinisch relevanten Allergens merklich an. Die Expression von CD34 auf ungefähr 40 % der gesamten α SMA⁺ Zellen deutete darauf hin, dass Fibrozyten aus dem peripheren Blut in das betroffene Gewebe eingewandert sind und dort zu Kollagen-produzierenden Myofibroblasten differenzierten. Ähnliche Resultate wurden auch in einem Maus-Modell des allergischen Asthmas erzielt und wiesen darauf hin, dass Fibrozyten die Vorläufer der bronchialen Myofibroblasten darstellen und zur Genese der subepithelialen Fibrose in Asthma-Patienten beitragen.

Den Fibrozyten wurde auch eine Rolle bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoide Arthritis (RA), Sklerodermie und Graves' Ophthalmopathie zugeschrieben [40]. Eine Beteiligung der Fibrozyten in der RA wurde in zwei Studien von Galligan *et al.* demonstriert [43, 56]. Zum einen wurden Fibrozyten aus dem peripheren Blut von RA-Patienten isoliert und zum anderen in einem Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) untersucht. In RA-Patienten konnte eine signifikant höhere phosphospezifische Aktivierung der humanen Fibrozyten anhand der MAP (mitogen-activated protein) Kinase und STAT (signal transducer and activator of transcription) Aktivierung im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden. Diese aktivierte Fibrozyten werden vermutlich zu den RA-Gelenken rekrutiert, tragen dort zur Pannusbildung bei und differenzieren in Fibroblasten-ähnliche Synovialzellen (FLSZ). FLSZ sekretieren viele proinflammatorische Mediatoren und sind deshalb kritische Effektorzellen in der inflammatorischen Regulation der RA. Im Tierexperiment wurde in der frühen Phase der Erkrankung, vor dem Auftreten von charakteristischen Symptomen, eine höhere Zahl von aktivierte Fibrozyten im Blut der CIA-Mäuse im Vergleich zu Kontroll-Mäusen festgestellt. Des Weiteren wurden profunde inflammatorische Infiltrate von CD45⁺ α SMA⁺ Fibrozyten in den entzündeten Gelenken der CIA-Mäuse identifiziert. Darüber hinaus zeigte der adoptive Transfer von zirkulierenden CD34⁺ VEGFR⁺ Fibrozyten eine schwerere Arthritis und gesteigerte Inflammation der Gelenke. Die Signalkaskaden, die zu den spezifischen Effektorfunktionen der zirkulierenden Fibrozyten beitragen, bedürfen jedoch weiterer Aufklärung.

1.3.2 Monozyten als Vorläuferzellen der Fibrozyten

Der genaue Ursprung der Fibrozyten ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Mehrere Studien konnten jedoch *in vitro* zeigen, dass sich Fibrozyten aus einer Monozyten-Subpopulation entwickeln [31, 34, 57, 58] und sich durch eine Kombination verschiedener Marker von Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten abgrenzen lassen [33]. Zur Untersuchung der Fibrozytenvorläufer *in vitro* wurden im humanen System PBMC (peripheral blood mononuclear cells) aus dem peripheren Blut isoliert und entweder Gesamt-PBMC, CD14⁻ Zellen oder CD14⁺ Zellen in Kultur genommen [34]. In murinen Splenozyten wurden die Monozyten mithilfe der Oberflächenmarker CD11b, CD115, CD16/32 sowie Gr-1 depletiert und ebenfalls *in vitro* untersucht [58]. Nach 7 bis 14 Tagen Kultur wurde die Zahl der spindelförmigen CD45⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten bestimmt. Unter geeigneten Kulturbedingungen konnte jedoch nur ein kleiner Teil dieser CD14⁺ oder Gr-1⁺ Monozyten in

Fibrozyten differenzieren. Insbesondere die Anwesenheit von nicht aktivierte CD4⁺ T-Zellen steigerte die Differenzierung der Fibrozyten erheblich [34, 58]. Hingegen verhinderte die Depletion von CD4⁺ T-Lymphozyten aus murinen Splenozyten fast komplett das Auswachsen der spindelförmigen Fibrozyten in Kultur [58]. Weitere Faktoren, die die Differenzierung der Monozyten in Fibrozyten fördern, sind z.B. T_H2 Zytokine (insbesondere IL-13), TGF- β 1, Semaphorin7A und Angiotensin II [30, 58-61]. Als blockierende Faktoren wurden T_H1 Zytokine, SAP und kreuzvernetzte IgG beschrieben [58, 60, 62-65].

Die *in vitro* Differenzierung der Monozyten zu Fibrozyten lässt vermuten, dass Fibrozyten auch *in vivo* aus den klassischen Monozyten, die in entzündetes Gewebe eingewandert sind, entstehen. Fibrozyten sind jedoch auch im peripheren Blut von gesunden Patienten und in der Milz von naiven unbehandelten Mäusen zu finden [31, 66]. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, dass Fibrozyten nicht aus lokal infiltrierten Monozyten entstehen, sondern als bereits differenzierte oder teilweise differenzierte Kollagen-produzierende Zellen aus dem peripheren Blut oder der Milz in entzündetes Gewebe einwandern.

1.3.2.1 Subpopulationen der Monozyten in der Maus

Monozyten sind als mononukleäre nicht-proliferierende Zellen mit einem charakteristischen bohnenförmigen Nukleus und einer kurzen Halbwertszeit im Blut definiert [67]. In der Maus repräsentieren Monozyten etwa 1,5 bis 4 % und beim Menschen ungefähr 10 % der gesamten Leukozyten-Populationen im Blut [68, 69]. Die Monozyten entwickeln sich im Knochenmark aus den hämatopoetischen Stammzellen (HSC) [69]. Hierbei geht zunächst aus den HSC die gemeinsame myeloide Progenitorzelle (CMP, common myeloid progenitor) hervor, aus der wiederum der Granulozyten-Makrophagen Progenitor (GMP) entsteht und daraus schließlich die Monozyten heranreifen (s. Abb. 1.5). In einer Studie von Swirski *et al.* konnte gezeigt werden, dass nicht nur das periphere Blut, sondern auch die Milz einen beträchtlichen Speicher an Monozyten aufweist [70]. Diese Monozyten sind in der subkapsullären roten Pulpa der Milz lokalisiert und lassen sich durch fehlende Expression der Oberflächenmarker F4/80 und CD11c eindeutig von dendritischen Zellen und Makrophagen in der Marginalzone abgrenzen. Die Monozyten weisen zudem eine morphologische und phänotypische Heterogenität auf, die sich in der unterschiedlichen Größe, Granularität, Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren sowie deren Funktion äußert [67]. Die Migration der Monozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn erfordert die Expression des Chemokinrezeptors CCR2 und sowohl die Präsenz von MCP-3 als auch MCP-1 [71, 72]. Im Gegensatz zum Knochenmark ist die Mobilisation aus der Milz CCR2-unabhängig [70].

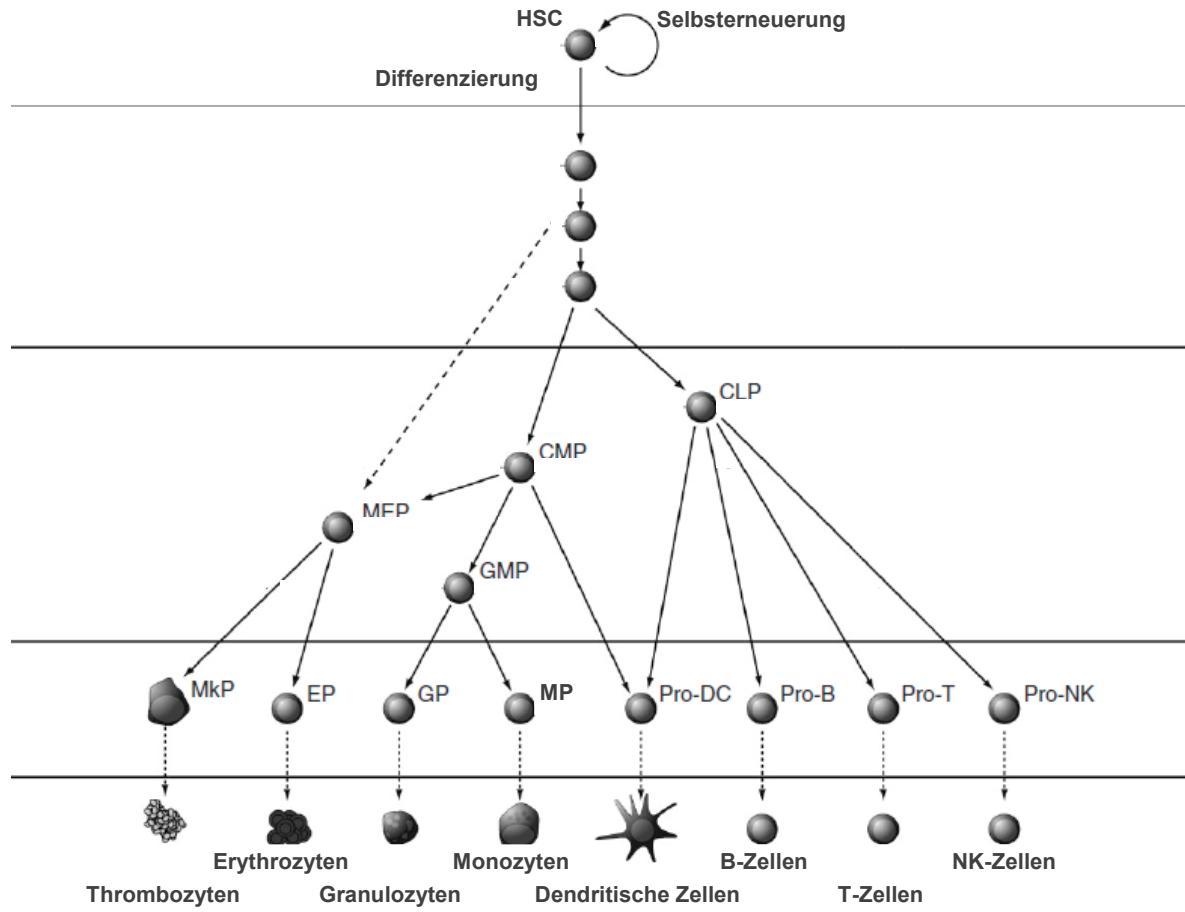


Abb. 1.5 Modell der hämatopoetischen Hierarchie. Die HSC befinden sich an der Spitze der Hierarchie und sind als selbsterneuernde Zellen definiert, aus denen alle hämatopoetischen Zellpopulationen entstehen. Während der Differenzierung verlieren die HSC ihre Selbsterneuerungskapazität. CLP, gemeinsame lymphoide Progenitoren; CMP, gemeinsame myeloide Progenitoren; DC, Dendritische Zellen; EP, Erythrozyten Progenitoren; GMP, Granulozyten-Makrophagen Progenitoren; GP, Granulozyten Progenitoren; HSC, hämatopoetische Stammzellen; MP, Monozyten/Makrophagen Progenitoren; MEP, Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitoren; MkP, Megakaryozyten Progenitoren; NK, Natürliche Killer. Modifiziert nach [73].

In der Maus wurden zwei funktional relevante Monozyten-Subpopulationen beschrieben: die sogenannten „inflammatorischen“ und „residenten“ Monozyten [67, 74]. Die inflammatorischen Monozyten sind $\text{Ly-6C}^{\text{high}}$ (Gr-1^+) $\text{CX3CR1}^{\text{low}}$ $\text{CCR2}^{\text{high}}$ CD62L^+ , haben eine kurze Halbwertszeit und werden zu entzündeten Geweben rekrutiert. Sie gelten als phänotypisches Äquivalent der humanen CD14^+ Monozyten. Die Migration der Monozyten vom peripheren Blut zum Entzündungsort wird von den Chemokinrezeptoren, wie CCR1 , CCR2 , CCR5 , CXCR1 , CXCR2 , CXCR4 , reguliert. Insbesondere Monozyten, die CCR2 und CCR5 exprimieren, sind bevorzugt in entzündeten Geweben anzutreffen [75, 76]. Dem Chemokinrezeptor CCR2 wird auch eine wichtige Rolle bei der gezielten Einwanderung in die entzündete Niere sowie der Etablierung eines renalen mononukleären Phagozytensystems zugeschrieben [77, 78]. Die zweite Subpopulation wird durch eine kleinere Größe

charakterisiert, ist Ly-6C^{low} (Gr-1⁻) CX3CR1^{high} CCR2⁻ CD62L⁻, hat eine längere Halbwertszeit *in vivo* und ist vor allem auch in nicht entzündeten Geweben vorzufinden. Mehrere Studien konnten zeigen, dass Gr-1⁻ Monozyten aus der Subpopulation der Gr-1⁺ entstehen [74, 79-81].

Des Weiteren wird den Monozyten eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunität zugeschrieben und sie werden als wichtige Verbindung zu Zellen des adaptiven Immunsystems angesehen. Monozyten können demnach Antigene aufnehmen und an T-Zellen präsentieren. Von T-Zellen wiederum können Monozyten ebenfalls eine Reihe von Signalen erhalten und aufgrund ihrer hohen Plastizität und in Abhängigkeit von entsprechenden Stimuli rasch ihren Phänotyp ändern.

1.3.2.2 Die Rolle von Monozyten in der Nierenfibrose

Die renale Fibrose ist oft mit monozytär-inflammatorischen Infiltraten assoziiert [7]. Nach der Rekrutierung der Monozyten zum Entzündungsort differenzieren diese in zwei unterschiedliche Subpopulationen, die sich in M1 (= Ly-6C^{high}) und M2 (= Ly-6C^{low}) Makrophagen kategorisieren lassen [14]. Während M1 Makrophagen sich durch einen proinflammatorischen Phänotyp und pathologische Funktionen auszeichnen, sekretieren M2 Makrophagen antiinflammatorische Zytokine und begünstigen die Wundheilung sowie die Remodellierung des Gewebes [82]. Durch die Depletion von Monozyten/Makrophagen in transgenen CD11b-DTR Mäusen [83, 84] oder durch die Verabreichung von Clodronat-haltigen Liposomen [85] im Modell der UUO konnte die Progression der renalen Fibrose verringert werden. Des Weiteren induzierten Duffield *et al.* mit der Gabe des Nephrotoxischen Serums bei CD11b-DTR Mäusen eine Glomerulonephritis und depletierten CD11b⁺ Makrophagen [86]. Bei diesem Modell wurde durch die Depletion der Makrophagen eine geringere Zahl α SMA⁺ Myofibroblasten und eine verminderte Ablagerung von Kollagen III und damit einhergehende interstitielle Fibrose festgestellt. Darüber hinaus wurde die Rekrutierung von CD4⁺ T-Lymphozyten in CD11b-depletierten Mäusen verringert. In einem weiteren Modell der Nierenerkrankung, der IR, demonstrierten Ko *et al.* in Ratten, dass auch hier die Depletion der Makrophagen mittels Clodronat-haltigen Liposomen eine günstige Auswirkung auf die persistente Inflammation sowie renale Fibrose hat [87].

Ob nun die Monozyten durch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und der damit erhöhten Infiltration anderer Zellpopulationen, z. B. T-Zellen, in die entzündete Niere die Pathogenese der Nierenfibrose begünstigen oder sie durch ihre hohe Plastizität und rasche Änderung ihres Phänotyps direkt an der Fibrosierung eines Organs beteiligt sind, ist noch

unklar. Aufgrund der vielen Oberflächenmarkern, die Monozyten mit anderen Zellpopulationen, wie Neutrophile Granulozyten, NK-Zellen [83] oder Dendritische Zellen [85] gemeinsam haben, und der Heterogenität der Monozyten, ist die Untersuchung der Monozyten-Funktion in der Nierenfibrose eine große Herausforderung.

1.4 Die Rolle von CD4⁺ T-Zellen bei der Fibrozytendifferenzierung und Entstehung einer Nierenfibrose

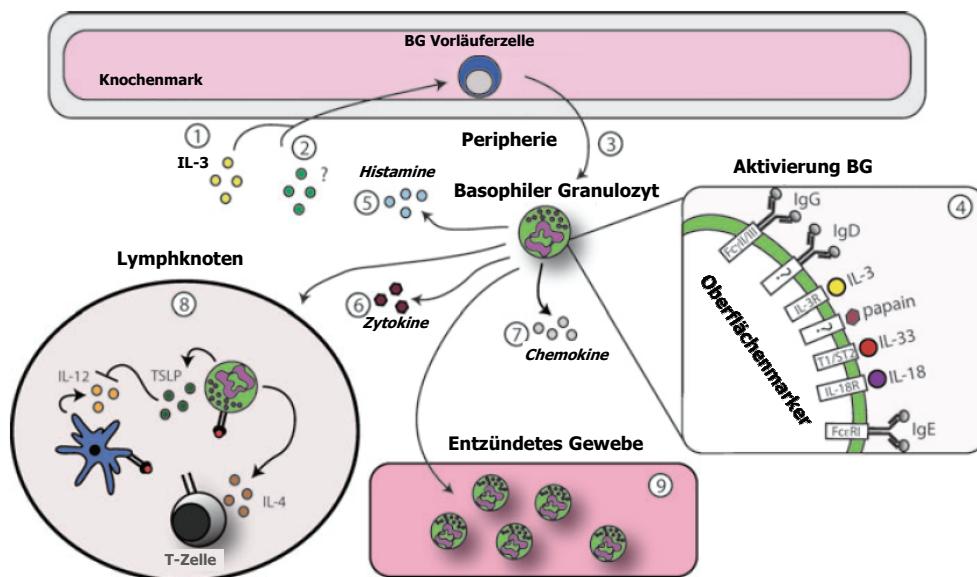
Fibrozyten sind bevorzugt bei Fibrosierungsprozessen vorzufinden und werden dabei oft durch andere inflammatorische Zellen, wie Monozyten, T- und andere Lymphozyten, begleitet [70, 88]. Lymphozyten werden dabei zum Entzündungsort rekrutiert und dort durch den Kontakt mit diversen Antigenen zur Produktion von verschiedenen Faktoren stimuliert. Die dadurch freigesetzten Faktoren aktivieren Makrophagen und andere inflammatorische Zellen. Viele Erkrankungen, die durch eine chronische Inflammation ausgelöst werden, zeichnen sich durch eine signifikante Aktivierung der adaptiven Immunantwort aus [15]. Insbesondere CD4⁺ T-Zellen wird eine wichtige Rolle in der Progression von vielen fibrotischen Erkrankungen zugeschrieben. Tapmeier *et al.* zeigten im tierexperimentellen Modell der renalen Fibrose, dass defiziente Mäuse für das Protein RAG1 (recombination-activating protein 1) einen geringeren fibrotischen Schaden ausbilden als entsprechende Kontroll-Mäuse [89]. RAG1^{-/-} Mäuse sind durch eine Mutation charakterisiert, die eine Differenzierung reifer T- und B-Zellen verhindert. Nach Rekonstitution der RAG1^{-/-} Mäuse mit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, konnten lediglich CD4⁺ T-Lymphozyten den Schweregrad der renalen Fibrose auf das Niveau der Wildtyp-Mäuse wiederherstellen. In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass die Infiltration von Makrophagen in die obstruierte Niere der RAG1^{-/-} Mäuse durch die Abwesenheit der Lymphozyten nicht beeinträchtigt ist [89].

Ähnliche Ergebnisse konnten nach Ureterligatur in T-Zell defizienten SCID (severe combined immunodeficiency) Mäusen beobachtet werden [58]. SCID Mäuse weisen eine spontane Mutation im PRKDC (protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide) Gen auf, und produzieren, wie RAG1^{-/-} Mäuse, keine reifen T- und B-Lymphozyten. Nach Ureterligatur wurde nicht nur die geringere Ablagerung von Kollagen I als Marker der Fibrose in SCID Mäusen festgestellt, es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Abwesenheit der Lymphozyten die Bildung von Fibrozyten in der fibrotischen Niere signifikant verhindert.

1.5 Die Rolle Basophiler Granulozyten bei Nierenerkrankungen

Basophile Granulozyten wurden 1879 von Paul Ehrlich zum ersten Mal beschrieben und repräsentieren weniger als 1 % der zirkulierenden Leukozyten im peripheren Blut. Basophile Granulozyten begünstigen die Pathogenese allergischer Entzündungen, regulieren die T_H2 T-Zelldifferenzierung sowie das immunologische Gedächtnis und agieren auch als Antigen-präsentierende Zellen [90].

Aktivierte Basophile Granulozyten können verschiedene Zytokine (z.B. IL-4, IL-6, IL-13, TSLP), Histamine und Leukotriene sezernieren (s. Abb. 1.6) [91]. Die Freisetzung dieser Mediatoren wird durch Kreuzvernetzung der hochaffinen Fc-Rezeptoren für IgG oder IgE, unterschiedliche Zytokine (z.B. IL-3, IL-33) und Chemokine (z.B. CCL2, CCL5) sowie viele andere stimulierende Faktoren ausgelöst [91]. *In vivo* konnte insbesondere das Zytokin IL-3 für die spezifische Expansion von Basophilen Granulozyten verantwortlich gemacht werden [92]. Dieses hauptsächlich von CD4⁺ T-Zellen freigesetzte Zytokin ist ein wichtiger hämatopoetischer Wachstumsfaktor und stimuliert nicht nur die Bildung von Basophilen Granulozyten, sondern auch von anderen Granulozyten-, Erythrozyten-, Megakaryozyten-, und Monozytenkolonien [93].



Basophile Granulozyten könnten in der Entstehung von Nierenerkrankungen eine wichtige Funktion einnehmen, da sie insbesondere eine bedeutende Rolle bei der T_{H2} Polarisierung von $CD4^+$ T-Zellen, B-Zell Proliferation, Produktion von Immunglobulinen [95] und Plasmazellüberleben [96] spielen. Im systemischen Lupus erythematoses (SLE), einer systemischen Autoimmunerkrankung, die alle Organe betrifft, insbesondere aber in der Niere zur sogenannten Lupusnephritis führen kann, wurde die Rolle Basophiler Granulozyten und dem von ihnen erzeugten T_{H2} -Zytokinmilieu genauer untersucht [97]. Murine Basophile Granulozyten beeinflussten dabei die Produktion der Autoantikörper, insbesondere die Zirkulation von autoreaktivem IgE, und somit die Progression der Nephritis. Zudem aktivierten die gebildeten IgE Immunkomplexe Basophile Granulozyten. Eine Elimination der autoreaktiven IgE oder IL-4 Produktion unterdrückte die Ausbildung der renalen Erkrankung. Inwiefern Basophile Granulozyten im Modell der tubulointerstitiellen Fibrose die Entstehung von Fibrozyten oder eine Fibrosierung begünstigen, wurde bisher noch nicht untersucht.

1.6 Unilaterale Ureterobstruktion als Modell der renalen Fibrose

Um Untersuchungen zum Mechanismus der tubulointerstitiellen Nierenfibrose im Tiermodell durchzuführen, gibt es verschiedene experimentelle Ansätze [98]. Zum einen stehen verschiedene Knockout-Mäuse zur Verfügung, z.B. $Col4\alpha3^{-/-}$ [99] oder $NEPH1^{-/-}$ [100] Mäuse. Der renale Schaden, der aufgrund der genetischen Deletion dieser Proteine verursacht wird, ist unterschiedlich ausgeprägt und führt entweder schon in der frühen postnatalen Phase oder nach wenigen Monaten zum Tode. Zum anderen stehen Modelle der chronischen Niereninsuffizienz zur Verfügung, bei denen der Einsatz von Toxinen oder Antiseren notwendig ist, wie z.B. bei der Adriamycin Nephropathie [101] oder Nephrotoxischen Serum-Nephritis [102]. Zu beachten ist, dass die Wirkung der verabreichten Toxine und die konsekutive Progression der Nephritis zwischen den Mausstämmen und in Abhängigkeit der Herkunft des Toxins variieren.

In dieser Arbeit wurde das Modell der unilateralen Ureterobstruktion angewendet. Dieses Modell der interstitiellen Fibrose findet mittlerweile eine breite Anwendung und hat mehrere Vorteile [103, 104]. Die Durchführung der Operation zur Ligation des Ureters ist relativ unkompliziert. Der Schweregrad des renalen Schadens entwickelt sich über einen kurzen Zeitraum, ist konstant und kann vom Experimentator über die Dauer der Obstruktion kontrolliert werden. Die strukturellen Veränderungen sind zwischen den verschiedenen getesteten Versuchstieren gleichermaßen ausgeprägt und finden auch in Mäusen statt, sodass sich die Möglichkeit bietet gentechnisch veränderte Tiere im Modell der renalen Fibrose

einzusetzen und zu untersuchen. Des Weiteren wird die Fibrose bei der einseitigen Ureterligatur ohne den Einsatz von exogenen Toxinen induziert und ist nicht durch eine Urämie gekennzeichnet, da die kontralaterale nicht-ligierte Niere funktionsfähig bleibt.

Das Modell der UUO zeigt außerdem alle wichtige Merkmale eines typischen Fibrosierungsprozesses [98]: (I) eine erhöhte interstitielle Kapillarpermeabilität und den Influx von inflammatorischen mononukleären Zellen, insbesondere Makrophagen; (II) eine erhöhte Synthese von profibrotischen Molekülen, wie z.B. TGF- β ; (III) die Entstehung von Matrixproduzierenden Myofibroblasten; (IV) eine erhöhte Synthese von extrazellulären Matrixproteinen und deren Akkumulation; (V) ein progressiver Verlust von Tubuli durch Apoptose; (VI) eine progressive interstitielle Kapillar-Rarefizierung, Hypoxie und oxidativer Stress.

Bei der UUO zeigt sich zunächst ein Anstieg des Ureterdrucks im Verhältnis zum renalen Blutfluss. Unmittelbar nach der Durchführung der Ureterobstruktion verändert sich die renalen Hämodynamik und der Ureterdruck sowie der renale Blutfluss in der ligierten Niere steigen während der ersten 1,5 Stunden an [105]. Nach 1,5- bis 5-stündigen Dauer der Ureterligatur sinkt der renale Blutfluss im Gegensatz zum Ureterdruck, der weiter zunimmt. Nach 5-stündiger Dauer der Okklusion und im weiteren Verlauf sinken nun sowohl der renale Blutfluss als auch der Ureterdruck ab. Diese Beziehung zwischen dem renalen Blutfluss und dem Ureterdruck wurde von Vaughan *et al.* „dreiphasige Antwort“ genannt [105]. Neben dem Abfall des renalen Blutflusses führt die dauerhafte Okklusion des Ureters in den ersten 24 Stunden zum Absinken der GFR in der betroffenen Niere [105]. Die reduzierte GFR lässt sich auf den erhöhten intratubulären hydrostatischen Druck und somit die Umkehrung des normalen Filtrationsdruckgradienten durch die glomeruläre Kapillarultrafiltrationsfläche zurückführen [104]. Daraufhin wird der glomeruläre Kapillardruck aufgrund der voranschreitenden Vasokonstriktion reduziert und somit die Anzahl der funktionsfähigen Nephronen durch die Abnahme der zur Verfügung stehenden Ultrafiltrationsfläche vermindert.

Im weiteren Verlauf der UUO bildet sich durch die andauernde Stauung des Harns eine sogennante Hydronephrose aus, es kommt zur vermehrten inflammatorischen Zellinfiltration ins Interstitium, es findet tubulärer Zelltod und ein irreversibler Verlust des Nierenparenchyms statt sowie eine Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen, wie Kollagen I und III, und Fibronektin. Das Infiltrat der inflammatorischen Zellen ist vor allem durch Monozyten/Makrophagen, aktivierte T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen oder Neutrophile Granulozyten gekennzeichnet [106-108]. Im Modell der UUO bildet sich bereits

nach 5 bis 7 Tagen eine interstitielle Fibrose aufgrund der erhöhten Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine aus [58, 59]. In diesem Zeitraum können auch rekrutierte Fibrozyten in der ligierten Niere detektiert werden.

1.7 Zielsetzung

Die renale Fibrose stellt für die meisten Nierenerkrankungen ein gemeinsames Endstadium dar. Der molekulare Mechanismus der tubulointerstitiellen Fibrose und der damit einhergehende Funktionsverlust der Niere sind jedoch aufgrund der hohen Komplexität und der Beteiligung von vielen verschiedenen Zelltypen an diesem Prozess noch nicht vollständig geklärt. Die Rolle der aus dem Knochenmark-stammenden Fibrozyten wird zunehmend besser verstanden. Zahlreiche *in vitro* Untersuchungen ergaben wichtige Hinweise auf die Vorläuferzellen der Fibrozyten. Allerdings konnte dies bisher *in vivo* noch nicht bestätigt werden. Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit der Phänotyp von Fibrozyten anhand der Expression von CD115, CCR2, Gr-1, Ly-6G und Ly-6C im murinen Modell der renalen Fibrose charakterisiert werden. Dabei soll insbesondere untersucht werden, ob Fibrozyten auch *in vivo* aus den klassischen infiltrierenden proinflammatorischen Monozyten entstehen. Daraufhin sollen Monozyten und Fibrozyten differentiell mit den monoklonalen Antikörpern anti-CCR2, anti-Gr-1 und Diphtherie Toxin in Knochenmark-chimären Mäusen depletiert und daraufhin die Zahl der Fibrozyten und die Progression der Nierenfibrose im Modell der Unilateralen Ureterobstruktion untersucht werden.

Die Bedeutung der CD4⁺ T-Zellen für die Entwicklung der Fibrozyten *in vitro* konnte bereits durch Vorarbeiten eindrucksvoll demonstriert werden. Weiterhin zeigten *in vivo* Untersuchungen in T- und B-Zell defizienten Mäusen die Wichtigkeit der Lymphozyten bei der Fibrozytendifferenzierung. Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb die Rolle der CD4⁺ T-Zellen bei der Fibrozytendifferenzierung *in vivo* bestätigt werden. Für diese Untersuchung soll eine *in vivo* Depletion der CD4⁺ T-Zellen mit dem Antikörper GK1.5 durchgeführt werden. Anschließend soll die renale Fibrose mittels einseitiger Ureterligatur induziert und die Zahl der Fibrozyten sowie die Progression der Nierenfibrose bestimmt werden.

Darüber hinaus soll die Rolle von Basophilen Granulozyten bei der Fibrozytenentstehung im UUO-Modell analysiert werden. Basophile Granulozyten könnten in der Entstehung von Nierenerkrankungen eine wichtige Funktion einnehmen, da sie insbesondere eine bedeutende Rolle bei der T_H2 Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen spielen. In der vorliegenden Dissertation sollen Basophile Granulozyten in ureterobstruierten Mäusen zunächst mit dem monoklonalen Antikörper anti-FcεRIα depletiert und schließlich mit dem Zytokin/Anti-Zytokin Antikörper

Immunkomplex IL-3/anti-IL-3 aktiviert werden. Dabei soll auch die Funktion von IL-3 nicht nur als Aktivator Basophiler Granulozyten, sondern als Effektorzytokin in der Entwicklung der Nierenfibrose und der Zahl der Fibrozyten Gegenstand dieser Arbeit werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Verwendung	Firma
Aceton	Immunfluoreszenz	Merck, Darmstadt
BD Cytofix/Cytoperm™	Intrazelluläre FACS-Färbung	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Lysing Solution	Extrazelluläre FACS-Färbung	BD Biosciences, Heidelberg
Diphtherie Toxin	Depletion von CD11b ⁺ Zellen	Sigma Aldrich, Taufkirchen
dNTP Mix, 100 mM	RT-PCR	Natutec, Frankfurt am Main
Ethanol, absolut, min. 99,9 %	RNA-Isolation	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Fluorescent Mounting Medium	Immunfluoreszenz	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Glycerin	Unilaterale Ureterobstruktion	Sigma Aldrich, Taufkirchen
H ₂ O, PCR grade	RNA-Isolation, PCR	Qiagen, Hilden
Hoechst 33342	Immunfluoreszenz	Molecular Probes/Invitrogen, Eugene, USA
Methanol	Immunfluoreszenz	Merck, Darmstadt
PBS	<i>in vivo</i> Injektionen	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
RNasin (RNase Inhibitor) 40 U/μl	RT-PCR	Promega Corporation, Madison, WI, USA
RPMI 1640 Medium	Zellpräparation	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Intrazelluläre FACS-Färbung	Sigma aldrich, Taufkirchen
SuperBlock Blocking Buffer	Immunfluoreszenz	Thermo scientific, Rockford, USA
Tissue Tek®, OCT™ Compound	Kryopräparatherstellung	Sakura Finetek Europe B.V. Alphen aan den Rijn, Niederlande

Wasserstoffperoxid (H_2O_2), 30 %	Immunfluoreszenz	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Zusatz im RLT-Puffer	Sigma Aldrich, Taufkirchen

2.2 Narkose

Bezeichnung	Ansatz	Endkonzentration
Domitor/Medetomidinhydrochlorid (1 mg/ml)	1 ml	0,5 mg/kg
Fentanyl – Injektionslösung (0,1 mg)	2 ml	0,05 mg/kg
Midazolam/Dormicum (5 mg/5 ml)	10 ml	5,0 mg/kg

2.3 Antagonist

Bezeichnung	Ansatz	Endkonzentration
Antisedan/Atipamezolhydrochlorid (5 mg/ml)	0,5 ml	2,5 mg/kg
Flumazenil (0,5 mg/5 ml)	5 ml	0,5 mg/kg
Naloxon – Injektionslösung (0,4 mg/ml)	3 ml	1,2 mg/kg

2.4 Puffer

Bezeichnung	Verwendung
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, 10x), pH 7,4 1,8 mM KH_2PO_4 10,3 mM Na_2HPO_4 137 mM NaCl 2,7 mM KCl ₂ in Aqua dest	Waschpuffer bei diversen Methoden
Zellpräparationsmedium RPMI 1640 Medium 10 % FCS (hitzeinaktiviert)	Herstellung von Einzelzellsuspensionen

2.5 Sonstige Materialien

Bezeichnung	Verwendung	Firma
384-well Mikrotiterplatte, transparent	qPCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Basisplatte, 25 x 35 cm (18200-04)	Unilaterale Ureterobstruktion	Fine Science Tools, Heidelberg
Cell Strainer (70 µm)	Herstellung von Einzelzellsuspensionen	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Einmalskalpell (No. 10, No.11)	Präparation von Gewebe	Pfm, Köln
Einmalspritzen (1 ml)	Injektionen	BD Biosciences, Heidelberg
Elastomer	Unilaterale Ureterobstruktion	Fine Science Tools, Heidelberg
Fettstift, Liquid Blocker	Immunfluoreszenz	Science Services GmbH, München
Fixator, 5 cm (18200-02)	Unilaterale Ureterobstruktion	Fine Science Tools, Heidelberg
Kanülen BD Microlance 3 (27G x ¾'', 26G x ½'')	Injektionen	BD Biosciences, Heidelberg
Lysing Matrix D Reaktionsgefäß, 2 ml	Homogenisierung von Gewebe	MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA
Objektträger, SuperFrost® PLUS Beschichtung	Immunfluoreszenz	Thermo scientific, Rockford, USA
Operationsbesteck: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Dumont #7 Pinzette, 11,5 cm (11273-20) ▪ Extra feine Graefe Pinzette, gebogen, 10 cm (11151-10) ▪ Extra feine Schere, gerade, 8,5 cm (14084-08) ▪ Graefe Pinzette, gerade, 10 cm (11050-10) ▪ Lexer-baby Schere, gebogen, 10 cm (14079-10) ▪ Semken Pinzette, gebogen, 13 cm (11009-13) 	Unilaterale Ureterobstruktion	Fine Science Tools, Heidelberg

▪ Semken Pinzette, gerade, 13 cm (11008-13)		
PCR-Versiegelungsfolien, selbstklebend, transparent	qPCR	Thermo scientific, Rockford, USA
Präparationsbesteck	Präparation von Gewebe	Fine Science Tools, Heidelberg
PreSeparation Filter (30 µm)	Herstellung von EinzelzellSuspensionen	Miltenyi Biotech, Berg. Gladbach
Prolene Nahtmaterial, 4-0 (1.5 Ph. Eur.), EH7692	Unilaterale Ureterobstruktion	Ethicon/Johnson&Johnson, Norderstedt
Reagenzröhre mit Schraubverschluss, Polypropylene, konisch, 50 ml, 15 ml	Zellbiologische Methoden	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzröhre, Polystyrene, Rundboden, 5 ml	FACS Färbungen	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Retraktor, stumpf, 2,5 cm (18200-10)	Unilaterale Ureterobstruktion	Fine Science Tools, Heidelberg
Vicryl Nahtmaterial, 3-0 (2 Ph. Eur.), V393	Unilaterale Ureterobstruktion	Ethicon/Johnson&Johnson, Norderstedt

2.6 Geräte

Bezeichnung	Verwendung	Firma
ABI PRISM 7900 HT detection system	qPCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Durchflusszytometer, FACS Calibur	FACS Analyse	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer, FACS Canto II	FACS Analyse	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenz-Mikroskop, Observer.Z1 mit AxioCam ERc 5s	Immunfluoreszenz	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Homogenisator, FastPrep®-24	RNA-Isolation	MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA
Kryostat CM3050S	Herstellung von Kryoschnitten	Leica, Wetzlar
NanoDrop®	Konzentrationsbestimmung von RNA	Peqlab, Erlangen
Operationsmikroskop, OPMI 1-FC	Unilaterale Ureterobstruktion	Carl Zeiss Meditec, Oberkochen
Zentrifuge, Centrifuge 5417 R	Molekularbiologische Methoden	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Megafuge 16 R	Herstellung von Einzelzell-suspensionen; FACS Färbungen	Thermo scientific, Rockford, USA

2.7 Kits

Bezeichnung	Verwendung	Firma
Avidin-Biotin-Blocking Kit	Immunfluoreszenz	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Lightning-Link™ R-Phyco- erythrin Conjugation Kit	Konjugation von MC-21 und MC-67	Innova Biosciences Ltd., Cambridge, Großbritannien
M-MLV Reverse Transkriptase, 200 U/µl	RT-PCR	Invitrogen™/Life Technologies GmbH, Darmstadt
QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit	qPCR	Qiagen, Hilden
Rnase-Free Dnase Set	RNA-Isolation	Qiagen, Hilden
Rneasy Midi Kit	RNA-Isolation	Qiagen, Hilden

2.8 Antikörper und Zytokine

Bezeichnung	Spezifität	Konjugat	Klon	Wirt/Isotyp	Hersteller
CCR2	Maus	PE	MC-21	Ratte IgG2b	eigene Herstellung
CCR2	Maus	-	MC-21	Ratte IgG2b	eigene Herstellung
CD11b	Maus	FITC	M1/70	Ratte IgG2b,κ	BD Biosciences
CD11b	Maus	PE	M1/70	Ratte IgG2b,κ	BD Biosciences
CD16/32, (Fc-Block)	Maus	Purified, NA/LE	2.4G2	Ratte IgG2b,κ	BD Biosciences
CD4	Maus	Purified, NA/LE	GK1.5	Ratte IgG2b,κ	eBioscience
CD45	Maus	FITC	30-F11	Ratte IgG2b,κ	BD Biosciences
CD45	Maus	BD V500	30-F11	Ratte IgG2b,κ	BD Biosciences
CD49b	Maus	PE	Hmalpha2	Hamster IgG1, κ	BD Biosciences
CD49b	Maus	APC	Dx5	Ratte IgM, κ	BD Biosciences
CD5	Maus	FITC	53-7.3	Ratte IgG2a, κ	BD Biosciences
CD8	Maus	APC	53-6.7	Ratte IgG2a, κ	BD Biosciences
F (ab') ₂ fragment of goat anti- rabbit IgG	Kaninchen	Alexa Fluor 594	-	Ziege IgG	Molecular Probes®/ Life Technologies GmbH
FcεRIα	Maus	Purified, NA/LE	MAR1	Ar. Hamster IgG	eBioscience
Gr-1	Maus	PE	RB6-8C5	Ratte IgG2b,κ	BD Biosciences
Gr-1	Maus	APC	RB6-8C5	Ratte IgG2b,κ	BD Biosciences
Gr-1	Maus	Purified, NA/LE	RB6-8C5	Ratte IgG2b,κ	eBioscience
IgG (Isotyp- Kontrolle)	-	Purified, NA/LE	eBio299Arm	Armenian Hamster	eBioscience
IgG (Isotyp- Kontrolle)	-	Biotin	Whole molecule	Kaninchen	Rockland Immunochemicals
IgG (Isotyp- Kontrolle)	-	-	Whole molecule	Kaninchen	Rockland Immunochemicals
IgG2b	Ratte	Biotin	RG7/11.1	Ms IgG2b	BD Biosciences
IgG2b	-	PE	MC-67	Ratte IgG2b	Eigene Herstellung

IgG2b (Isotyp-Kontrolle)	-	-	MC-67	Ratte	Eigene Herstellung
IL-3	Maus	Purified, NA/LE	MP2-8F8	Ratte IgG1,κ	Southern Biotech
IL-3, murin	-	Purity >98%	rekombinant	<i>E. coli</i>	PeproTech Inc.
Kollagen Typ I	Maus	Biotin	polyklonal	Kaninchen	Rockland Immunochemicals
Kollagen Typ I	Maus	-	polyklonal	Kaninchen	Abcam
Ly-6C	Maus	PE	HK1.4	Ratte IgG2c, κ	Abcam
Ly-6G	Maus	PE	1A8	Ratte IgG2a,κ	BD Biosciences
Streptavidin	-	APC	-	-	BD Biosciences

2.9 Primer

Bezeichnung	Firma
Maus Kollagen I Sense-Primer: 5' -TgT TCA gCT TTg Tgg ACC TC- 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Maus Kollagen I Antisense-Primer: 5' -TCA AgC ATA CCT Cgg gTT TC- 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Referenz Gen beta-Aktin Sense-Primer: 5' -ACC CgC gAg CAC AgC TTC TTT g- 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Referenz Gen beta-Aktin Antisense-Primer: 5' -ACA TgC Cgg AgC CgT TgT CgA C- 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Oligo-(dT)20-Primer	Invitrogen TM /Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.10 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Unterbringung der mindestens 8-10 Wochen alten Versuchstiere erfolgte im Tierstall H1 des Universitätsklinikums Regensburg in sogennanten IVC-(individually ventilated cage) Systemen und einem 12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus. In den Räumen wurde eine konstante Temperatur von $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ und eine relative Luftfeuchtigkeit von 60 % gehalten, und die Tiere wurden mit Standardfutter und Leitungswasser *ad libidum* versorgt. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden unter Berücksichtigung der geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt.

Bezeichnung	Firma
C57BL/6J	Charles River Laboratories, Sulzfeld
C57BL/6N	Elevage Janviere, Le Genest Saint Isle, Frankreich
CCR2 ^{-/-} Mäuse (B6.129S4-Ccr2 ^{tm1Ifc} /J)	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
CD11b-DTR Mäuse (B6.FVB-Tg(ITGAM-DTR/EGFP)34Lan/J	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA

2.11 Software

Bezeichnung	Firma
CellQuest Pro 3.1	BD Biosciences, Heidelberg
Flow Jo, Vers. 8.7	Tree Star Inc., Ashland, OR, USA
GraphPad Prism, Vers. 5.03	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Image J, 1.44p	National Institutes of Health, USA
MetaMorph Software, Vers. 4.6r1	Universal Imaging (Visitron System), Puchheim
SDS 2.2.3	Applied Biosystems, Darmstadt

3 Methoden

3.1 Tierexperimente

3.1.1 Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)

Die UUO bei den Versuchstieren wurde nach Einleitung der Narkose durch intraperitoneale Gabe von Fentanyl (0,05 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Dormitor (0,5 mg/kg) an Tag 0 durchgeführt. Nach Überprüfung der Narkosewirkung anhand fehlender Reaktion auf Schmerzreize (Zwischenzehenreflex), wurde die Maus in Rückenlage auf den Operationstisch gelegt und eine Mischung aus 70 % Ethanol und 30 % Glycerin auf die Bauchdecke aufgebracht. Damit wurde zum einen die Operationsstelle desinfiziert und zum anderen das Fell des Tieres verklebt, sodass eine Rasur des Operationsfeldes nicht notwendig war. Die Öffnung der Bauchdecke und des Peritoneums folgte mit einem ca. 1 – 1,5 cm langen medianen Abdominalschnitt. Nach Anbringen der Wundhaken wurde der linke Harnleiter unter einem Operationsmikroskop vorsichtig vom umgebenden Gewebe freigelegt und an zwei Stellen mit einem nicht resorbierbaren Faden ligiert. Schließlich wurde das Peritoneum mit einem nicht resorbierbaren 4-0 Faden und die Bauchdecke mit einem resorbierbaren 3-0 Faden und unter Anwendung von Einzelknopfnähten verschlossen. Es folgte eine subkutane Injektion des Antagonisten bestehend aus Naloxon (1,2 mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg) und Antisedan (2,5 mg/kg), um die Wirkung der Narkose aufzuheben. Die Mäuse standen bis zum vollständigen Erwachen unter Beobachtung. An Tag 7 nach der UUO erfolgte die Organentnahme. Dabei wurden Blut, Milz und Nieren entnommen und analysiert. Die kontralaterale nicht abgebundene Niere diente als Kontroll-Niere.

3.1.2 *In vivo* Depletion von Monozyten

3.1.2.1 Depletion der CCR2⁺ Monozyten mit dem Antikörper MC-21

Um die *in vivo* Differenzierung der Monozyten in Fibrozyten zu untersuchen, wurden die Monozyten in drei verschiedenen Ansätzen depletiert. Zur Depletion der CCR2⁺ Gr-1⁺ Monozyten erhielten die Mäuse von Tag -1 bis 2 (s. Abb. 3.1, A), von Tag -1 bis 6 (s. Abb. 3.1, B) oder von Tag 4 bis 6 (s. Abb. 3.1, C) eine intraperitoneale Injektion des anti-CCR2 Antikörpers MC-21 oder des Isotyp-Kontrollantikörpers MC-67 (Ratte IgG2b) jeweils mit 50 µg in 200 µl sterilem PBS.

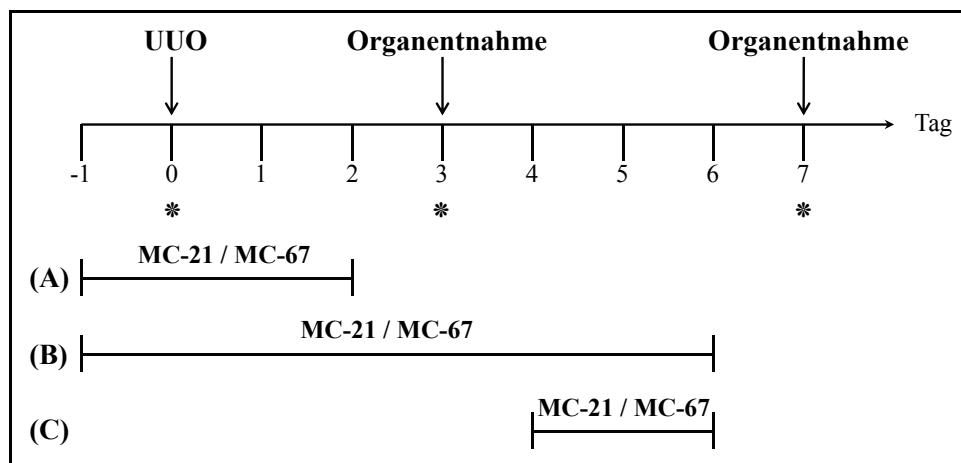


Abb. 3.1 Versuchsaufbau zur Depletion der CCR2⁺ Monozyten mit MC-21 im UUO-Modell. Die Applikation von anti-CCR2 Antikörper (MC-21) oder Isotyp-Kontrollantikörper (MC-67) erfolgte (A) an Tag -1 bis 2, (B) an Tag -1 bis 6 oder (C) an Tag 4 bis 6. * = Blutentnahme.

3.1.2.2 Herstellung der CD11b-DTR Knochenmark-chimärer Mäuse

Die transgenen CD11b-DTR Mäuse exprimieren den hochaffinen Diphtherie Toxin (DT) Rezeptor unter der Kontrolle des CD11b Promotors. DT ist ein Polypeptid aus dem *Corynebacterium diphtheriae* und besteht aus zwei Untereinheiten, A und B. Die Untereinheit B bindet an den DT-Rezeptor (DTR) und ermöglicht so der Untereinheit A das Eindringen in die Zelle. Aufgrund eines Unterschiedes von drei Aminosäuren in der extrazellulären Region des DTR, die für die Bindung der Untereinheit B vom DT von Bedeutung sind, sind Nager 10³ bis 10⁵ mal resistenter gegen DT als Menschen oder Affen. Die transgene Expression des hochaffinen simianen DTR in den gewünschten Mauszellsubpopulationen ermöglicht somit deren selektive Depletion [109] (Abb. 3.2). Um unspezifische toxische Effekte zu vermeiden und die Depletion ausschließlich auf hämatopoetische Zellen zu beschränken, wurden sogenannte Knochenmark-chimäre Mäuse generiert. Dazu wurden C57BL/6J Wildtyp-Mäuse lethal mit 9,5 Gy bestrahlt und durch intravenösen Transfer von 4 x 10⁶ Knochenmarkzellen aus transgenen CD11b-DTR Mäusen rekonstituiert. Nach 8 Wochen konnten die Knochenmark-chimären Mäuse für die Experimente eingesetzt werden.

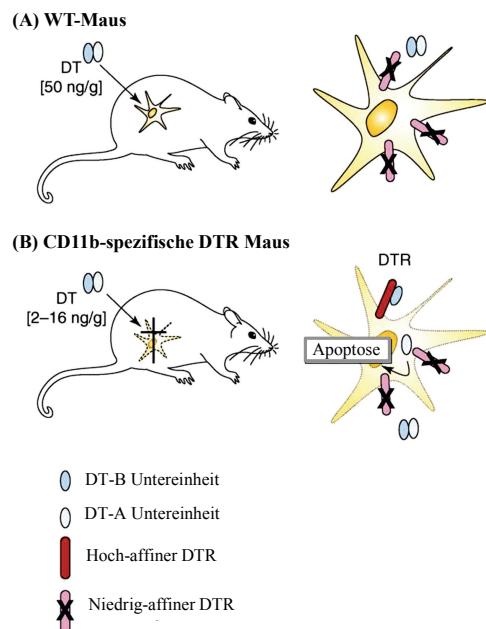


Abb. 3.2 Depletion der CD11b⁺ Zellen in transgenen Mäusen mit dem hochaffinen DTR. (A) WT-Maus ist 1000-mal resisterter gegen DT als z.B. Menschen. (B) Die Expression des hochaffinen simianen DTR in CD11b⁺ Zellen ermöglicht die gezielte Depletion dieser Zellen mit der Injektion von DT (modifiziert nach [109]).

3.1.2.3 Depletion von CD11b⁺ Zellen in CD11b-DTR Knochenmark-chimären Mäusen

Die Ablation der CD11b⁺ Zellen in CD11b-DTR Knochenmark-chimären Mäusen erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 500 ng DT (20 ng DT/g Körpergewicht der Maus) in 200 µl sterilem PBS an Tag -1 und an Tag 1 bis Tag 6. Als Kontrolle dienten PBS-behandelte Knochenmark-chimäre Mäuse (Abb. 3.3).

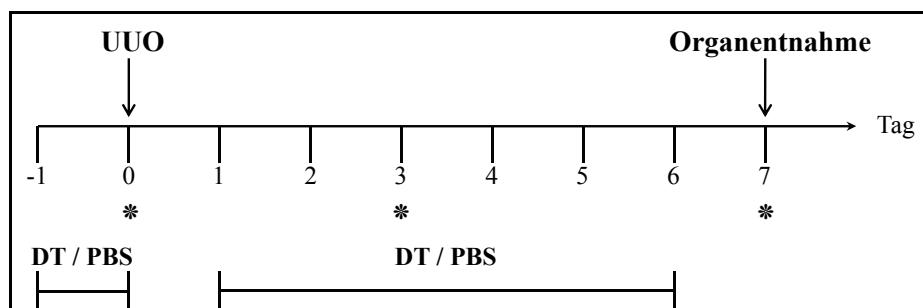


Abb. 3.3 Versuchsaufbau zur Depletion von CD11b⁺ Monozyten im Modell der renalen Fibrose. CD11b-DTR Knochenmark-chimäre Mäuse wurden mit DT oder PBS an Tag -1 und von Tag 1 bis 6 behandelt. * = Blutentnahme.

3.1.2.4 Depletion von Gr-1⁺ Zellen mit dem anti-Gr-1 Antikörper

Die Depletion der Gr-1⁺ Zellen wurde durch tägliche intraperitoneale Injektion von 50 µg Ratte anti-Maus Gr-1 oder Isotyp-Kontrollantikörper MC-67 (Ratte IgG2b) in 200 µl sterilem PBS von Tag -1 bis 2 (Abb. 3.4, A), von Tag -1 bis 6 (Abb. 3.4, B) oder von Tag 3 bis 6 (Abb. 3.4, C) durchgeführt.

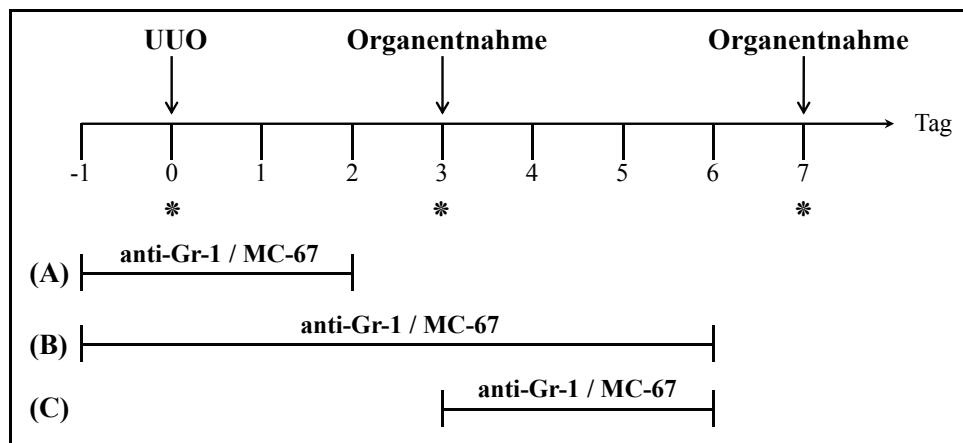


Abb. 3.4 Versuchsaufbau zur Depletion der Gr-1⁺ Zellen mit anti-Gr-1 Antikörper im UUO-Modell. Die Depletion der Gr-1⁺ Zellen erfolgte (A) an Tag -1 bis 2, (B) an Tag -1 bis 6 oder (C) an Tag 3 bis 6. * = Blutentnahme.

3.1.3 *In vivo* Depletion von CD4⁺ T-Zellen

Der Einfluss von T-Zellen auf die Entstehung der Fibrozyten in der fibrotischen Niere wurde durch eine *in vivo* Depletion der CD4⁺ T-Zellen mit dem Antikörper GK1.5 (anti-CD4) untersucht. Zur vollständigen Entfernung der T-Zellen *in vivo* wurde GK1.5 an drei aufeinander folgenden Tagen (Tag -3 bis -1) vor der UUO intraperitoneal in einer Konzentration von 300 µg verabreicht. Kontroll-Mäuse erhielten einen Isotyp-Kontrollantikörper (Abb. 3.5). An Tag 0 und Tag 7 wurde die Depletion der T-Zellen durchflusszytometrisch überprüft.

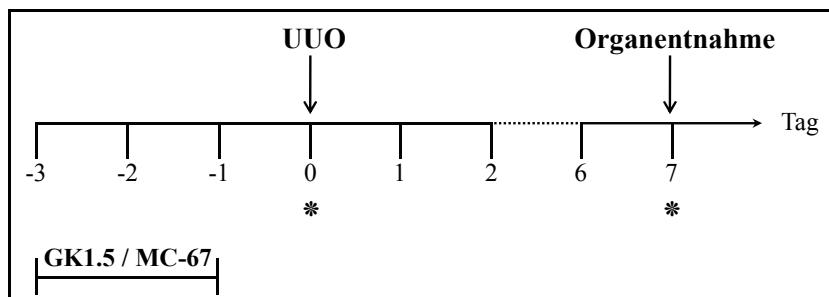


Abb. 3.5 Versuchsaufbau zur Untersuchung von CD4⁺ T-Zellen bei der Fibrozytenentstehung in der fibrotischen Niere. Die Mäuse wurden mit einem anti-CD4 Antikörper (GK1.5) oder einem Isotyp-Kontrollantikörper (MC-67) von Tag -3 bis Tag -1 behandelt. * = Blutentnahme.

3.1.4 *In vivo* Depletion von Basophilen Granulozyten

Die Rolle Basophiler Granulozyten bei der Akkumulation der Fibrozyten in der Nierenfibrose wurde zunächst durch die *in vivo* Depletion der Basophilen Granulozyten analysiert. Zu diesem Zweck erfolgte die intraperitoneale Applikation des anti-Fc ϵ RI α Antikörpers (MAR1)

von Tag -4 bis -2 vor der UUO zweimal täglich in einer Konzentration von 10 µg in 200 µl sterilem PBS. Die Kontroll-Gruppe wurde mit einem Isotyp-Kontrollantikörper (Arm. Hamster IgG) behandelt (Abb. 3.6). Die durchflusszytometrische Überprüfung der Depletion wurde an Tag 0 und Tag 7 durchgeführt.

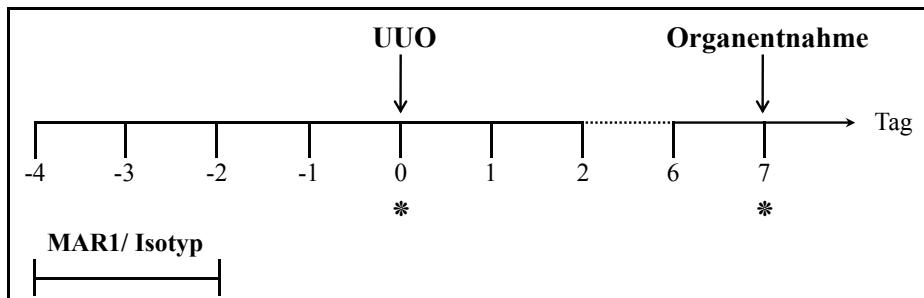


Abb. 3.6 Versuchsaufbau zur Untersuchung Basophiler Granulozyten bei der Fibrozytenakkumulation in der fibrotischen Niere. Die Depletion Basophiler Granulozyten wurde von Tag -4 bis -2 mit der Gabe von anti-Fc ϵ RI α (MAR1) durchgeführt. Kontroll-Mäuse erhielten den entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper. * = Blutentnahme.

3.1.5 *In vivo* Aktivierung von Basophilen Granulozyten

In einem weiteren Ansatz wurde die Rolle aktiverter Basophiler Granulozyten bei der Entstehung von Fibrozyten im UUO-Modell der renalen Fibrose untersucht. Mit der intraperitonealen Gabe des Zytokins IL-3 oder des IL-3/anti-IL-3 Immunkomplexes können Basophile Granulozyten aktiviert und angereichert werden [92, 110]. IL-3 wurde den operierten Mäusen in einer Konzentration von 0,5 ng / µl sterilem PBS zweimal täglich von Tag 0 bis 6 verabreicht (Abb. 3.7, A).

Die Gabe des Zytokin/anti-Zytokin Antikörper Komplexes erhöht und verlängert die biologische *in vivo* Aktivität eines Zytokins [111, 112]. Für die Herstellung des Komplexes wurden zunächst 200 ng des rekombinanten murinen IL-3 und 1 µg des Ratten anti-Maus IL-3 gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das IL-3/anti-IL-3 Gemisch mit PBS/0,1 % BSA auf 150 µl Endvolumen eingestellt und von Tag 0 bis 6 zweimal täglich appliziert (Abb. 3.7, B).

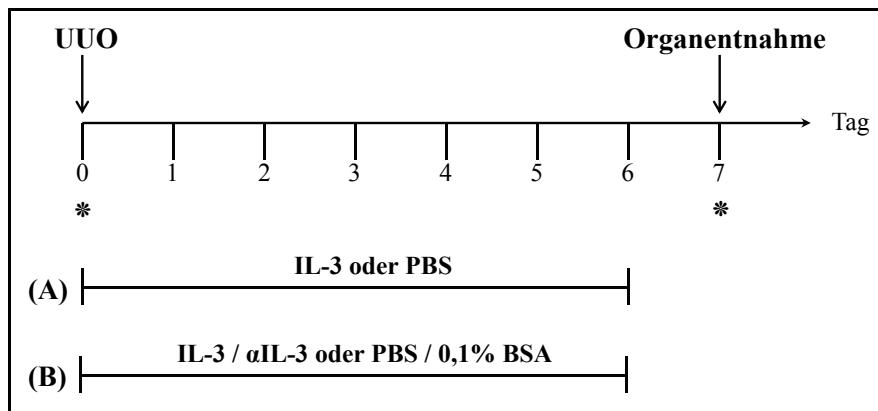


Abb. 3.7 Versuchsaufbau zur Untersuchung aktiverter Basophiler Granulozyten bei der Fibrozytenakkumulation nach Ureterobstruktion. Die Aktivierung Basophiler Granulozyten wurde durch die Applikation mit (A) IL-3 oder (B) IL-3/anti-IL-3 Immunkomplex induziert. * = Blutentnahme.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Entnahme von peripherem Blut

Das Blut wurde nach Einleitung der Narkose retroorbital mithilfe einer Heparin-beschichteten Kapillare entnommen. Das entnommene Blut wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit vorgelegtem 0,1 M EDTA gesammelt und konnte direkt für die nachfolgende FACS Färbung eingesetzt werden.

3.2.2 Präparation von Milz und Nieren

Die Organentnahme der Milz oder der Nieren erfolgte nach dem Töten der Mäuse durch zervikale Dislokation mit anschließender Desinfektion des Fells durch 70 %iges Ethanol. Daraufhin wurde die Bauchhöhle des Tieres geöffnet und die Organe unter Freilegung des umliegenden Gewebes herauspräpariert. Die Nieren wurden vorsichtig von der Nierenkapsel befreit und mithilfe eines Skalpells längs in zwei Hälften geteilt. Aus einer Nierenhälfte wurde eine Einzelzellsuspension für die FACS Analyse hergestellt und die andere Hälfte wurde nochmals halbiert. Beide Viertel wurden in Reaktionsgefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Herstellung von Kryostatpräparaten oder RNA-Isolation wurden die Organteile bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension für die durchflusszytometrische Analyse wurde die von der Kapsel befreite Nierenhälfte oder die Milz in einer Petrischale mit vorgelegtem Präparationsmedium (4°C) zerkleinert und anschließend mit Hilfe des Stempels einer 2 ml Spritze durch einen 70 µm Filter gepresst. Nach der Überführung der Zellsuspension in eine 15 ml Röhre wurden die Zellen bei 350 x g, für 7 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit frischem Medium resuspendiert und über einen 30 µm Filter gegeben. Die dadurch

entstandene Einzelzellsuspension wurde ein weiteres Mal zentrifugiert und die pelletierten Zellen mit entsprechendem Medium in Lösung genommen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert.

3.3 Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence activated cell sorting)

3.3.1 Allgemeines Prinzip

Mithilfe der Durchflusszytometrie und Fluorochrom-markierten Antikörpern wurden in der vorliegenden Arbeit intrazelluläre und extrazelluläre Färbungen durchgeführt. Die FACS Analyse ermöglicht die Untersuchung von Zellen nach ihren Eigenschaften, wie z.B. Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften, intrazelluläre Zusammensetzung uvm. Die Messung im FACS (fluorescence activated cell sorter) erfolgt durch die Markierung der Zellen mit Antikörpern, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden sind. Dabei handelt es sich um eine direkte Markierung. Bei der indirekten Markierung werden die gebundenen Antikörper der Zelle mit einem fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Zellsuspension mit den markierten Zellen wird daraufhin durch eine Kapillare in die Durchflusszelle gesaugt, in der die Zellen einzeln, mithilfe der sogenannten hydrodynamischen Fokussierung, an einem Laserstrahl (Laser: light amplification by stimulated emission of radiation) vorbeigeleitet werden. Die gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe werden dabei angeregt. Die Anregung durch den luftgekühlten Argon-Laser (488 nm) bewirkt eine Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge. Das emittierte Licht ist von mehreren Parametern abhängig: Zellgröße, Zellgranularität sowie spezifische Fluoreszenzen. Im Durchflusszytometer werden diese Eigenschaften durch das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) erfasst. Die Lichtbeugung des Vorwärtsstreulichtes ermöglicht die Messung der Zellgröße, welche entlang der Achse des einfallenden Lichtes ermittelt wird. Die Zellgranularität lässt sich durch die Lichtbrechung und Reflexion des Seitwärtsstreulichtes, das in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen wird, feststellen. Die Fluoreszenz des gebundenen Fluorochroms wird ebenfalls durch das Seitwärtsstreulicht detektiert. Dabei ist die Fluoreszenzintensität von der Anzahl der pro Zelle gebundenen Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle abhängig.

Für die FACS Analysen in dieser Arbeit standen zwei verschiedene Durchflusszytometer zur Verfügung: das FACSCalibur™ und das FACSCanto™ II. Während im FACSCalibur™ gleichzeitig bis zu vier verschiedene Fluorochrome gemessen werden konnten, ermöglichte das FACSCanto™ II die simultane Analyse von bis zu acht verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen.

3.3.2 Extrazelluläre Färbung

Mit der extrazellulären Färbung ist es möglich Oberflächenantigene der Zellen mit entsprechenden Fluorochrom-markierten Antikörpern zu detektieren. In dieser Arbeit wurde die Oberflächenfärbung für die Identifizierung und Quantifizierung der Monozyten, T-Zellen und Basophilen Granulozyten angewendet. Des Weiteren wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf Fibrozyten untersucht.

Für die Oberflächenfärbung wurden die Zellen zunächst mit dem Fc-Block für 15 Minuten auf Eis präinkubiert und anschließend mit den entsprechenden Fluorochrom-konjugierten Antikörpern für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Nach zwei Waschschritten mit PBS folgte die Lyse der roten Blutkörperchen mit dem BD Lyse Puffer (10 Minuten, bei Raumtemperatur, im Dunkeln). Für die Ermittlung der absoluten Zellzahl wurden nach dem letzten Waschschritt zur Zellsuspension 20 µl Counting beads hinzugegeben und im FACS analysiert. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{gemessene Zellzahl} \cdot \text{Gesamtzahl eingesetzte Counting beads}}{\text{gemessene Counting beads} \cdot \text{Verdünnung}} = \frac{\text{Absolute Zellzahl}}{\mu\text{L}}$$

3.3.3 Intrazelluläre Färbung

Die intrazelluläre FACS Färbung wurde in dieser Arbeit zur Identifizierung der Fibrozyten angewendet.

Zunächst wurde die Zellsuspension mit den Oberflächenmarkern CD45 und CD11b oder zusätzlich mit anderen zu untersuchenden Oberflächenantigenen markiert (s. 3.3.2). Nach der 20-minütigen Inkubation und den darauffolgenden Waschschritten wurden die Zellen mit dem Permeabilisierungspuffer (Cytofix/Cytoperm, BD) nach Angaben des Herstellers permeabilisiert und gleichzeitig die bereits gefärbten Oberflächenmoleküle fixiert. Es folgten zwei Waschschritte mit dem Permeabilisierungswaschpuffer (0,1 % Saponin-Lösung in PBS) und die Inkubation (30 Minuten, 4°C) mit dem biotinylierten Kollagen I-Antikörper oder der Isotyp-Kontrolle. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde das APC-konjugierte Streptavidin zur Detektion des Kollagen I-Antikörpers für 30 Minuten dazugegeben. Nach den letzten Waschschritten wurden zur Quantifizierung der Fibrozyten 20 µl Counting beads zur Zellsuspension dazupipettiert. Anschließend folgte die Analyse der Zellsuspension im FACS.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolation von Gesamt-RNA aus murinem Gewebe

Die Isolation von Gesamt-RNA aus der UUO und kontralateraler Niere erfolgte mit dem RNeasy Midi Kit von der Firma Qiagen. Das in Stickstoff schockgefrorene Gewebe wurde zunächst in 1 ml RLT-Puffer mithilfe des Homogenisators MP FastPrep®-24 und der sogenannten Lysing Matrix Reaktionsgefäß (2 ml, grüner Deckel) homogenisiert. Intrazelluläre RNasen werden durch die Lyse der Zellen freigesetzt und müssen sofort deaktiviert werden. Der RLT-Puffer enthält β -Mercaptoethanol und stark denaturierendes Guanidinethioharnstoff (GITC). Das im Puffer enthaltene GITC inaktiviert die RNasen, sodass eine Isolation von intakter RNA gewährleistet wird. β -Mercaptoethanol unterstützt dabei die Inaktivierung der störenden RNasen durch die Reduktion von Disulfidbrücken und die damit verbundene irreversible Denaturierung und Zerstörung der ursprünglichen Konformation der RNA-abbauenden Enzyme. Das Lysat wurde daraufhin in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt, mit 1 ml RLT-Puffer aufgefüllt und für 10 Minuten bei 5.000 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt, mit 2 ml 70 % Ethanol versetzt, sofort gründlich gemischt und auf die RNeasy Midi Säule pipettiert. Das Ethanol bietet dabei optimale Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silica-Gel Membran der Säule. Die Silica-Gel Membran bindet alle RNA-Moleküle, die größer sind als 200 Basenpaare, und ermöglicht damit die gezielte Anreicherung von mRNA. Nach der Zentrifugation der beladenen Säule bei 5.000 x g für 5 Minuten und dem Verwerfen des Durchflusses wurde ein DNase-Verdau nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, um noch eventuell vorhandene DNA zu eliminieren. Nach den abschließenden Waschschritten wurde die gebundene RNA mit 150 μ l Nuklease-freiem H₂O von der Säule eluiert und die Konzentration am NanoDrop Spektrophotometer bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA-Lösung bei -80°C gelagert.

3.4.2 Reverse Transkription – PCR (RT-PCR)

Um die Ausprägung der Fibrose in den UUO-Nieren festzustellen und zu analysieren, wurde die exprimierte Kollagen I mRNA mithilfe der PCR quantifiziert. Zunächst musste die isolierte mRNA (s. 3.4.1) durch die RNA-abhängige Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT) in DNA umgeschrieben werden. Die daraus entstandene cDNA (c = complementary) wurde als Ausgangsprodukt für die qPCR in 3.4.3 eingesetzt.

Für die Reverse Transkription wurden zunächst 4 µg isolierter Gesamt-RNA mit RNase-freiem H₂O auf 9 µl eingestellt, mit 1 µg Oligo-(dT)₂₀ Primern bei 70°C für 3 Minuten inkubiert und dann sofort auf Eis gestellt. First strand buffer, dNTP-Mix, RNAsin und M-MLV RT wurden zum 10 µl RNA/Primer Ansatz dazupipettiert und die Erst-Strang cDNA-Synthese erfolgte bei 37°C für 1 Stunde. Schließlich wurde die Aktivität der M-MLV RT bei 94°C für 2 Minuten deaktiviert und die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.4.3 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) wurde 1983 von Kary Banks Mullis entwickelt und beschreibt die enzymatische Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes *in vitro*. Die Methode der Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der PCR, erlaubt jedoch die direkte Erfassung der gebildeten PCR-Produkte. Mithilfe von DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen, z.B. SYBR®Green, lässt sich die Kinetik der PCR-Reaktion beobachten. SYBR®Green, ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, interkaliert in die doppelsträngige DNA, wodurch seine Fluoreszenz stark ansteigt. Je mehr PCR-Produkte gebildet werden, desto höher ist die Intensität der gemessenen Fluoreszenz. Die quantitative Real-Time PCR wurde in dieser Arbeit mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit und dem ABI PRISM 7900 HAT Detektionssystem der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Auswertung der relativen Genexpressionslevel erfolgte mit der SDS 2.3 Software und der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode [113]. $\Delta\Delta C_T$ entspricht dabei der Subtraktion von ΔC_T (UUO-Niere) und ΔC_T (kontralaterale Niere) und wurde für jede Maus einzeln berechnet. Bei der Berechnung von ΔC_T wurde die Genexpression von Kollagen I mithilfe der Expression eines Referenzgens beta-Aktin folgendermaßen normalisiert: C_T -Wert (Kollagen I) – C_T -Wert (beta-Aktin). C_T , das für Cycle Threshold = Schwellenwert-Zyklus steht, beschreibt den Zyklus, in dem erstmals ein bestimmter Schwellenwert des exponentiellen Wachstums des DNA-Abschnittes überschritten wurde. Je kleiner der C_T -Wert ist, desto höher ist die Expression des untersuchten Gens. Die relative Genexpression von Kollagen I wurde in den kontralateralen Nieren als 1,0 angenommen und dementsprechend die relative x-fache Änderung der Genexpression in den UUO-Nieren berechnet.

Reaktionsansatz der PCR:

Reagenz	Volumen in μ l
Master Mix (Qiagen)	10
Primer sense (10 μ M)	1
Primer antisense (10 μ M)	1
H_2O	3
<hr/>	
Summe	15
	+ 5 μ l cDNA

Temperaturprofil der PCR:

Schritt	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit
Initiale Denaturierung	95	600 sec
Denaturierung	95	15 sec
Annealing/Elongation	60	60 sec
Schmelzkurvenanalyse	60 - 92	mit 1,6 $^{\circ}\text{C}/\text{sec}$

Denaturierung, Annealing und Elongation wurden 40 x wiederholt.

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Herstellung von Kryostatpräparaten

Das gefrorene Nierengewebe wurde zunächst in Tissue Tek[®] O.C.T[™] Compound eingebettet und es folgte die Anfertigung von 5 μm dicken Schnitten. Die hergestellten Kryoschnitte wurden bis zur Weiterverwendung bei -20 $^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.5.2 Immunfluoreszenz-Färbung von Kollagen I

Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Objektträger mit den geschnittenen Nieren bei Raumtemperatur für 10 Minuten angetaut und anschließend für 7 Minuten in eiskaltem Aceton fixiert. Daraufhin wurden die Schnitte in 3 % $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Methanol}$ für 20 Minuten inkubiert. Dabei wurden endogene Peroxidasen und Hämoproteine, die eine

Peroxidaseaktivität aufweisen (z. B. Hämoglobin) blockiert. Weiter erfolgte die Behandlung der Schnitte für jeweils 15 Minuten mit einer Avidin- und Biotin-Lösung, um endogene Biotinartefakte, wie Nieren-Tubuli, zu blockieren. Die anschließende Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit dem SuperBlock® Puffer erfolgte für weitere 30 Minuten. Die Inkubation mit dem primären Antikörper Kaninchen anti-Maus Kollagen I (1:1.000) oder einem Isotyp-Kontrollantikörper (1:10.000) erfolgte daraufhin über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer. Der nichtgebundene primäre Antikörper wurde in drei Waschschritten in PBS von den Schnitten entfernt und es folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor 594 F(ab')2 Ziege anti-Kaninchen IgG (1:500). Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 (1:50.000) angefärbt. Falls nicht anders angegeben erfolgten alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur und wurden mit jeweils zwei Waschschritten in PBS für 5 Minuten abgeschlossen.

Die rot gefärbte Kollagen I-positive Fläche wurde mithilfe eines Mikroskops, der 200-fachen Vergrößerung und fünf zufällig ausgewählten Regionen je Objektträger mit der MetaMorph Software quantifiziert.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Microsoft Excel durchgeführt. Die ermittelten Werte der einzelnen Gruppen wurden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Signifikanz zwischen den Gruppen wurde mit dem einseitigen Student'schen T-Test bestimmt und Unterschiede mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Ursprung und Depletion der Fibrozyten im Modell der renalen Fibrose

Die *in vitro* Differenzierung von Fibrozyten aus Monozyten [31, 32, 57, 58] deutet darauf hin, dass Fibrozyten auch *in vivo* aus den klassischen Monozyten, die in entzündetes Gewebe eingewandern, entstehen. Fibrozyten wurden jedoch auch im peripheren Blut und in der Milz von gesunden Patienten und Mäusen detektiert [31, 66]. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, dass Fibrozyten nicht lokal aus Monozyten differenzieren, sondern dass Fibrozyten bereits als differenzierte oder teilweise differenzierte Kollagen-produzierende Zellen aus dem Blut oder der Milz in entzündetes Gewebe einwandern. Um dieser Fragestellung nachzugehen und die Bedeutung der Fibrozyten in der Nierenfibrose genauer zu untersuchen, wurden Monozyten und Fibrozyten differentiell mit monoklonalen Antikörpern und Diphtherie Toxin in Knochenmark-chimären Mäusen depletiert und daraufhin die Zahl der Fibrozyten, die Entwicklung der Fibrozyten über die Zeit und die Progression der Nierenfibrose untersucht. In diesem Zusammenhang wurde das Modell der UUO in Mäusen angewendet, das in der obstruierten Niere eine schnelle Infiltration von Monozyten, T-Zellen und Neutrophilen Granulozyten und die Ausbildung einer interstitiellen Fibrose zur Folge hat [106, 107]. Differenzierte Fibrozyten und die Entwicklung einer renalen Fibrose können in der ligierten Niere bereits innerhalb der ersten 5 bis 7 Tage nach Ureterobstruktion beobachtet werden [52, 58].

4.1.1 Expression charakteristischer Marker auf der Zelloberfläche von murinen Fibrozyten in Niere und Milz

In Vorversuchen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Fibrozyten unter bestimmten Kulturbedingungen aus monozytären Splenozyten, die die Marker CD11b, CD115 und Gr-1 exprimieren, entstehen [58]. *In vitro* differenzierte Fibrozyten weisen immer noch eine hohe Expression von CD11b und CD45, aber nur ein geringes Expressionsniveau des Oberflächenmarkers CD115 auf. Um Fibrozyten *in vivo* phänotypisch zu charakterisieren, wurde die Expression der klassischen Monozytenmarker CD115, CCR2, Gr-1 und Ly-6C im Verlauf der UUO analysiert. Die Induktion der renalen Fibrose mithilfe der einseitigen Ureterobstruktion führt zur schnellen und ausgeprägten Infiltration von Fibrozyten in die ligierte Niere [52, 58]. Der Antikörper gegen Gr-1 erkennt ein Epitop sowohl für das

Oberflächenantigen Ly-6G als auch Ly-6C. Aus diesem Grund wurde auch die Expression von Ly-6G mit einem spezifischen Antikörper auf Kollagen I⁺ Fibrozyten untersucht.

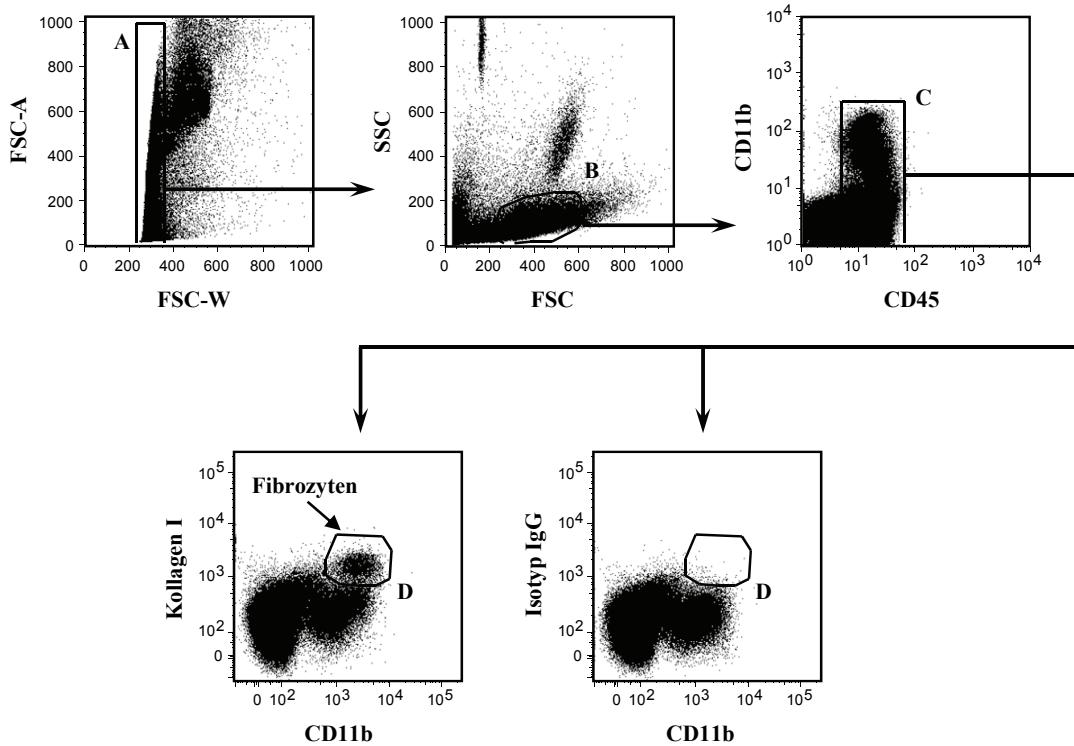
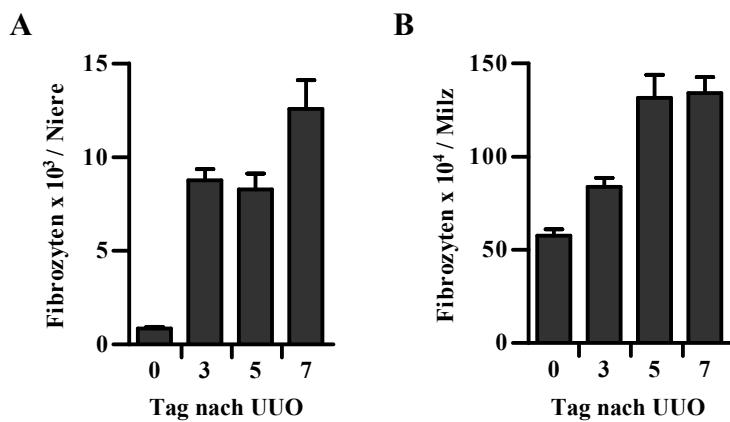


Abb. 4.1 Gating Strategie zur Identifizierung der Fibrozyten mittels FACS am Beispiel der Milz. Gate A: Eliminierung der Zell-Dubletten, Gate B: Identifizierung der PBMC, Gate C: Gating auf CD45⁺ Zellen und Identifizierung der Fibrozyten (Gate D) im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (Isotyp IgG).

Die aus den Nieren und der Milz isolierten Zellen wurden mit Antikörpern gegen die extrazellulären Moleküle CD45 und CD11b gefärbt, nach Permeabilisierung mit einem Antikörper gegen Kollagen I inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Gating Strategie, um die CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten zu identifizieren, ist in Abb. 4.1 am Beispiel der Milz gezeigt. Zunächst wurden die Zell-Dubletten mittels der Streulichteigenschaften entfernt, indem die Fläche (A = Area) gegen die Weite (W = Width) des Vorwärtsstreulichtes (FSC) aufgetragen wurde (Gate A). Dadurch werden für die Auswertung nur Einzelzellen berücksichtigt und falsch positive Signale ausgeschlossen. Die PBMC wurden daraufhin mithilfe des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulichtes (SSC) identifiziert (Gate B) und somit auch Neutrophile Granulozyten ausgeschlossen. Nach dem Gating auf die gesamten CD45⁺ Zellen (Gate C) wurde die Expression von CD11b und Kollagen I dargestellt und die Fibrozyten identifiziert (Gate D). Um eine unspezifische Färbung auszuschließen, wurde die Einzelcellsuspension mit einem Isotyp-Kontrollantikörper (Isotyp IgG) an Stelle des Kollagen I-Antikörpers inkubiert.



Vor der Ureterligatur (Tag 0) wurden kaum Fibrozyten in der Niere detektiert, hingegen zeigte die Zahl der Fibrozyten in der ligierten Niere bereits an Tag 3 nach der UUO einen 10-fachen Anstieg und erhöhte sich bis Tag 7 auf das 12-fache (Abb. 4.2, A). In der Milz konnten die Fibrozyten bereits an Tag 0 deutlich detektiert werden und zeigten an den Tagen 3 bis 7 ebenfalls einen erheblichen Anstieg (Abb. 4.2, B).

Das Expressionsmuster der Oberflächenmarker auf Fibrozyten in der Milz und in der ligierten Niere war sehr ähnlich und die Kombination dieser Marker zeigte einen myeloiden Charakter dieser Zellen (Abb. 4.3). Abgesehen von CD11b und CD45, exprimierten durchschnittlich 40 % der Kollagen I⁺ Zellen den Chemokinrezeptor CCR2. Hingegen zeigten nahezu alle CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten die Expression der Marker Gr-1, Ly-6G und Ly-6C. Der Marker CD115 wurde auf den Fibrozyten nicht detektiert. Diese Oberflächenantigene unterscheiden Fibrozyten eindeutig von Monozyten, die typischerweise CD115 exprimieren und aus zwei Hauptpopulationen bestehen. Die „klassischen“ Monozyten sind stark positiv für CCR2, Gr-1 und Ly-6C, und die zweite Monozytenpopulation, sogenannte residente Monozyten, zeigen eine schwache Expression von CCR2 und Gr-1 und sind negativ für Ly-6C [67, 68, 74]. Diese Ergebnisse zeigen, dass Fibrozyten entweder ihr Repertoire an Oberflächenmolekülen nach der Entwicklung aus Monozyten geändert haben, oder dass sie eine unabhängige Zellpopulation in der Milz darstellen. Um die Beteiligung der verschiedenen Zellpopulationen für die Differenzierung der Fibrozyten zu untersuchen, wurden diese Zellpopulationen mit monoklonalen Antikörpern oder Diphtherie Toxin depletiert.

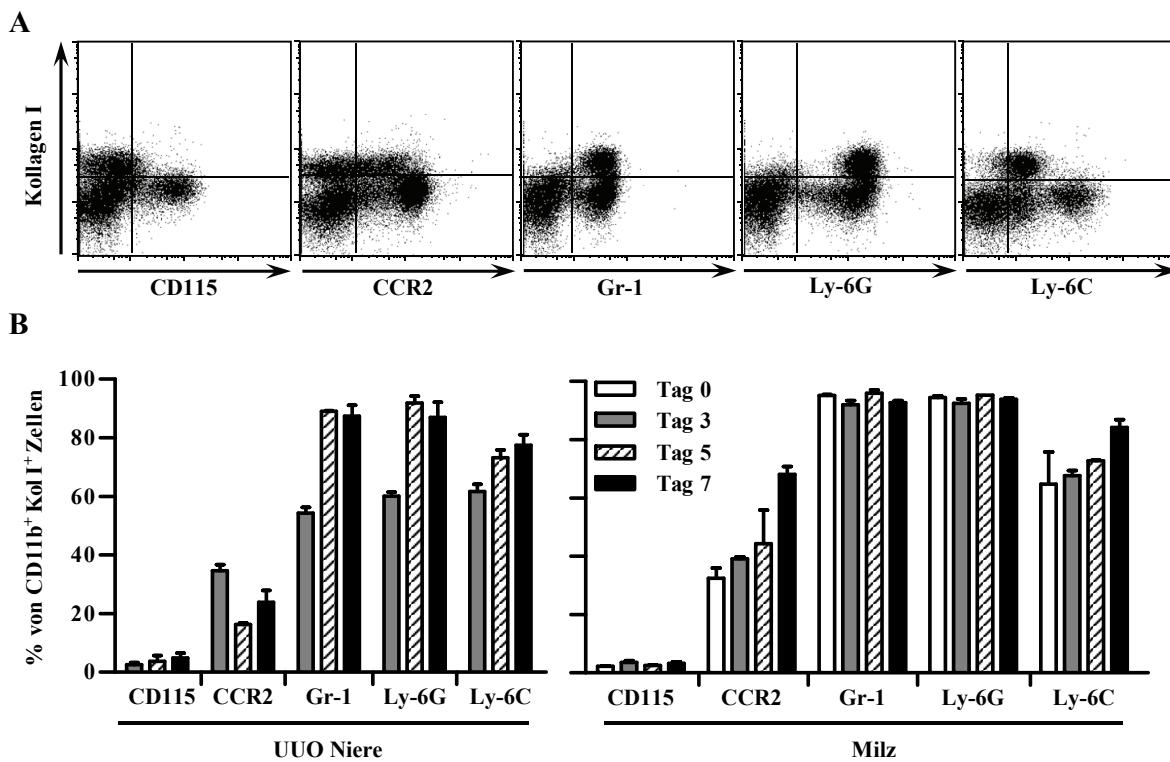


Abb. 4.3 Phänotypische Charakterisierung der Fibrozyten in der UUO-Niere und in der Milz anhand der Expression verschiedener Oberflächenmarker. (A) Repräsentative FACS DotPlots zeigen die Expression von Kollagen I in Kombination mit CD115, CCR2, Gr-1, Ly-6G und Ly-6C. Die Quadranten in den DotPlots sind in Bezug auf die Isotyp-Kontrolle dargestellt. (B) Prozentuale Verteilung der Expression von CD115, CCR2, Gr-1, Ly-6G und Ly-6C in Kollagen I⁺ Fibrozyten an verschiedenen Tagen nach der UUO (MW ± SEM, n = 3).

4.1.2 Depletion der CCR2⁺ Gr-1⁺ Monozyten mit MC-21

Der monoklonale Antikörper MC-21 depletiert effizient CCR2⁺ Monozyten und verhindert somit gezielt ihre Einwanderung in entzündetes Gewebe [114]. Durch die tägliche Applikation des CCR2 Antikörpers MC-21 (50 µg i.p.) von Tag -1 bis Tag 6 wurden die CCR2⁺ Zellen in den behandelten Mäusen depletiert. Kontroll-Mäuse erhielten statt MC-21 den entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper IgG2b (Kontrolle). Die UUO wurde an Tag 0 durchgeführt und Blut, Milz sowie Nieren an Tag 7 analysiert. Die Identifizierung der Monozyten im FACS erfolgte durch das Gating auf PBMC im Vorwärts- und Seitwärtsstreuulicht und durch die Färbung der Oberflächenmoleküle CD11b und Gr-1. Die durchflusszytometrische Messung im Blut zeigte, dass bereits nach der ersten Injektion von MC-21 die Gr-1⁺ Monozyten fast komplett depletiert wurden (Abb. 4.4, A und B). Weitere tägliche Injektionen des MC-21 Antikörpers hielten die Depletion der Gr-1⁺ Monozyten bis Tag 3 aufrecht und resultierten zusätzlich in einer erheblichen Reduktion der Gr-1⁻ Monozyten, die bekannterweise aus Gr-1⁺ Monozyten entstehen [79, 115]. Allerdings traten die Gr-1⁺ Monozyten im Blut an Tag 7 wieder auf, da die Aktivität von MC-21 durch eine

humorale Immunantwort gegen MC-21 neutralisiert wurde [116], sodass kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Gruppen vorhanden war. In der Milz und der ligierten Niere wurde die Zahl der Monozyten an Tag 7 ebenfalls nicht signifikant verändert (Abb. 4.4, C).

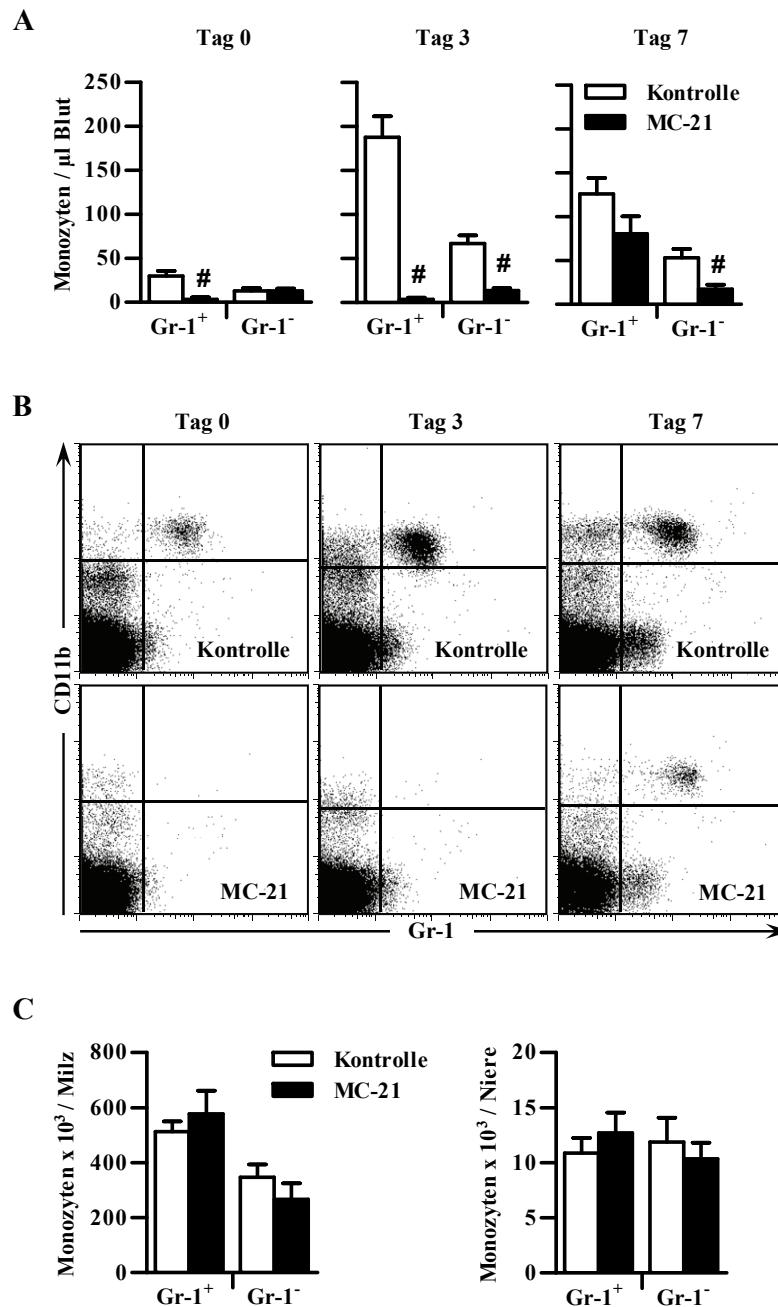


Abb. 4.4 Depletion der Monozyten nach der Behandlung mit MC-21 von Tag -1 bis Tag 6. (A) Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten pro μ l Blut in MC-21 (schwarze Balken) und Isotyp-behandelten (weiße Balken) Mäusen an Tag 0, 3 und 7 nach der UUO (MW \pm SEM, n = 6 pro Gruppe). Die Zahl der Monozyten wurde mittels Durchflusszytometrie und durch die Zugabe von Counting beads quantifiziert. (B) Repräsentative FACS DotPlots nach Depletion der Monozyten im peripheren Blut an den Tagen 0, 3 und 7. (C) Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten in der Milz und obstruierten Niere der MC-21 oder Isotyp-behandelten Mäuse (Kontrolle) an Tag 7 nach der Ureterobstruktion (MW \pm SEM, n = 6 pro Gruppe). #: p < 0,005.

Fibrozyten, die durchflusszytometrisch anhand der Koexpression von CD45, CD11b und intrazellulärem Kollagen I identifiziert wurden, zeigten in Milz oder der ligierten Niere an Tag 7 durch die Behandlung mit MC-21 keine Veränderung (Abb. 4.5, A und B). Die Progression der renalen Fibrose nach UUO, die mittels quantitativer Real-Time PCR für Kollagen I ermittelt wurde, zeigte in der obstruierten Niere keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 4.5, C).

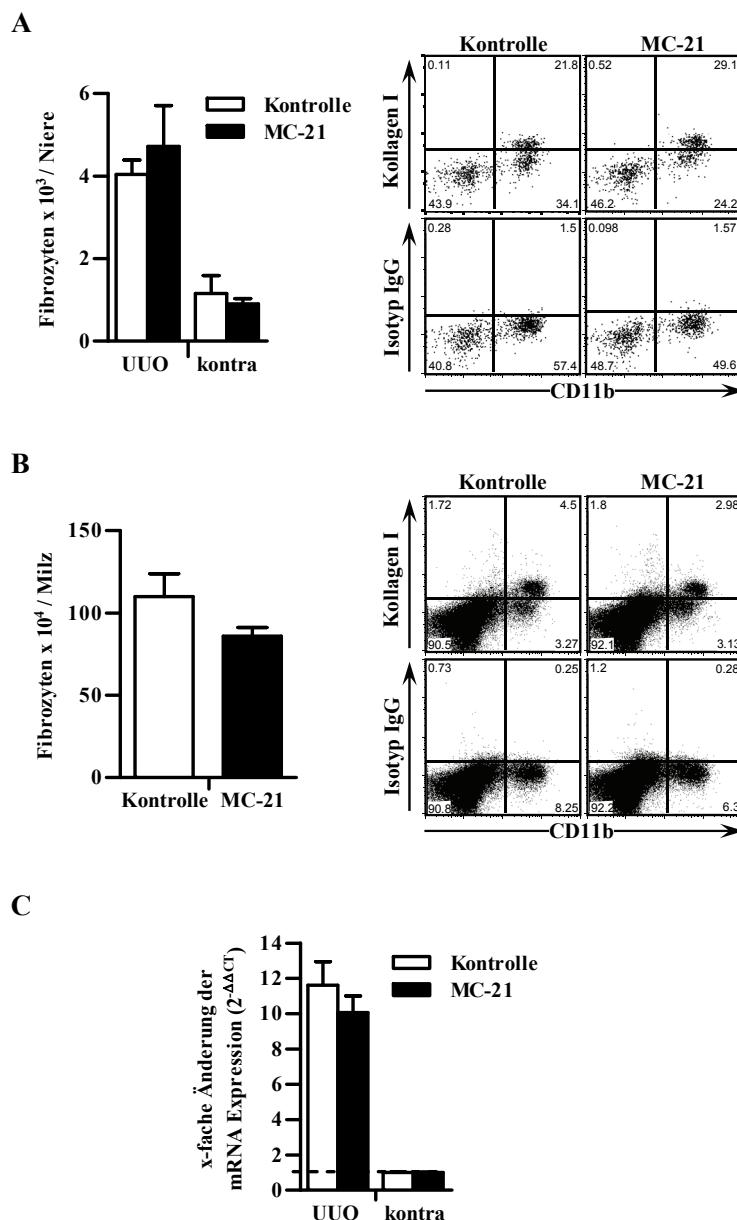


Abb. 4.5 Zahl der Fibrozyten und mRNA Expression von Kollagen I nach MC-21 Behandlung von Tag -1 bis 6. Die UUO in C57BL/6N Mäusen wurde an Tag 0 durchgeführt und MC-21 (schwarze Balken) oder ein Isotyp-Kontrollantikörper (Kontrolle, weiße Balken) wurden von Tag -1 bis 6 verabreicht (n = 6 pro Gruppe). CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten wurden mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW \pm SEM). Zahl der Fibrozyten (A) in der ligierten Niere, der kontralateralen Niere und (B) in der Milz. Zu (A) und (B) sind jeweils repräsentative FACS DotPlots gezeigt. (C) Relative Änderung der mRNA Expression von Kollagen I in der UUO und kontralateraler Niere in Bezug zum Referenz-Gen beta-Aktin (MW \pm SEM, n = 6 pro Gruppe). Die Expression in der kontralateralen Niere wurde als 1,0 angenommen.

Um auszuschließen, dass die Neutralisation der MC-21-Aktivität durch die Ausbildung einer humoralen Immunantwort für die fehlende Depletion der Fibrozyten in der Niere an Tag 7 verantwortlich ist, wurden die Mäuse in einem weiteren Versuchsansatz für einen kurzen Zeitraum mit MC-21 behandelt. Dafür erfolgte die Injektion des MC-21 (50 µg i.p.) an den Tagen -1 bis 2 und die durchflusszytometrische Analyse von Blut, Milz und Nieren an Tag 3. Der gegen CCR2 gerichtete Antikörper MC-21 depletierte zwar die Gr-1⁺ Monozyten und die Entwicklung der Gr-1⁻ Monozyten in den untersuchten Organen war ebenfalls bereits unterbrochen (Abb. 4.6, A), jedoch wurden die Fibrozyten weder aus der Milz noch aus der Niere depletiert (Abb. 4.6, B). Der Grund hierfür könnte die geringe Expression von CCR2 auf der Zelloberfläche der Fibrozyten sein.

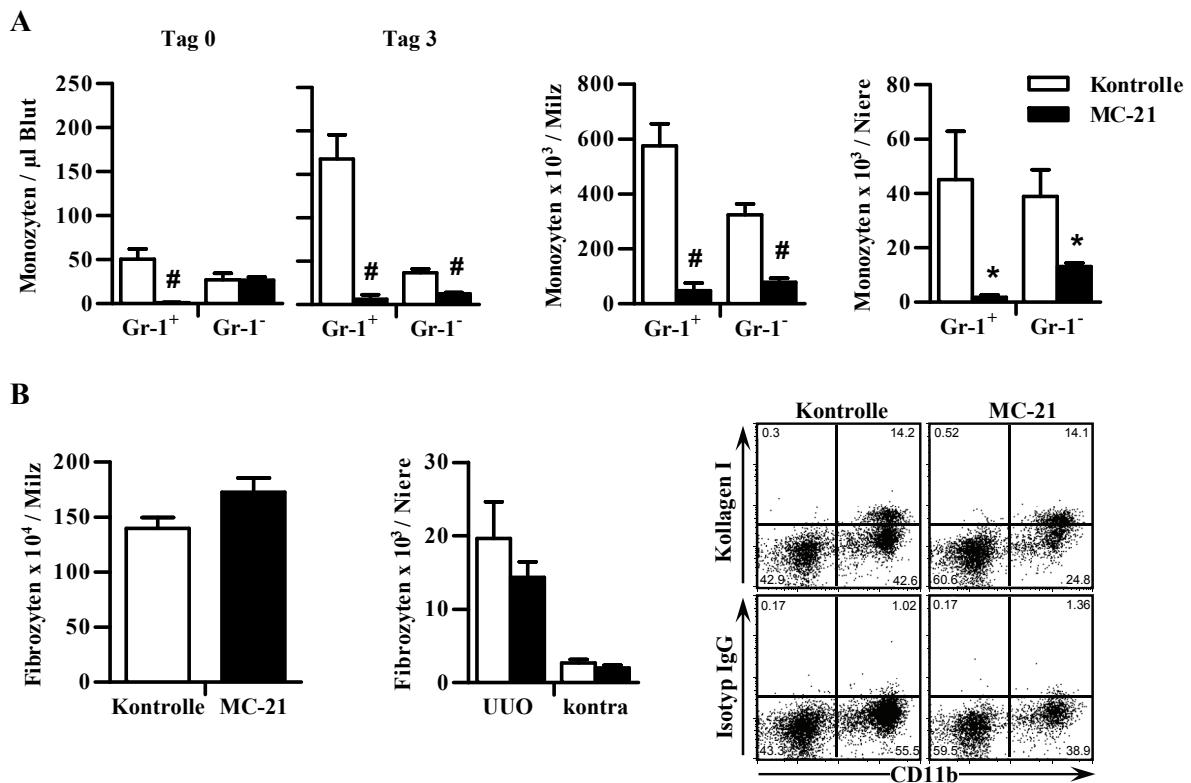


Abb. 4.6 Depletion der Monozyten mit dem monoklonalen Antikörper MC-21 von Tag -1 bis Tag 2. Die UUO in C57BL/6N Mäusen wurde an Tag 0 durchgeführt und MC-21 (schwarze Balken) oder ein Isotyp-Kontrollantikörper (Kontrolle, weiße Balken) wurden von Tag -1 bis 2 verabreicht (n = 6 pro Gruppe). Gr-1⁺, Gr-1⁻ Monozyten und Fibrozyten wurden mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW ± SEM). (A) Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten an Tag 0 und 3 im peripheren Blut, in der Milz und obstruierten Niere an Tag 3 nach der UUO. (B) Zahl der CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten in der Milz, ligierten und kontralateralen Niere an Tag 3 nach der UUO. Repräsentative FACS DotPlots renaler Fibrozyten sind dargestellt. #: p < 0,005; *: p < 0,05.

Die Behandlung der Mäuse mit MC-21 an den Tagen 4 bis 6 nach der UUO und die darauffolgende Analyse an Tag 7 zeigte, dass auch die Kurzzeit-Behandlung im späteren Verlauf der UUO die peripheren Blut-Monozyten sehr effizient depletiert (Abb. 4.7, A). Die

Zahl der Fibrozyten in der abgebundenen Niere wurde aber auch bei diesem Experiment nicht reduziert (Abb. 4.7, B). In Übereinstimmung dazu wurde auch keine signifikante Veränderung in der mRNA Expression von Kollagen I zwischen den behandelten Gruppen in der fibrotischen Niere festgestellt (Abb. 4.7, C). Die Persistenz der Fibrozyten in der Milz und die Akkumulation der Fibrozyten in der ligierten Niere trotz ausgeprägter Depletion der Monozyten durch MC-21 weisen darauf hin, dass Fibrozyten nicht aus den Monozyten innerhalb der Niere entstehen. Fibrozyten könnten entweder aus anderen Zellpopulationen innerhalb der Niere entstehen oder wahrscheinlicher aus der Peripherie (z.B. Milz) via Blutbahn in die Niere migrieren.

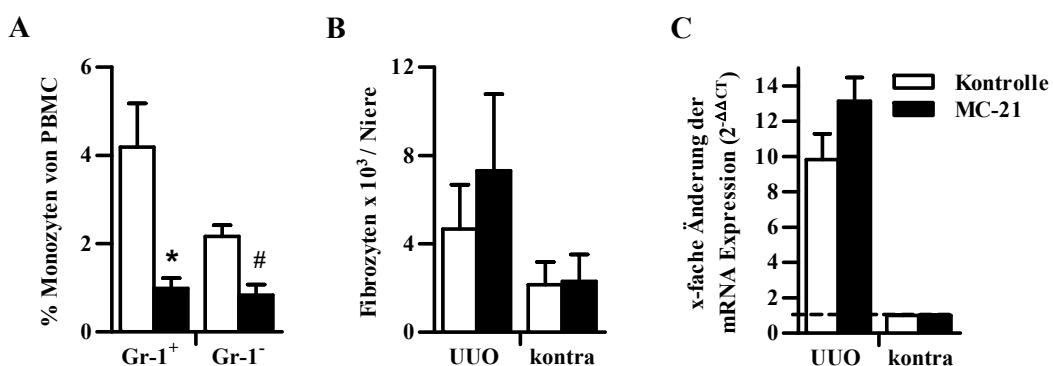


Abb. 4.7 Depletion der Monozyten mit dem monoklonalen Antikörper MC-21 von Tag 4 bis 6. Die Ureterobstruktion wurde an Tag 0 durchgeführt und die Behandlung der Mäuse mit MC-21 (schwarze Balken) oder einem Isotyp-Kontrollantikörper (weiße Balken) folgte an Tag 4 bis Tag 6 (n = 6 pro Gruppe). Gr-1⁺, Gr-1⁻ Monozyten und Fibrozyten wurden durchflusszytometrisch analysiert (MW ± SEM). (A) Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten im Blut an Tag 7 als Prozent der Gesamt-PBMC. (B) Zahl der Fibrozyten in der obstruierten und kontralateralen Niere an Tag 7 nach der UUO. Absolute Werte wurden durch Zugabe von Counting beads bestimmt. (C) Relative Änderung der mRNA Expression von Kollagen I in der UUO und kontralateraler Niere in Bezug zum Referenz-Gen beta-Aktin (MW ± SEM, n = 6 pro Gruppe). Die Expression in der kontralateralen Niere wurde als 1,0 angenommen. #: p < 0,005; *: p < 0,05.

4.1.3 Entstehung und Migration der Fibrozyten in CCR2 defizienten Mäusen

Wie in dem vorherigen Abschnitt beschrieben, veränderte die Depletion der CCR2⁺ Monozyten mit MC-21 weder die Zahl der Fibrozyten in der Milz noch die Einwanderung der Fibrozyten in die ligierte Niere. Im folgenden Teil der Dissertation wurde untersucht, inwiefern Monozyten für die Entwicklung der Fibrozyten in der Milz eine Rolle spielen, und ob der Chemokinrezeptor CCR2 für die Migration der Fibrozyten in die Niere von Bedeutung ist. Um dies zu analysieren, wurden CCR2 defiziente (CCR2^{-/-}) Mäuse mit Wildtyp-Mäusen verglichen. Da der Chemokinrezeptor CCR2 für die Migration der Monozyten aus dem Knochenmark in die Peripherie erforderlich ist, weisen CCR2^{-/-} Mäuse nur eine geringe Zahl von Monozyten im Blut und Milz auf. Diese Mäuse sind jedoch durch eine erhöhte Akkumulation der Monozyten im Knochenmark gekennzeichnet [71, 72].

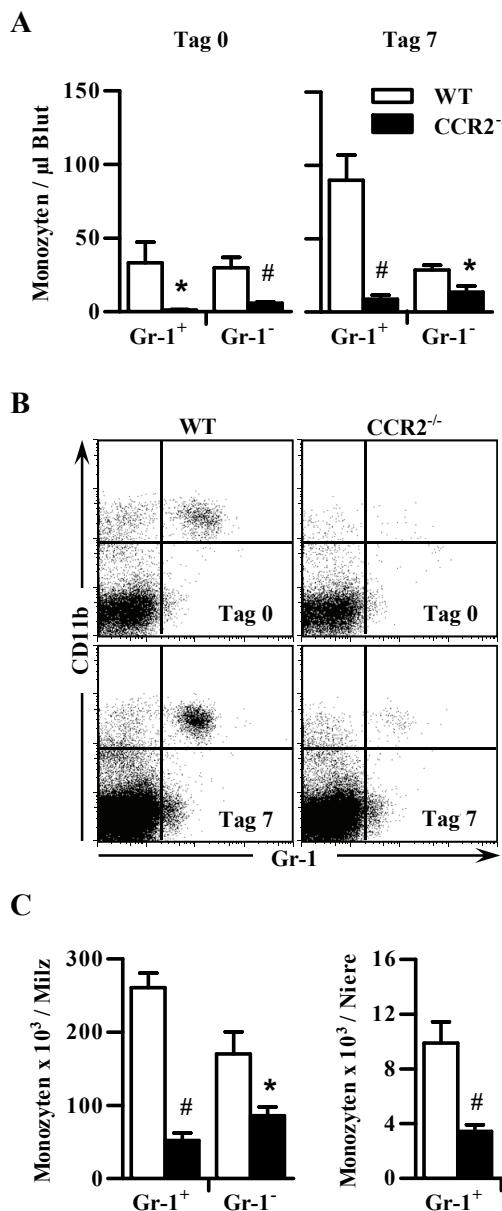


Abb. 4.8 Monozyten in CCR2^{-/-} und Wildtyp-Mäusen. Die Ureterligatur in Wildtyp (WT, weiße Balken) und CCR2 defizienten Mäusen (CCR2^{-/-}, schwarze Balken) wurde an Tag 0 durchgeführt. Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten wurden mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW \pm SEM, n = 5 pro Gruppe). (A) Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten im peripheren Blut an Tag 0 und Tag 7 mit (B) repräsentativen FACS DotPlots. (C) Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten in der Milz und ligenen Niere an Tag 7 nach der UUO. #: p < 0,005; *: p < 0,05.

Zunächst wurde die Zahl der Monozyten vor der UUO (Tag 0) und an Tag 7 nach der UUO durchflusszytometrisch analysiert. Erwartungsgemäß waren in CCR2^{-/-} Mäusen an Tag 0 und Tag 7 beträchtlich weniger Monozyten im Blut sowie signifikant reduzierte Monozyten-Zahlen in der Milz und in den Nieren an Tag 7 vorhanden (Abb. 4.8). Auffällig war jedoch, dass die Zahl der Fibrozyten in der Milz und im Blut der CCR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nicht verändert war (Abb. 4.9, A und B). Dies verdeutlicht, dass ein

vermindertes Auftreten der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten nicht mit einer reduzierten Zahl der Fibrozyten in der Milz oder peripherem Blut einhergeht. Hingegen war die Zahl der Fibrozyten in der UUO Niere der CCR2^{-/-} Mäuse signifikant reduziert (Abb. 4.9, C). Diese Resultate legen nahe, dass die Migration der Fibrozyten aus der Milz in die Niere CCR2 abhängig ist.

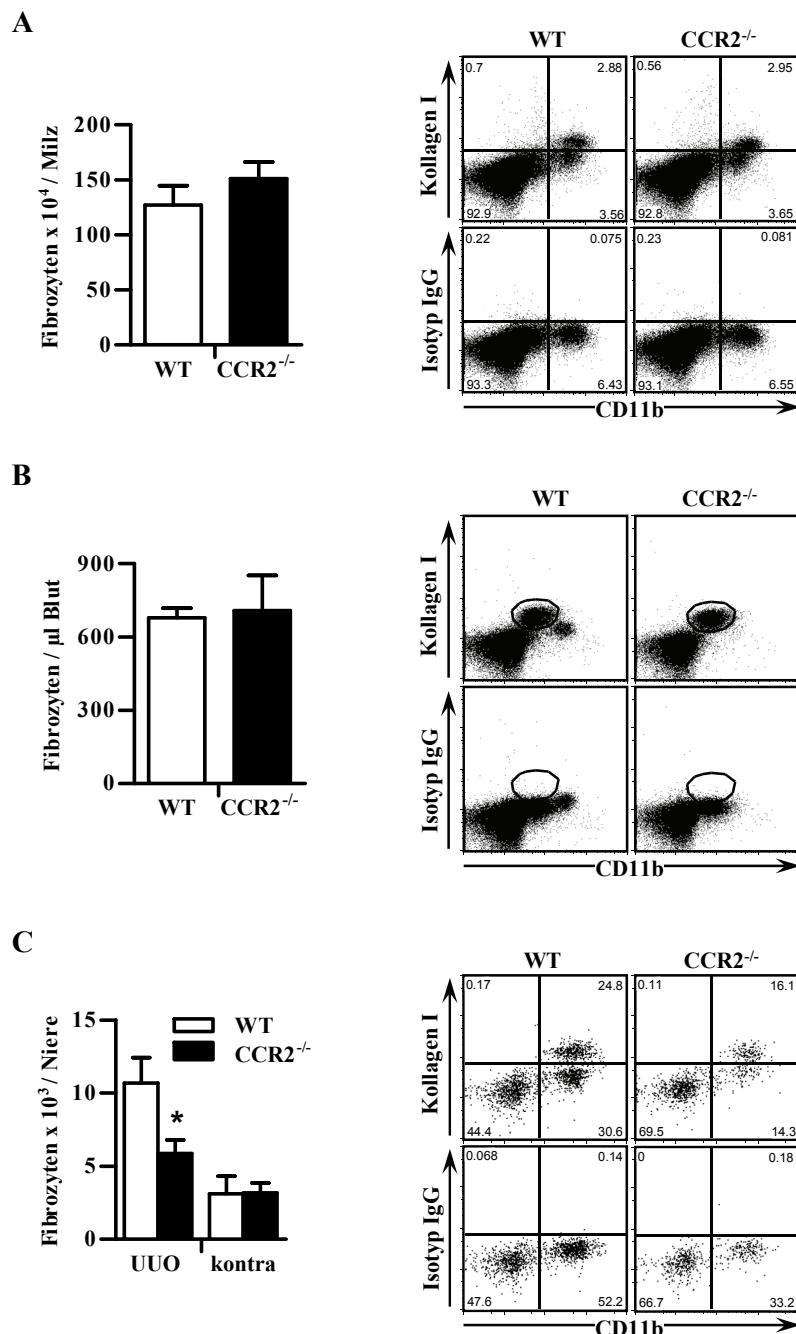


Abb. 4.9 Fibrozyten in CCR2^{-/-} und Wildtyp-Mäusen. Die Ureterligatur in Wildtyp (WT, weiße Balken) und CCR2 defizienten Mäusen (CCR2^{-/-}, schwarze Balken) wurde an Tag 0 durchgeführt. CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten wurden mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW \pm SEM, n = 5 pro Gruppe). Zahl der Fibrozyten (A) in der Milz, (B) im Blut, (C) in der obstruierten und kontralateralen Niere an Tag 7 nach der UUO. Repräsentative FACS DotPlots sind dargestellt. *: p < 0,05.

Die Ausprägung der renalen Fibrose in der UUO-Niere wurde zum einen mittels Immunfluoreszenz anhand der Akkumulation von Kollagen I und zum anderen mittels quantitativer Real-Time PCR anhand der mRNA Expression von Kollagen I bestimmt (Abb. 4.10). Die reduzierte Zahl der Fibrozyten korrelierte hierbei mit einer signifikant geringer ausgeprägten renalen Fibrose in $CCR2^{-/-}$ Mäusen.

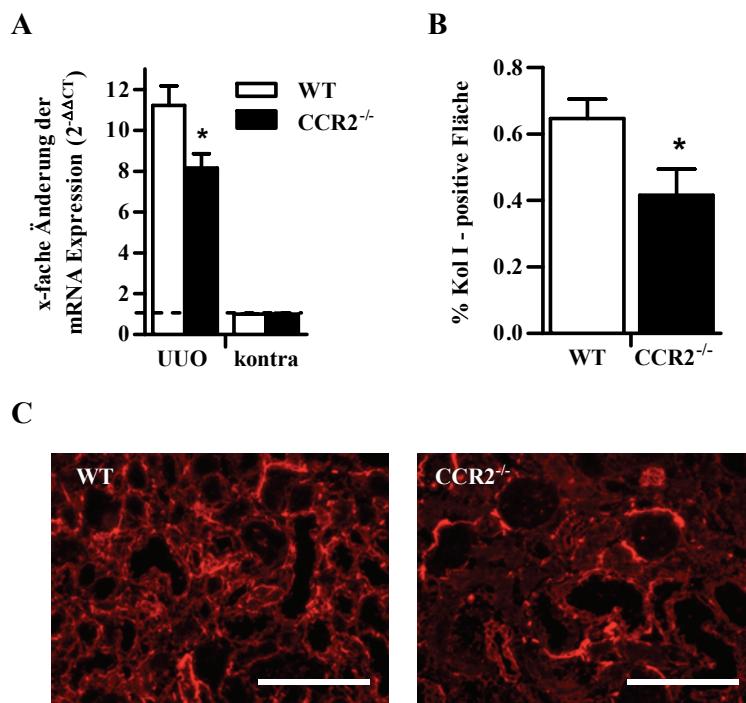


Abb. 4.10 Ausprägung der renalen Fibrose in $CCR2^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen. Die Ureterligatur in Wildtyp (WT, weiße Balken) und CCR2 defizienten Mäusen ($CCR2^{-/-}$, schwarze Balken) wurde an Tag 0 durchgeführt (n = 5 pro Gruppe). (A) Relative Änderung der mRNA Expression von Kollagen I in der UUO und kontralateraler Niere in Bezug zum Referenz-Gen beta-Aktin (MW \pm SEM). Die Expression in der kontralateralen Niere wurde als 1,0 angenommen. (B) Quantifizierung der Kollagen I-positiven Fläche (rot) in der ligierten Niere mittels Immunfluoreszenz-Färbung. Die Kollagen I-positive Fläche ist in Prozent von der gesamten Fläche pro Gesichtsfeld dargestellt (MW \pm SEM). (C) Repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder sind gezeigt (200-fache Vergrößerung; Messbalken entspricht 100 μ m). *: p < 0,05.

4.1.4 Depletion der Fibrozyten in CD11b-DTR Mäusen

Die Depletion der Fibrozyten mit MC-21 war aufgrund der geringen Expression von CCR2 auf Fibrozyten (s. Abschnitt 4.1.1) nicht möglich. Zusätzlich resultierte die längerfristige Behandlung mit MC-21 in der Entwicklung einer neutralisierenden Immunantwort gegen MC-21 [116]. Um beide Limitationen zu umgehen und Fibrozyten eine hohe Expression von CD11b aufweisen, wurden transgene Mäuse, die den hochaffinen simianen Diphtherie Toxin Rezeptor unter der Kontrolle des CD11b Promotors (CD11b-DTR Mäuse) exprimieren, für die nachfolgenden Untersuchungen herangezogen. Die Depletion der CD11b⁺ Zellen wird hierbei mit der Verabreichung von Diphtherie Toxin (DT) ermöglicht.

Zunächst wurden Knochenmark-chimäre Mäuse generiert, indem das Knochenmark aus den transgenen CD11b-DTR Mäusen in lethal bestrahlte Wildtyp-Mäuse transferiert wurde. Dadurch wurden toxische Effekte des DT auf Zellen, die nicht aus dem Knochenmark stammen, ausgeschlossen. Die Depletion wurde damit ausschließlich auf die aus dem Knochenmark stammenden CD11b⁺ Zellen beschränkt. Aufgrund der hohen Expression von CD11b auf Fibrozyten in der Milz und in der Niere sollten Fibrozyten durch das DT in CD11b-DTR Mäusen exzellent depletiert werden. DT wurde von Tag -1 bis Tag 6 verabreicht und die UUO wurde an Tag 0 durchgeführt.

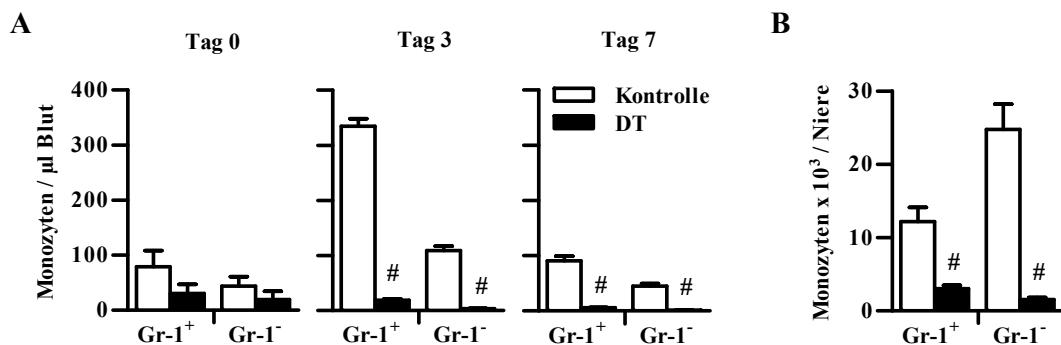


Abb. 4.11 Depletion der Monozyten in CD11b-DTR Knochenmark-chimären Mäusen. Die Mäuse wurden mit PBS (Kontrolle) oder Diphtherie Toxin (DT) an Tag -1 und Tag 1 bis 6 behandelt (n = 5 pro Gruppe). Die UUO wurde an Tag 0 durchgeführt. Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten wurden mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW ± SEM). (A) Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten im peripheren Blut an Tag 0, Tag 3 und Tag 7 nach der UUO. (B) Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten in der obstruierten Niere an Tag 7 nach der UUO. #: p < 0,005.

Nach der ersten Injektion des DT zeigte sich eine Reduktion der Monozyten im Blut um 50 % und weitere tägliche Injektionen resultierten in einer fast kompletten Depletion der CD11b⁺ Monozyten an Tag 3 und Tag 7 (Abb. 4.11, A). Auch in der ligierten Niere wurde die Zahl der Gr-1⁺ sowie Gr-1⁻ Monozyten mit der Behandlung von DT beträchtlich reduziert (Abb. 4.11, B). Zusätzlich reduzierte die Behandlung mit DT die Zahl der Fibrozyten sowohl in der Milz als auch in der ligierten Niere erheblich (Abb. 4.12, A und B). Die reduzierte Zahl der Fibrozyten korrelierte mit einer signifikant verminderten Anhäufung von Kollagen I und einer reduzierten Expression von Kollagen I auf mRNA Ebene in der ligierten Niere (Abb. 4.12, C - E). Diese Daten zeigen, dass die Depletion von aus dem Knochenmark stammenden CD11b⁺ Zellen die Zahl der Fibrozyten in der Milz und der Niere reduziert und auch die Entwicklung der renalen Fibrose beeinträchtigt.

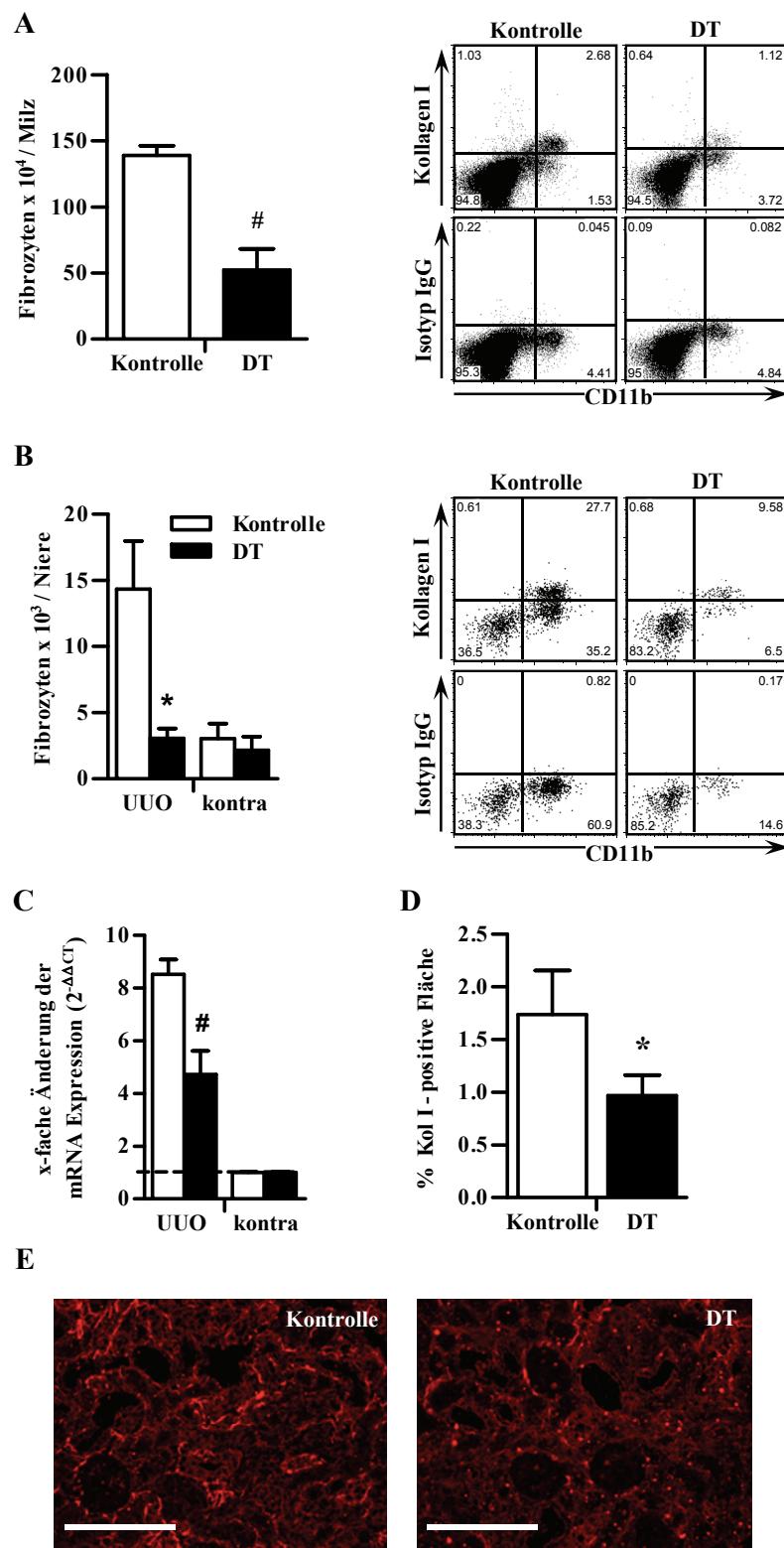


Abb. 4.12 Depletion der Fibrozyten in CD11b-DTR Knochenmark-chimären Mäusen. Die Mäuse wurden mit PBS (Kontrolle) oder Diphtherie Toxin (DT) an Tag -1 und Tag 1 bis 6 behandelt (n = 5 pro Gruppe). Die UUO wurde an Tag 0 durchgeführt. CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten wurden mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW ± SEM). Zahl der Fibrozyten (A) in der Milz, (B) in der ligierten und kontralateralen Niere an Tag 7 nach der Ureterobstruktion. Repräsentative FACS DotPlots zu (A) und (B) sind dargestellt. (C) Relative Änderung der mRNA Expression von Kollagen I in der ligierten und kontralateralen Niere in Bezug zum Referenz-Gen beta-Aktin (MW ± SEM). Die Expression in der kontralateralen Niere wurde als 1,0 angenommen. (D) Quantifizierung der Kollagen I-positiven Fläche (rot) in der obstruierten Niere mittels Immunfluoreszenz-Färbung. Die Kollagen I-positive Fläche ist in Prozent von der Gesamtfläche pro Gesichtsfeld dargestellt (MW ± SEM). (E) Repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder zu (D) sind gezeigt (200-fache Vergrößerung; Messbalken entspricht 100 µm). #: p < 0,005; *: p < 0,05.

4.1.5 Depletion der Fibrozyten mit dem anti-Gr-1 Antikörper

Die hohe Expression von Gr-1 auf der Zell-Oberfläche der Fibrozyten in der Milz und Niere ermöglicht eine Depletion dieser Zellen mit dem gegen Gr-1 gerichteten Antikörper (Klon RB6-8C5). Dieser Antikörper depletiert sowohl Gr-1⁺ Monozyten als auch Gr-1⁺ Neutrophile Granulozyten in Mäusen [117]. Um eine Depletion von Fibrozyten mithilfe des anti-Gr-1 Antikörpers im Rahmen der renalen Fibrose zu induzieren, wurde die UUO an Tag 0 durchgeführt und der anti-Gr-1 Antikörper oder ein Isotyp-Kontrollantikörper (IgG2b) täglich von Tag -1 bis Tag 6 verabreicht. Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass der anti-Gr-1 Antikörper im Blut fast komplett die Gr-1⁺ Monozyten und die Neutrophilen Granulozyten bis Tag 3 depletierte (Abb. 4.13, A und B). Die Wirksamkeit des anti-Gr-1 Antikörpers wurde jedoch nicht bis Tag 7 aufrecht gehalten, ähnlich der Behandlung mit MC-21, sodass sich keine Unterschiede mehr zwischen den behandelten Gruppen an Tag 7 zeigten. In der ligierten Niere gab es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Zahl der Monozyten an Tag 7 (Abb. 4.13, C).

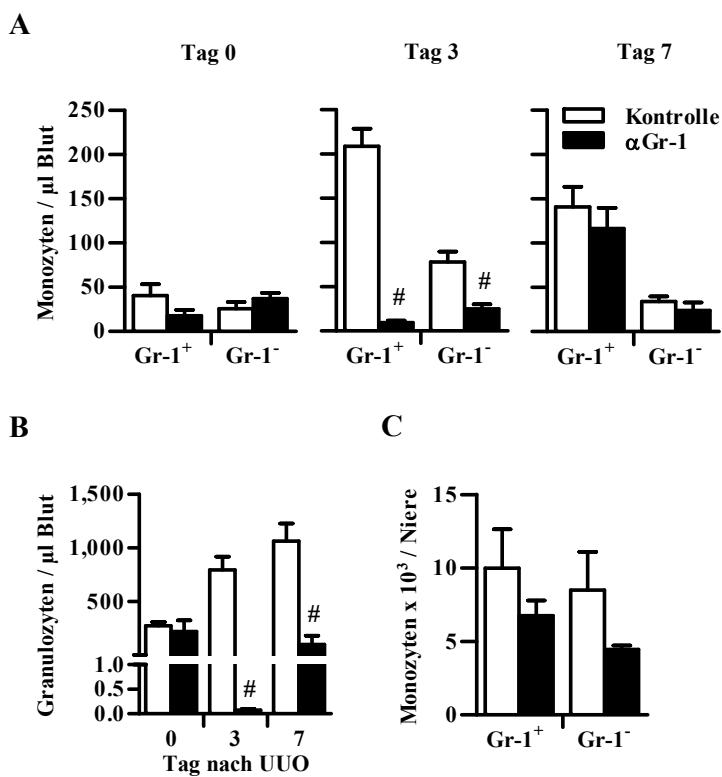


Abb. 4.13 Depletion von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten nach Behandlung mit anti-Gr-1 von Tag -1 bis Tag 6. C57BL/6N Mäuse wurden mit anti-Gr-1 (schwarze Balken) oder Isotyp-Kontrollantikörper (Kontrolle, weiße Balken) von Tag -1 bis 6 behandelt (n = 5 pro Gruppe) und die UUO wurde an Tag 0 durchgeführt. Gr-1⁺, Gr-1⁻ Monozyten und Neutrophile Granulozyten wurden mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW \pm SEM). (A) Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten im peripheren Blut an Tag 0, Tag 3 und Tag 7 nach der UUO. (B) Zahl der Neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut an Tag 0, Tag 3 und Tag 7 nach der UUO. (C) Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten in der ligierten Niere an Tag 7 nach der UUO. #: p < 0,005.

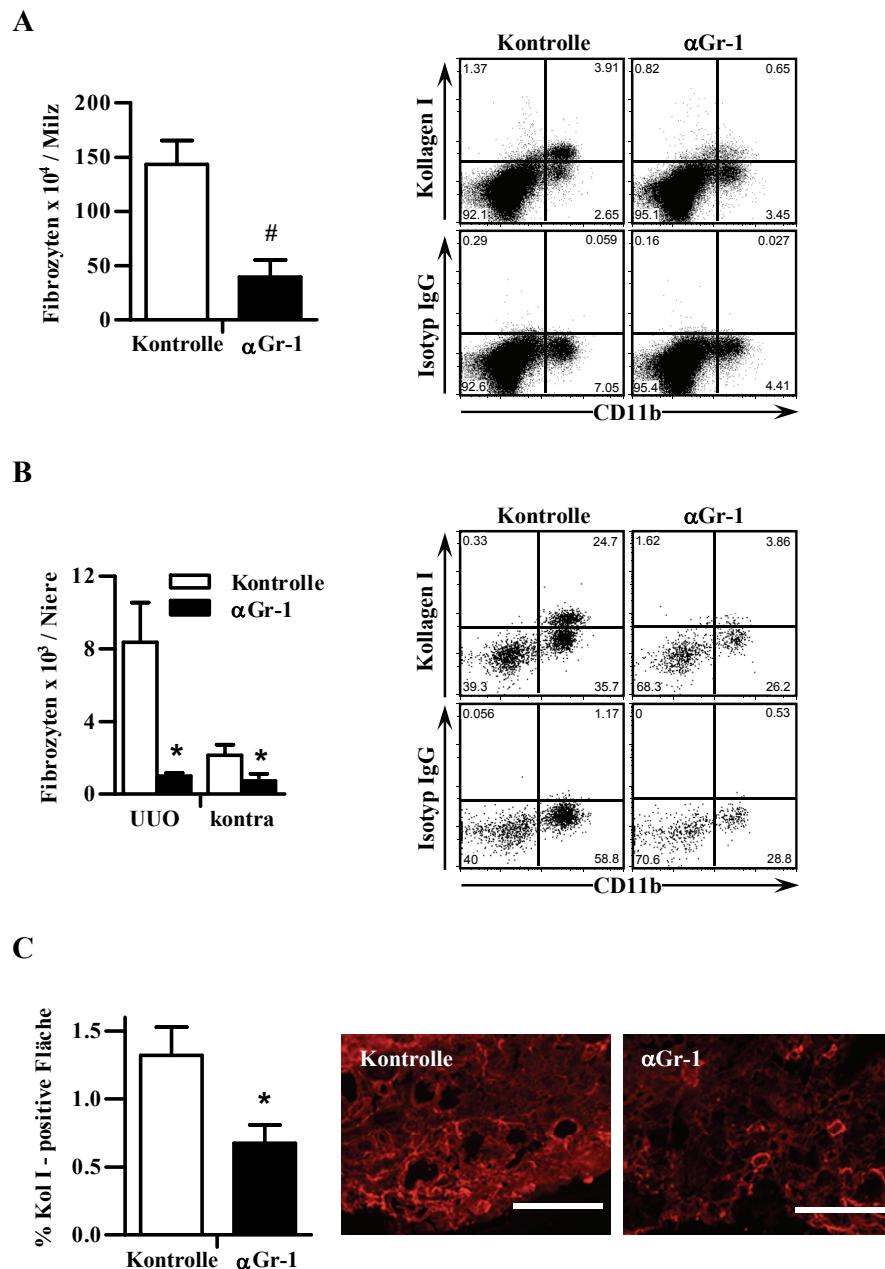


Abb. 4.14 Depletion der Fibrozyten nach der Behandlung mit anti-Gr-1 von Tag -1 bis Tag 6. C57BL/6N Mäuse wurden mit anti-Gr-1 (schwarze Balken) oder Isotyp-Kontrollantikörper (Kontrolle, weiße Balken) von Tag -1 bis 6 behandelt ($n = 5$ pro Gruppe) und die UUO wurde an Tag 0 durchgeführt. CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten wurden mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW \pm SEM). Zahl der Fibrozyten (A) in der Milz, (B) in der obstruierten und kontralateralen Niere an Tag 7 nach der UUO. Repräsentative FACS DotPlots sind dargestellt. (C) Quantifizierung der Kollagen I-positiven Fläche (rot) in der ligierten Niere mittels Immunfluoreszenz-Färbung. Die Kollagen I-positive Fläche ist in Prozent von der Gesamtfläche pro Gesichtsfeld dargestellt (MW \pm SEM). Repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder sind gezeigt (200-fache Vergrößerung; Messbalken entspricht 100 μ m). #: $p < 0,005$; *: $p < 0,05$.

Im Gegensatz zu den Experimenten mit dem anti-CCR2 Antikörper MC-21 resultierte die Injektion des Antikörpers gegen Gr-1 in einer erheblichen Depletion der Fibrozyten in der Milz und in der Niere (Abb. 4.14, A und B). Die Ausprägung der renalen Fibrose, die mittels Immunfluoreszenz anhand der Kollagen I-Deposition bestimmt wurde, zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion in den anti-Gr-1 behandelten Mäusen (Abb. 4.14, C). Um zu

analysieren, ob der anti-Gr-1 Antikörper auch Fibrozyten depletiert kann, die bereits in die Niere eingewandert sind, wurde die Injektion des Antikörpers an den Tagen 3 bis 6 durchgeführt. Somit wurde die Migration der Fibrozyten in die obstruierte Niere bis Tag 3 nach der Ureterligatur ermöglicht.

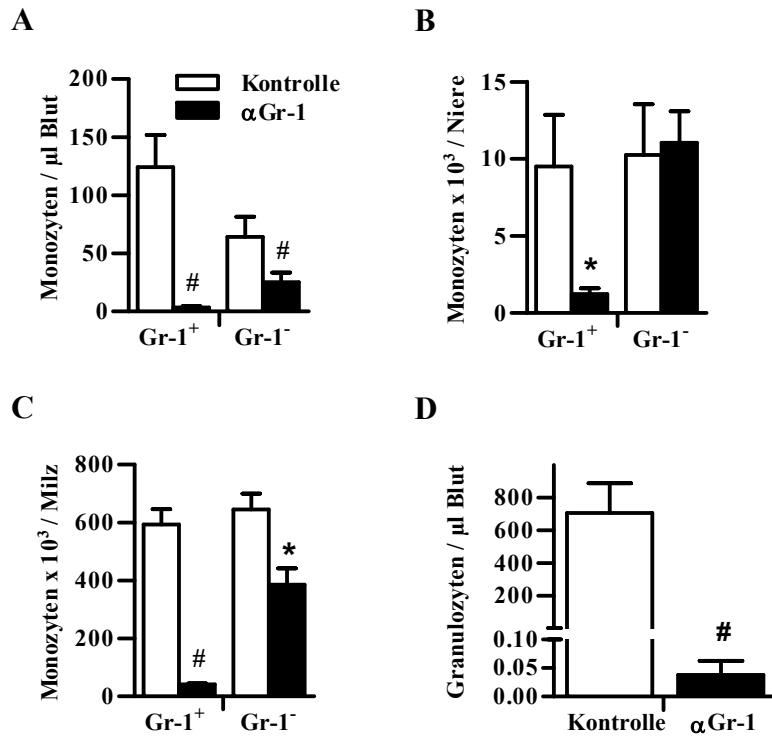


Abb. 4.15 Depletion der Monozyten und Neutrophilen Granulozyten nach der Behandlung mit anti-Gr-1 von Tag 3 bis 6. C57BL/6N Mäuse wurden mit anti-Gr-1 (schwarze Balken) oder Isotyp-Kontrollantikörper (Kontrolle, weiße Balken) von Tag 3 bis 6 behandelt ($n = 5$ pro Gruppe) und die UUO wurde an Tag 0 durchgeführt. Gr-1⁺, Gr-1⁻ Monozyten und Neutrophile Granulozyten wurden mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW \pm SEM). Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten (A) im peripheren Blut, (B) in der UUO-Niere und (C) Milz an Tag 7 nach der UUO. (D) Zahl der Neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut an Tag 7 nach der UUO. #: $p < 0,005$; *: $p < 0,05$.

Die späte Kurzzeit-Behandlung mit dem anti-Gr-1 Antikörper depletierte zu einem großen Umfang nicht nur Gr-1⁺ Monozyten und Neutrophile Granulozyten in Blut, Milz und fibrotischer Niere (Abb. 4.15), sondern eliminierte ebenfalls fast komplett die Fibrozyten aus der Milz und der ligierten Niere (Abb. 4.16, A und B). Dieses Ergebnis zeigt, dass der Antikörper auch auf die Fibrozyten, die bereits während der ersten 3 Tage nach der Obstruktion des Ureters in die Niere eingewandert sind, wirkt. Die Depletion der Fibrozyten mit dem anti-Gr-1 Antikörper von Tag 3 bis Tag 6 reduzierte auch die Akkumulation von Kollagen I und somit auch den Grad der renalen Fibrose (Abb. 4.15 C).

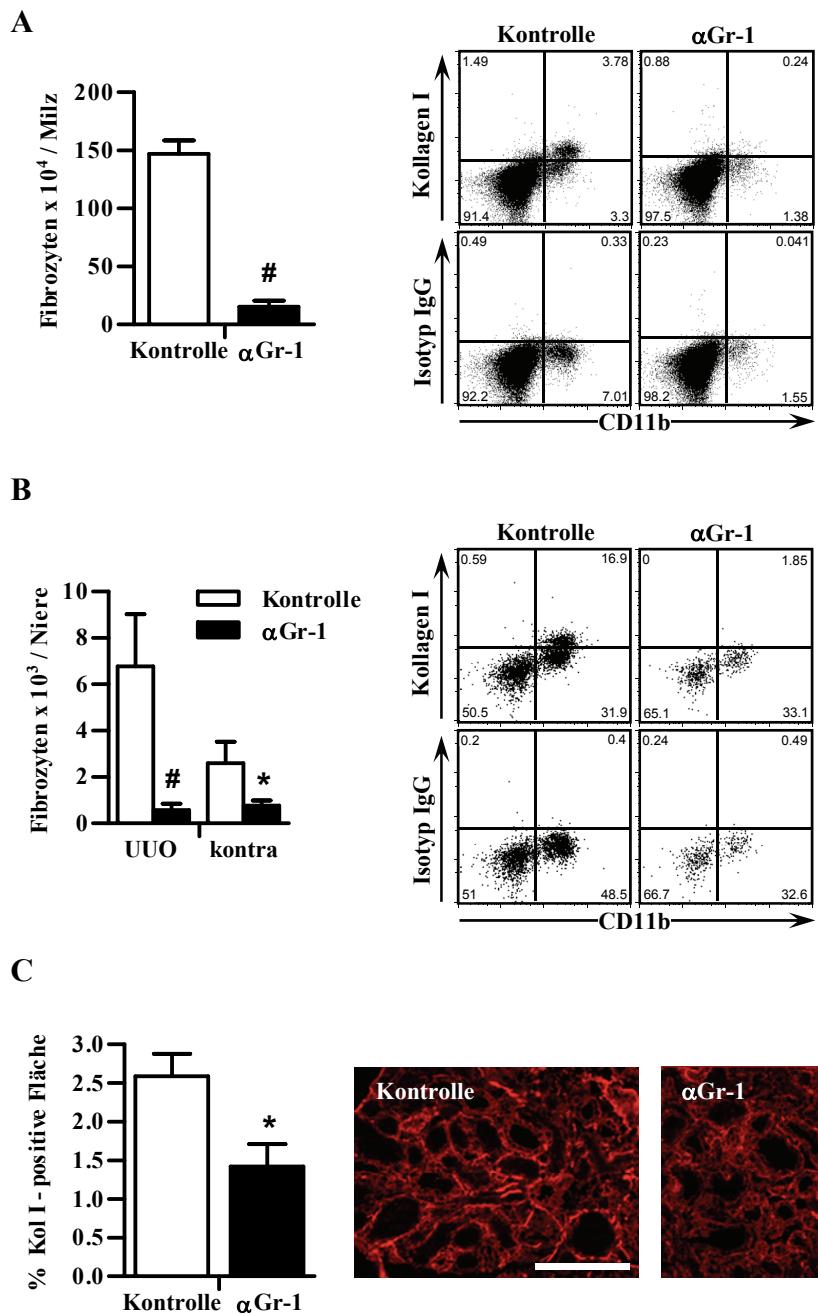


Abb. 4.16 Depletion der Fibrozyten nach der Behandlung mit α Gr-1 von Tag 3 bis 6. C57BL/6N Mäuse wurden mit anti-Gr-1 (schwarze Balken) oder Isotyp-Kontrollantikörper (Kontrolle, weiße Balken) von Tag 3 bis 6 behandelt (n = 5 pro Gruppe) und die UUO wurde an Tag 0 durchgeführt. CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten wurden mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW \pm SEM). Zahl der Fibrozyten (A) in der Milz, (B) in der ligierten und kontralateralen Niere an Tag 7 nach der UUO. Repräsentative FACS DotPlots sind dargestellt. (C) Quantifizierung der Kollagen I-positiven Fläche (rot) in der ligierten Niere mittels Immunfluoreszenz-Färbung (200-fache Vergrößerung; Messbalken entspricht 100 μ m). Die Kollagen I-positiven Fläche ist in Prozent von der Gesamtfläche pro Gesichtsfeld dargestellt (MW \pm SEM). #: p < 0,005; *: p < 0,05.

Neben der späten Kurzzeit-Behandlung (Tag 3 bis 6), wurde der anti-Gr-1 Antikörper auch vor und die ersten beiden Tage nach der dauerhaften Okklusion des Harnleiters injiziert. Bei diesem Ansatz sollte überprüft werden, ob Fibrozyten auch in der frühen Phase der UUO depletiert werden können und somit die Einwanderung dieser Kollagen I⁺ Zellen verhindert

werden kann. Die Organentnahme von Blut, Milz und Nieren wurde an Tag 3 durchgeführt und daraufhin einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Die Gabe von anti-Gr-1 reduzierte dabei merklich die Zahl der Gr-1⁺ Monozyten, Neutrophilen Granulozyten (Abb. 4.17, A - D) und Fibrozyten in Blut, Milz und abgebundener Niere (Abb. 4.17, E und F).

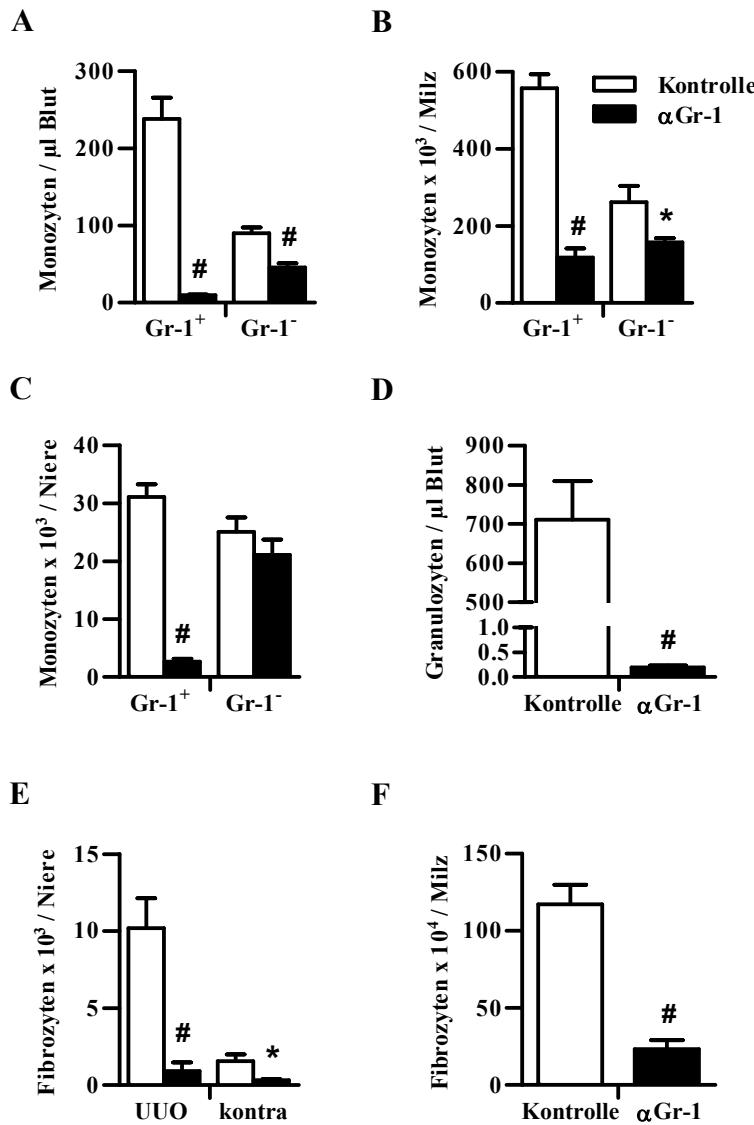


Abb. 4.17 Depletion der Monozyten, Neutrophilen Granulozyten und Fibrozyten nach der Behandlung mit anti-Gr-1 von Tag -1 bis 2. C57BL/6N Mäuse wurden mit anti-Gr-1 (schwarze Balken) oder Isotyp-Kontrollantikörper (Kontrolle, weiße Balken) von Tag -1 bis 2 behandelt (n = 5 pro Gruppe) und die UUO wurde an Tag 0 durchgeführt. Gr-1⁺, Gr-1⁻ Monozyten, Neutrophile Granulozyten, CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten wurden mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW \pm SEM). Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten (A) im peripheren Blut, (B) in der ligierten Niere und (C) Milz an Tag 3 nach der UUO. (D) Zahl der Neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut an Tag 3 nach der UUO. (E) Zahl der Fibrozyten in der obstruierten und kontralateralen Niere und (F) in der Milz an Tag 3 nach der UUO. #: p < 0,005; *: p < 0,05.

Zusammenfassend demonstrieren diese Daten eindrucksvoll, dass Fibrozyten effizient mit dem anti-Gr-1 Antikörper aus der Milz und Niere depletiert werden können. Aus diesen Daten ist ebenfalls zu entnehmen, dass Fibrozyten einen signifikanten Beitrag zur Entwicklung der renalen Fibrose im Modell der einseitigen Ureterobstruktion leisten. Die Resultate deuten aber

auch darauf hin, dass Fibrozyten in der fibrotischen Niere nicht lokal aus Monozyten entstehen, sondern dass sie als Kollagen-produzierende Zellen in der Milz von gesunden Mäusen existieren, und dass sie CCR2-abhängig in die ligierte Niere einwandern, wo sie zur Ablagerung von Kollagen I beitragen.

4.2 Rolle von CD4⁺ T-Zellen bei der Fibrozytenentstehung *in vivo*

Durch Vorarbeiten von Marianne Niedermeier [58] konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass die Differenzierung der Fibrozyten aus Monozyten durch die Anwesenheit von naiven CD4⁺ T-Zellen deutlich gesteigert wird. Des Weiteren wurde dieses Ergebnis durch einen zweiten *in vitro* Ansatz bestätigt, indem CD4⁺ T-Lymphozyten durch magnetische Beads aus Gesamtsplenozyten depletiert und anschließend die Fibrozytenzahl bestimmt wurde. Dabei verminderte das Fehlen der CD4⁺ T-Zellen die Entwicklung der Fibrozyten deutlich im Vergleich zu nicht depletierten Kontroll-Bedingungen in diesem Ansatz. Um den Einfluss der T-Zellen *in vivo* im Rahmen einer renalen Fibrose zu untersuchen, wurde die UUO zunächst in immundefizienten SCID Mäusen durchgeführt. Aufgrund einer spontanen Mutation besitzen diese Mäuse keine reifen B- und T-Zellen [118]. Die Zahl der Fibrozyten und die Ausprägung der Fibrose in UUO-Nieren der SCID Mäuse waren im Vergleich zu Balb/c Kontroll-Mäusen signifikant vermindert.

Da in SCID Mäusen sowohl T- als auch B-Zellen fehlen, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle der CD4⁺ T-Lymphozyten bei der Fibrozytenentstehung *in vivo* durch die spezifische Depletion mit dem Antikörper GK1.5 in UUO-Mäusen untermauert werden.

4.2.1 Depletion von CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut der C57BL/6N Mäuse

Der Einfluss der CD4⁺ T-Zellen *in vivo* wurde durch Depletion mit dem Antikörper anti-CD4 (GK1.5) untersucht. Die depletierende Wirkung des Antikörpers wurde bereits 1984 von Cobbold *et al.* beschrieben [119]. GK1.5 bindet an das auf T-Zellen exprimierte Oberflächenmolekül L3T4 [120] und depletiert damit spezifisch CD4⁺ T-Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurden CD4⁺ T-Lymphozyten durch die tägliche Injektion des GK1.5 Antikörpers (300 µg i.p.) von Tag -3 bis Tag -1 vor der UUO (Tag 0) depletiert. Kontroll-Mäuse erhielten statt GK1.5 den entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper (IgG2b). Die erfolgreiche Depletion der CD4⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch durch die indirekte Färbung der Oberflächenmoleküle CD5 und CD8 an Tag 0 und Tag 7 im peripheren Blut der behandelten Mäuse kontrolliert. Da alle T-Zellen das Oberflächenmolekül CD5 exprimieren und sie sich in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aufteilen, wurden die CD4⁺ T-Lymphozyten als CD5⁺ CD8⁻ Zellen

identifiziert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden dabei bis Tag 7 in der mit GK1.5 behandelten Gruppe fast komplett eliminiert (Abb. 4.18).

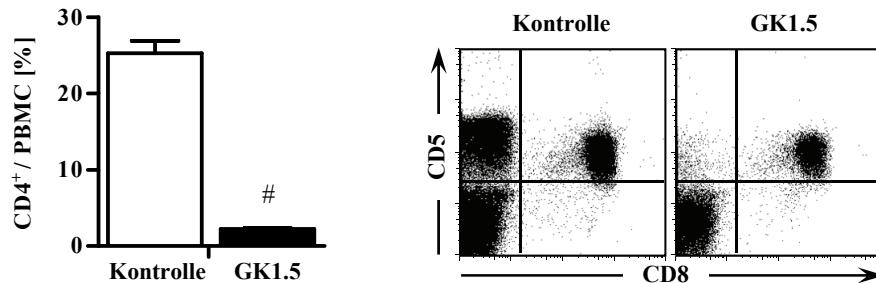


Abb. 4.18 Depletion der CD4⁺ T-Zellen nach Behandlung mit GK1.5. C57BL/6N Mäuse wurden mit anti-CD4 (GK1.5, schwarze Balken) oder Isotyp-Kontrollantikörper (Kontrolle, weiße Balken) von Tag -3 bis Tag -1 behandelt (n = 5 pro Gruppe). Dargestellt ist die Zahl der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut an Tag 7 nach der UUO, die mittels Durchflusszytometrie in Bezug zu Gesamt-PBMC quantifiziert wurde (MW ± SEM). CD4⁺ T-Zellen wurden als CD5⁺ CD8⁻ Zellpopulation im linken oberen Quadranten identifiziert (s. repräsentative FACS DotPlots). #: p < 0,005.

4.2.2 Reduzierte Fibrozytenzahl und Fibrose in UUO-Nieren nach CD4⁺ T-Zell Depletion

Am Tag der Organentnahme (Tag 7) wurden die obstruierte und kontralaterale Nieren sowie die Milz entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Fibrozyten wurden als CD45⁺ Kollagen I⁺ Zellen identifiziert und in Bezug auf Gesamt CD45⁺ Zellen quantifiziert (Abb. 4.19, A). Durch Abwesenheit der CD4⁺ T-Zellen im Verlauf der UUO wurde die Fibrozytenakkumulation in der ligierten Niere signifikant reduziert. Hingegen zeigte sich in der kontralateralen Niere und in der Milz keine Veränderung in der Zahl der Fibrozyten (Abb. 4.19). Die Untersuchung der Kollagenproduktion in der fibrotischen Niere zeigte anhand einer immunfluoreszenztechnischen Auswertung, dass die GK1.5 behandelte Gruppe signifikant weniger Kollagen I-positive Fläche aufwies als die Kontroll-Gruppe (Abb. 4.19, B und C). Dieses Ergebnis korrelierte mit der vorher bestimmten und verminderten Zahl der Fibrozyten. Diese Resultate und die vorhandenen Vorarbeiten zeigen eindeutig den Zusammenhang zwischen CD4⁺ T-Zellen und der Fibrozytenakkumulation im Modell der renalen Fibrose. Bei Abwesenheit der CD4⁺ T-Lymphozyten *in vivo* ist die Zahl der Fibrozyten und die renale Fibrose deutlich reduziert.

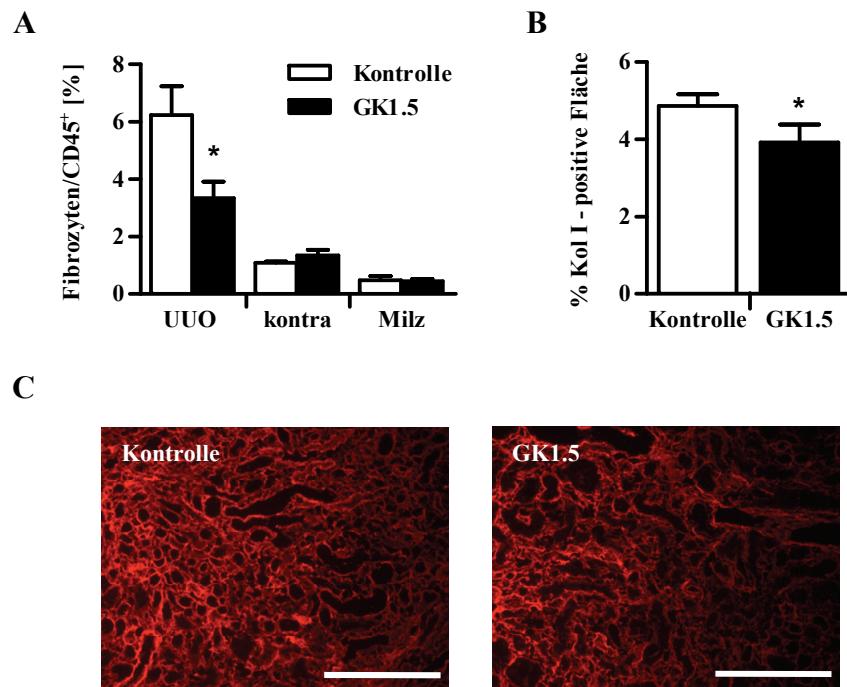


Abb. 4.19 Zahl der Fibrozyten und Grad der renalen Fibrose nach Behandlung mit GK1.5. C57BL/6N Mäuse wurden mit anti-CD4 (GK1.5, schwarze Balken) oder Isotyp-Kontrollantikörper (Kontrolle, weiße Balken) von Tag -3 bis Tag -1 behandelt ($n = 5$ pro Gruppe) und die UUO wurde an Tag 0 durchgeführt. CD45⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten wurden mittels Durchflusszytometrie in Bezug auf Gesamt-CD45⁺ Zellen quantifiziert (MW \pm SEM). (A) Zahl der Fibrozyten in der UUO-Niere, kontralateralen Niere und Milz an Tag 7 nach der UUO. (B) Quantifizierung der Kollagen I-positiven Fläche (rot) in der ligierten Niere mittels Immunfluoreszenz-Färbung. Die Kollagen I-positive Fläche ist in Prozent von der Gesamtfläche pro Gesichtsfeld dargestellt (MW \pm SEM). (C) Repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder zu (B) sind gezeigt (200-fache Vergrößerung; Messbalken entspricht 100 μ m). *: $p < 0,05$.

4.3 Rolle von Basophilen Granulozyten bei der Fibrozytenakkumulation in der fibrotischen Niere

Basophile Granulozyten haben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen Einfluss auf den Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen [95]. Die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von Basophilen Granulozyten führt dabei zu einer deutlich reduzierten Freisetzung von IL-2, TNF und IFN γ und einer Steigerung der Expression von IL-13 und IL-10. Die Zytokine IL-2, TNF und IFN γ wiederum supprimieren die Entwicklung der Fibrozyten *in vitro* [58]. Im Gegensatz dazu steigern die Zytokine IL-13 und IL-10 die Fibrozytendifferenzierung [49, 58], sodass auch Basophile Granulozyten zu einer erhöhten Entwicklung der Fibrozyten beitragen und somit auch die renale Fibrose begünstigen könnten.

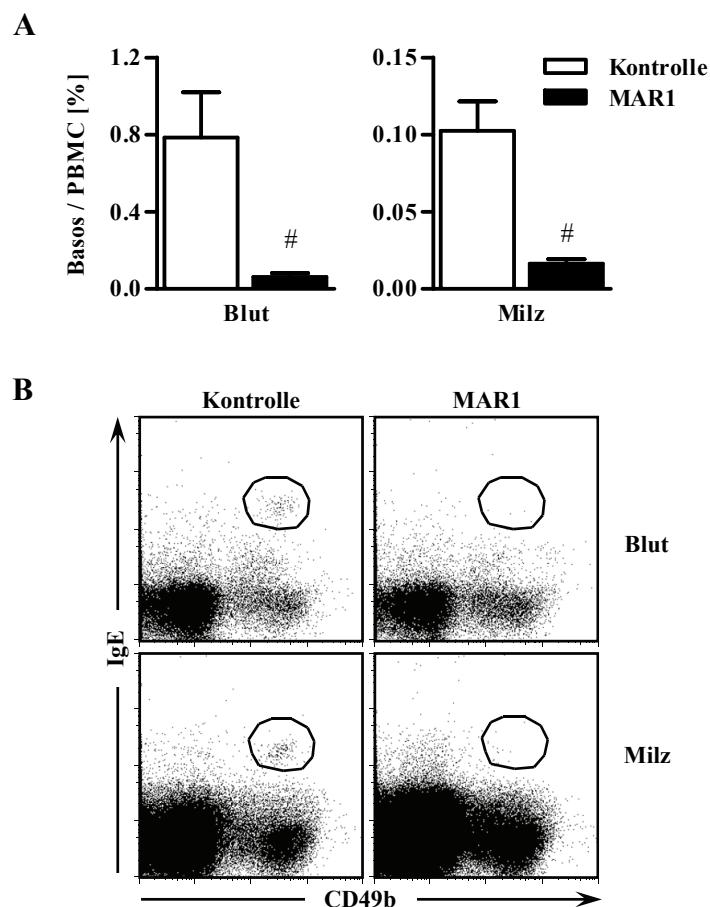
Im folgenden Versuchsteil wurde der Einfluss Basophiler Granulozyten auf die Rekrutierung der Fibrozyten *in vivo* zum einen durch Depletion mit dem Antikörper anti-Fc ϵ RI α (MAR1) und zum anderen durch Aktivierung mit dem Zytokin IL-3 analysiert.

4.3.1 Depletion Basophiler Granulozyten im Modell der UUO

Durch die vorhergehenden Versuche in dieser Arbeit zur phänotypischen Charakterisierung der Fibrozyten *in vivo* (s. Kapitel 4.1), ergab sich die Hypothese, dass Fibrozyten nicht lokal aus Monozyten differenzieren, sondern dass Fibrozyten bereits als differenzierte oder teilweise differenzierte Kollagen-produzierende Zellen aus dem Blut oder aus der Milz in entzündetes Gewebe einwandern. Um der Fragestellung nachzugehen, ob Basophile Granulozyten an der gesteigerten Einwanderung der Fibrozyten im Modell der renalen Fibrose beteiligt sind, wurden Basophile Granulozyten zunächst mit dem Antikörper MAR1 depletiert. Die Wirkung des depletierenden Antikörpers MAR1 wurde bereits in anderen Arbeiten demonstriert [95, 96]. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Depletion der Basophilen Granulozyten durch die tägliche intraperitoneale Gabe des MAR1 Antikörpers von Tag -4 bis -2 durchgeführt. Kontrolltiere erhielten einen aus dem gleichen Wirt stammenden unspezifischen Kontrollantikörper mit demselben Isotyp. Die einseitige Ureterligatur folgte an Tag 0, die Organentnahme und die Analyse an Tag 7.

4.3.1.1 Behandlung der Mäuse mit MAR1 depletiert Basophile Granulozyten in Blut und Milz

Durchflusszytometrisch wurde zunächst eine Depletionskontrolle für Basophile Granulozyten im peripheren Blut und in der Milz der behandelten Tiere durchgeführt. Die Oberflächenmarker IgE und CD49b dienten dabei zur Identifizierung der doppelt positiven Basophilen Granulozyten. Die repräsentativen FACS DotPlots und die Quantifizierung der Zellen in Bezug auf die Gesamtlymphozyten an Tag 7 demonstrieren, dass Basophile Granulozyten durch die Behandlung mit MAR1 sowohl im Blut als auch in der Milz fast komplett depletiert wurden (Abb. 4.20). Die Depletion der Basophilen Granulozyten wurde bis zur Organentnahme an Tag 7 aufrechterhalten.



4.3.1.2 Einfluss Basophiler Granulozyten auf die Zahl der Monozyten

An Tag 7 wurden neben Milz und Blut auch die fibrotische sowie die kontralaterale Niere entnommen und die Zahl der Monozyten durchflusszytometrisch analysiert. Diese Untersuchung galt der Fragestellung, ob Basophile Granulozyten durch die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-6 [91] nach einer Entzündung die Rekrutierung der inflammatorischen Monozyten in die Niere beeinflussen. Die Zahl der CD45 $^+$ CD11b $^+$ Monozyten wurde in Relation zu Gesamt-CD45 $^+$ Zellen dargestellt und unterschied sich dabei nicht zwischen den MAR1- und Kontroll-behandelten Tieren weder in Blut oder Milz noch in den untersuchten Nieren (Abb. 4.21).

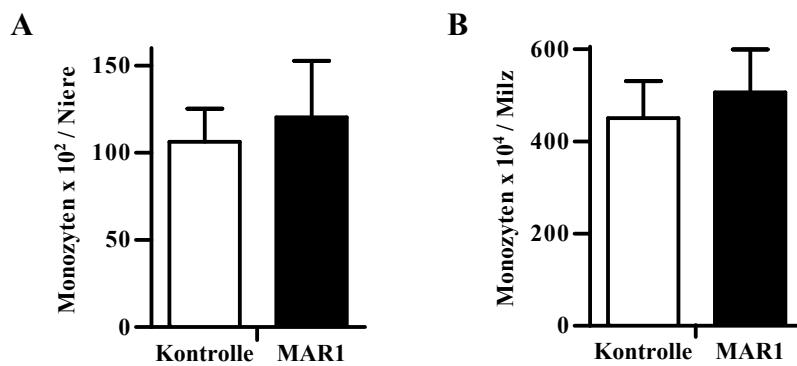
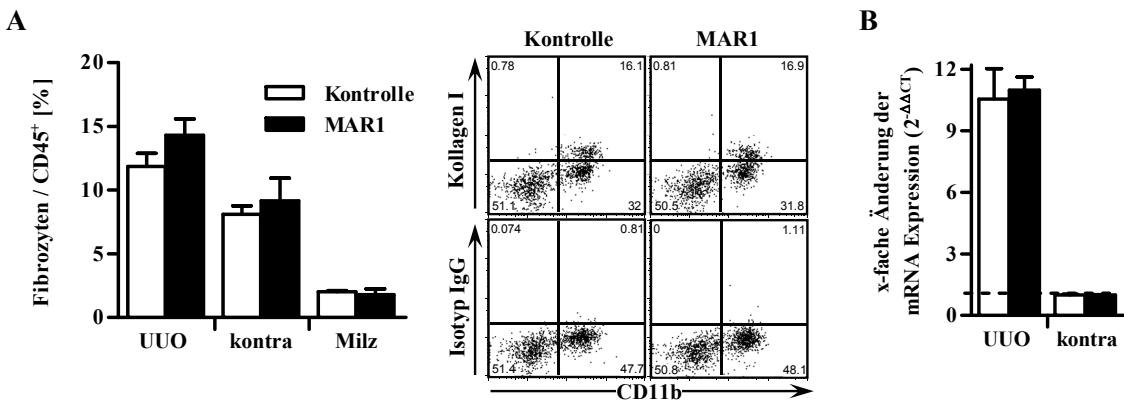


Abb. 4.21 Zahl der Monozyten nach Behandlung mit MAR1. C57BL/6N Mäuse wurden mit anti-Fc ϵ RI α (MAR1, schwarze Balken) oder Isotyp-Kontrollantikörper (Kontrolle, weiße Balken) von Tag -4 bis Tag -2 behandelt (n = 5 pro Gruppe) und die UUO wurde an Tag 0 durchgeführt. CD45 $^{+}$ CD11b $^{+}$ Monozyten wurden an Tag 7 mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW \pm SEM). (A) Zahl der Gesamt-Monozyten in der ligierten Niere und (B) in der Milz.

4.3.1.3 Basophile Granulozyten sind an der Akkumulation der Fibrozyten in der Niere im Modell der renalen Fibrose nicht beteiligt

Die Zahl der Monozyten blieb durch die Abwesenheit der Basophilen Granulozyten unverändert. Ob Basophile Granulozyten jedoch auf die Rekrutierung der Fibrozyten in die UUO-Niere Einfluss ausüben und sie die Zahl der Fibrozyten in der Milz verändern, wurde in dem folgenden Versuchsteil untersucht. An Tag 7 nach der Ureterligation wurde kein Unterschied in der eingewanderten Zahl der CD45 $^{+}$ CD11b $^{+}$ Kollagen I $^{+}$ Fibrozyten weder in den Nieren noch in der Milz zwischen den behandelten Gruppen festgestellt (Abb. 4.22, A). Aufgrund der vorhandenen Vorarbeiten zu Basophilen Granulozyten [95, 96] hätte erwartungsgemäß die Zahl der Fibrozyten in der ligierten Niere nach der Depletion Basophiler Granulozyten mit dem Antikörper MAR1 verringert sein müssen. Die abschließende Untersuchung der exprimierten Kollagen I mRNA für den Grad der Fibrose bestätigte die durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnisse und zeigte ebenfalls keinen Unterschied nach MAR1 Behandlung (Abb. 4.22, B).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht das Zytokinmilieu für die gesteigerte Kollagen I-Sekretion der Fibrozyten verantwortlich ist, sondern womöglich der Zell-Zell-Kontakt zu bestimmten Effektorzellen, wie CD4 $^{+}$ T-Zellen.



4.3.2 Aktivierung Basophiler Granulozyten im Modell der UUO

Wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, bewirkte die *in vivo* Depletion der Basophilen Granulozyten keinen Unterschied in der Zahl der Fibrozyten in der ligierten Niere. In diesem Abschnitt der Dissertation wurde überprüft, inwiefern sich die Gabe von IL-3 und die darauffolgende Aktivierung der Basophilen Granulozyten auf die Entwicklung der Fibrozyten in der fibrotischen Niere auswirken. Das Zytokin IL-3 nimmt in der Regulation der Hämatopoiese eine wichtige Rolle ein und wird hauptsächlich von CD4 $^{+}$ T-Zellen produziert [93]. *In vitro* und *in vivo* konnte bereits gezeigt werden, dass IL-3 eine Aktivierung von Basophilen Granulozyten induziert [95, 96]. Limitierend bei der Verabreichung von IL-3, aber auch anderen Zytokinen, ist die relativ kurze *in vivo* Halbwertszeit [111]. Die Bindung von IL-3 an einen anti-IL-3 Antikörper unter Bildung eines sogenannten IL-3 Immunkomplexes erhöht nicht nur die Halbwertszeit des Zytokins, sondern auch seine biologische Aktivität [112]. In dieser Arbeit wurden Basophile Granulozyten sowohl mit IL-3 als auch mit dem IL-3 Immunkomplex aktiviert und anschließend deren Zahl bestimmt.

4.3.2.1 Behandlung mit IL-3 steigert die Zahl der Basophilen Granulozyten in Blut und Milz

Die Ureterligatur zur Induktion der renalen Fibrose wurde an Tag 0 und die Aktivierung der Basophilen Granulozyten durch die tägliche Injektion von IL-3 oder des IL-3 Immunkomplexes (200 ng i.p.) von Tag 0 bis Tag 6 durchgeführt. Die Kontroll-Gruppe wurde

mit dem entsprechenden Träger-Puffer behandelt. An Tag 7 wurden Blut und Milz durchflusszytometrisch auf die Zahl der Basophilen Granulozyten analysiert. Abb. 4.23 stellt die Quantifizierung der Zellen in Prozent und die repräsentativen FACS DotPlots dar.

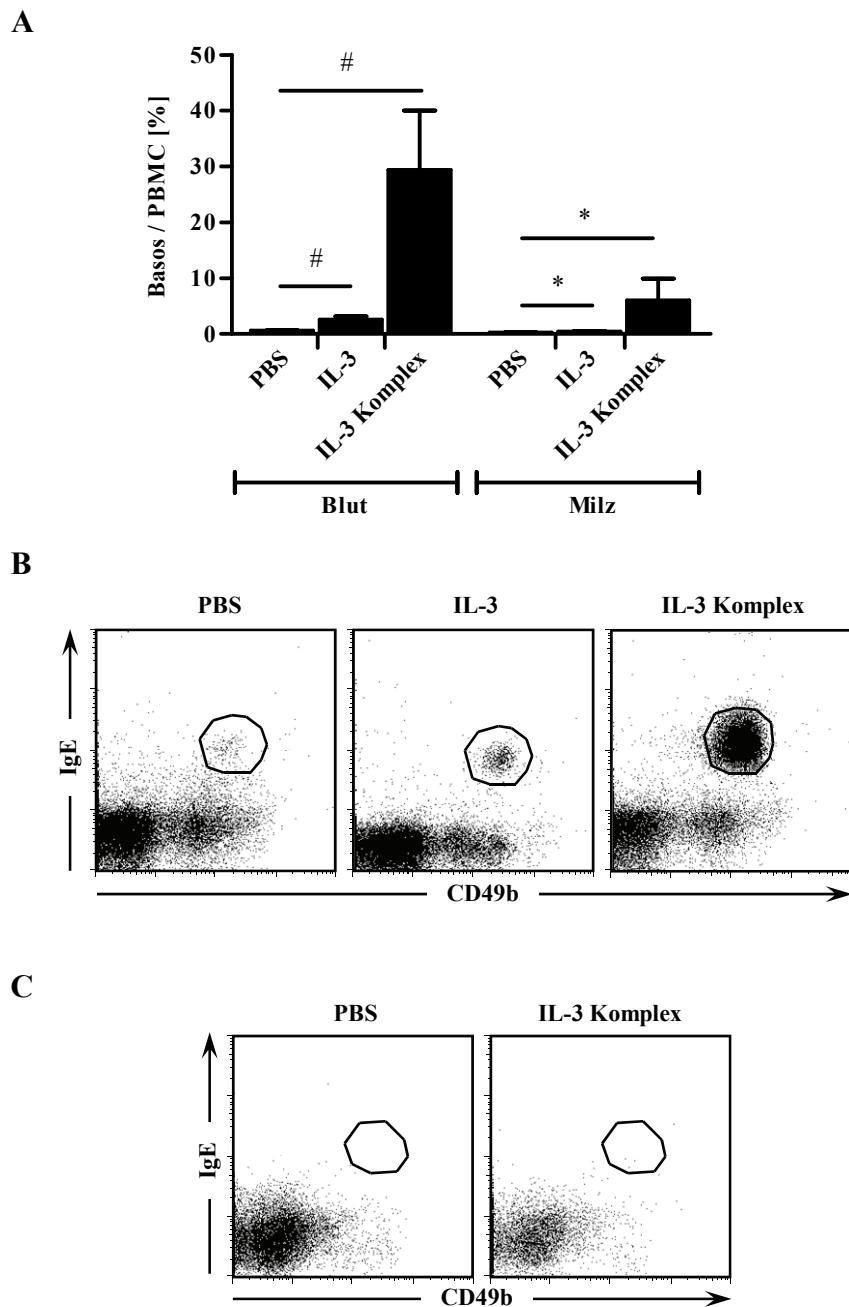


Abb. 4.23 Expansion der Basophilen Granulozyten nach Behandlung mit IL-3 und IL-3 Immunkomplex. C57BL/6N Mäuse wurden mit PBS, IL-3 oder IL-3 Immunkomplex von Tag 0 bis Tag 6 behandelt (n = 5 pro Gruppe). IgE⁺ CD49b⁺ Basophile Granulozyten (Basos) wurden mittels Durchflusszytometrie in Bezug auf PBMC quantifiziert (MW ± SEM). (A) Zahl der Basophilen Granulozyten im peripheren Blut und in der Milz an Tag 7 nach der UUO. (B) Repräsentative FACS DotPlots der PBMC im peripheren Blut an Tag 7 nach der UUO sind dargestellt. (C) Repräsentative FACS DotPlots der PBMC in der ligierten Niere der PBS und IL-3 Immunkomplex behandelten Gruppe an Tag 7 nach der UUO sind gezeigt. #: p < 0,005; *: p < 0,05.

Die Behandlung der Mäuse mit IL-3 steigerte die Zahl der IgE und CD49b doppelt positiven Basophilen Granulozyten auf das 8-fache im Blut und das 4-fache in der Milz. Hingegen zeigte die Behandlung mit IL-3 Immunkomplex einen enormeren Anstieg der Basophilen Granulozyten auf ein 49-faches im peripheren Blut und ein 23-faches in der Milz. Im Gegensatz dazu wurden weder in der kontralateralen noch in der fibrotischen Niere beider Behandlungen IgE⁺ CD49b⁺ Basophile Granulozyten identifiziert (Abb. 4.23, C). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass Basophile Granulozyten weder unter physiologischen noch unter pathologischen Bedingungen in der Niere vorzufinden sind.

Um jedoch eine maximale Aktivierung der Basophilen Granulozyten zu erhalten und die damit einhergehende vermehrte Sekretion von Zytokinen im peripheren Blut und Milz zu erzielen [95, 96], wurden die weiteren Analysen mit den IL-3 Immunkomplex behandelten Mäusen durchgeführt.

4.3.2.2 Einfluss von IL-3 auf die Zahl der Monozyten und andere Zellen in Blut, Milz und Niere

Wie bereits erwähnt, induziert das hämatopoetische Zytokin IL-3 nicht nur die Differenzierung Basophiler Granulozyten, sondern auch die Entstehung anderer Zellen [93]. Welchen Einfluss genau die Gabe von IL-3 auf die Zahl der Monozyten, Neutrophilen Granulozyten und B-Zellen hat, wurde nachfolgend überprüft.

Zur Identifizierung der Monozytensubpopulationen wurden die Einzelzellsuspensionen der Milz, der obstruierten Niere und das periphere Blut mit Antikörpern gegen CD11b und Gr-1 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die absolute Quantifizierung der Zellzahlen mithilfe von Counting beads zeigt, dass sowohl die Zahl der Gr-1⁺ als auch Gr-1⁻ Monozyten im Blut und in der Milz durch die IL-3 Immunkomplex-Behandlung deutlich gesteigert wurde (Abb. 4.24, A). Die Gabe von IL-3 Immunkomplex beeinflusste zudem auch die Neutrophilen Granulozyten, deren Zahl sich fast auf das 4-fache bzw. 8-fache erhöhte (Abb. 4.24, B). Die durch IL-3 erheblich veränderten Zahlen der Monozyten und Neutrophilen Granulozyten in der Peripherie scheinen jedoch keinen Einfluss auf die infiltrierenden Zellen in der Niere auszuüben. Denn wie Abb. 4.24, C veranschaulicht, bleibt die Zahl der inflammatorischen Gr-1⁺ Monozyten in der ligierten Niere zwischen der Kontroll- und IL-3 Immunkomplex behandelten Mausgruppe unverändert. Das Infiltrat der inflammatorischen Zellen nach Induktion der renalen Fibrose im Modell der UUO ist jedoch nicht nur durch Monozyten, sondern auch durch Neutrophile Granulozyten gekennzeichnet [108]. Auch diese Zellpopulation zeigt keine signifikante Veränderung in der ligierten Niere

zwischen der Kontroll- und IL-3 Immunkomplex-Gruppe (Abb. 4.24, C). Das Zytokin IL-3 steigert die Hämatopoese der myeloiden Vorläuferzellen von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten im Knochenmark [93], sodass diese vermehrt in das periphere Blut und in die Milz einwandern können. IL-3 scheint jedoch keinen Einfluss auf B-Zellen im peripheren Blut zu haben (Abb. 4.24, D).

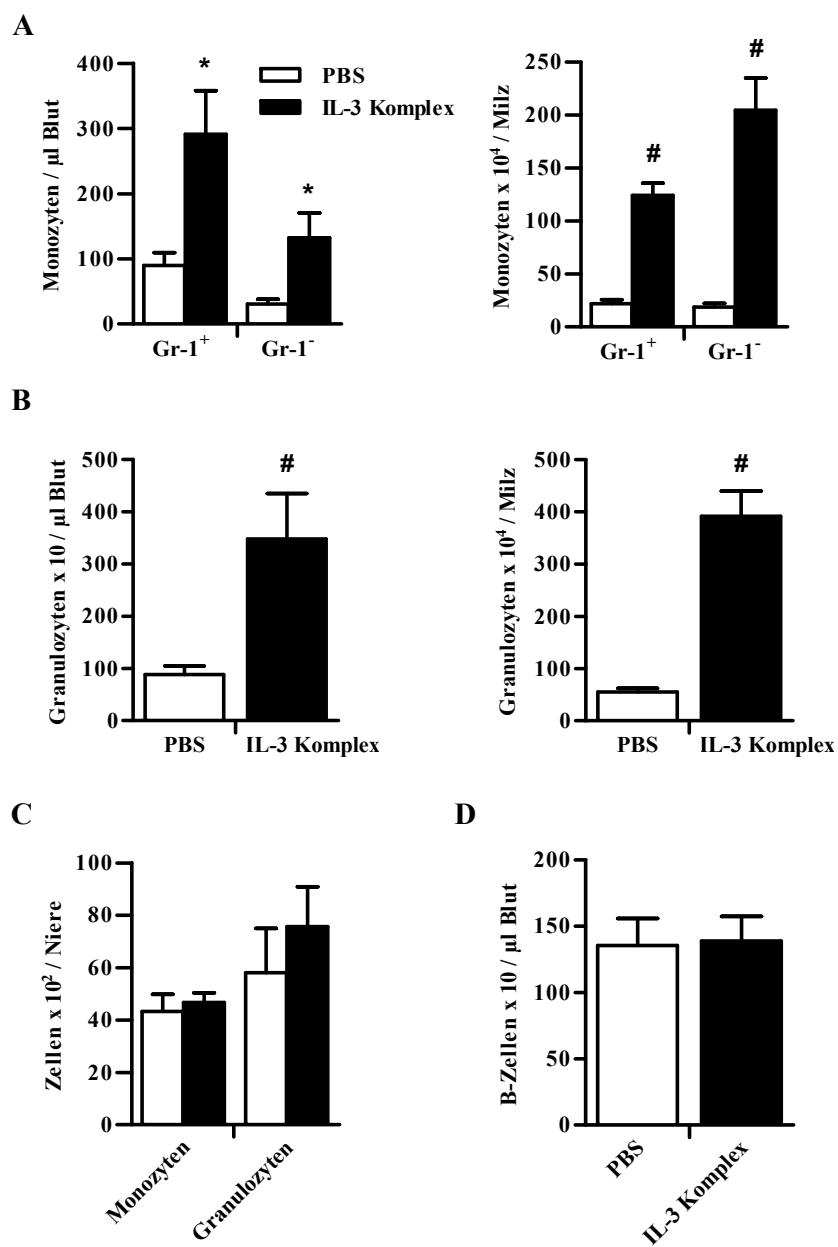


Abb. 4.24 Expansion der Monozyten und Neutrophilen Granulozyten nach Behandlung mit IL-3 Immunkomplex. C57BL/6N Mäuse wurden mit PBS (weiße Balken) oder IL-3 Immunkomplex (schwarze Balken) von Tag 0 bis Tag 6 behandelt ($n = 5$ pro Gruppe). Die Ureterligatur wurde an Tag 0 durchgeführt. Gr-1⁺, Gr-1⁻ Monozyten, Neutrophile Granulozyten und B-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie und Counting beads quantifiziert (MW \pm SEM). (A) Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten im peripheren Blut und in der Milz an Tag 7 nach der UUO. (B) Zahl Neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut und in der Milz an Tag 7 nach der UUO. (C) Zahl der inflammatorischen Gr-1⁺ Monozyten und Neutrophilen Granulozyten in der UUO-Niere an Tag 7 nach der Ureterligatur. (D) Zahl der CD19⁺ B-Zellen im peripheren Blut an Tag 7 nach der UUO. #: $p < 0,005$; *: $p < 0,05$.

4.3.2.3 Einfluss von IL-3 auf die Entwicklung der Fibrozyten und der renalen Fibrose

Um die Rolle von IL-3 und die daraus resultierte Expansion von Basophilen Granulozyten und Monozyten in der Peripherie für die Rekrutierung der Fibrozyten sowie Entstehung einer Nierenfibrose zu analysieren, wurden die UUO-Niere, kontralaterale Niere und Milz durchflusszytometrisch auf die Zahl der Fibrozyten hin untersucht. Die Behandlung mit IL-3 Immunkomplex zeigte eine massive Expansion von Basophilen Granulozyten, Monozyten und Neutrophilen Granulozyten. Hingegen wurden die $CD45^+ CD11b^+$ Kollagen I⁺ Fibrozyten sowohl in der obstruierten Niere als auch in der Milz signifikant reduziert (Abb. 4.25, A). Die Zahl der Fibrozyten in der kontralateralen Niere blieb zwischen den Gruppen unverändert.

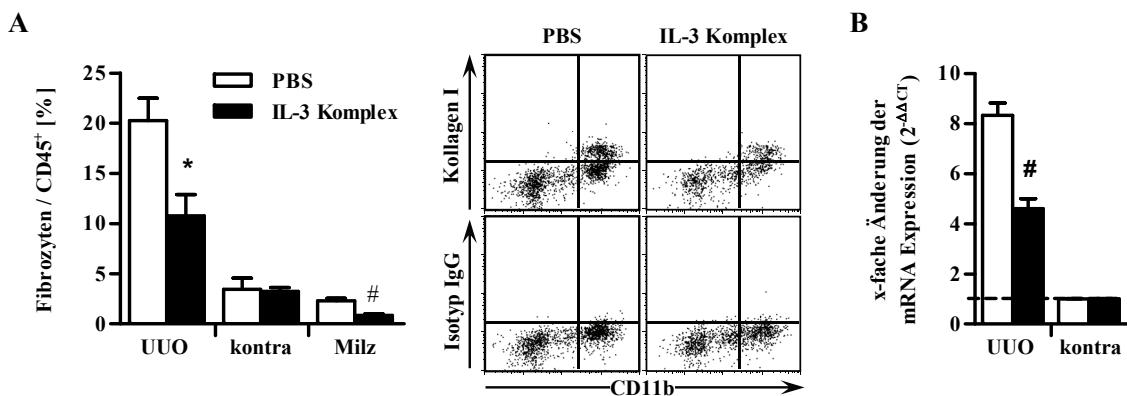


Abb. 4.25 Zahl der Fibrozyten und die mRNA Expression von Kollagen I nach Behandlung mit IL-3 Immunkomplex. C57BL/6N Mäuse wurden mit PBS (weiße Balken) oder IL-3 Immunkomplex (schwarze Balken) von Tag 0 bis Tag 6 behandelt ($n = 5$ pro Gruppe). Die Ureterligatur wurde an Tag 0 durchgeführt. (A) Zahl der $CD45^+ CD11b^+$ Kollagen I⁺ Fibrozyten in der UUO-Niere, kontralateralen Niere und Milz an Tag 7 nach der Ureterligatur. Die Quantifizierung der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie in Bezug auf Gesamt- $CD45^+$ Zellen durchgeführt (MW \pm SEM). Repräsentative DotPlots sind gezeigt. (B) Relative Änderung der mRNA Expression von Kollagen I in der UUO und kontralateraler Niere in Bezug zum Referenz-Gen beta-Aktin (MW \pm SEM). Die Expression in der kontralateralen Niere wurde als 1,0 angenommen. #: $p < 0,005$; *: $p < 0,05$.

Um den Einfluss von IL-3 auf die Progression der renalen Fibrose zu überprüfen, wurde in der UUO-Niere und kontralateralen Niere die mRNA Expression von Kollagen I bestimmt. Die relative mRNA Expression von Kollagen I nach Normalisierung mit dem Housekeeping-Gen beta-Aktin zeigte in der ligierten Niere der IL-3 Immunkomplex behandelten Mäuse eine Reduktion um 45 % im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Abb. 4.25, B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Basophile Granulozyten keine Rolle bei der Fibrozytenakkumulation in der fibrotischen Niere spielen. Dies konnte anhand der Depletion Basophiler Granulozyten aus der Peripherie als auch durch die enorme Anreicherung Basophiler Granulozyten mithilfe des Zytokins IL-3 demonstriert werden. Der Grund hierfür könnte das ortständige Fehlen der Basophilen Granulozyten in der Niere darstellen.

Höchstwahrscheinlich beeinflusst die Behandlung mit IL-3 die Ausbildung der Fibrozyten-Vorläuferzellen im Knochenmark dahingehend, dass die Hämatopoese in Richtung der Granulozyten-Makrophagen Progenitoren verstärkt und somit die Generierung der Fibrozyten vermindert wird. Des Weiteren verdeutlichen diese Resultate zusammen mit den Ergebnissen aus Abschnitt 4.1, dass Fibrozyten *in vivo* nicht lokal aus Monozyten entstehen, die nach Induktion einer Entzündung durch Ureterligatur in die Niere einwandern.

5 Diskussion

Die renale Fibrose stellt für die meisten Nierenerkrankungen ein gemeinsames Endstadium dar. Der molekulare Mechanismus der tubulointerstitiellen Fibrose und der damit einhergehende Funktionsverlust der Niere ist jedoch aufgrund der hohen Komplexität und der Beteiligung von vielen verschiedenen Zelltypen an diesem Prozess noch nicht vollständig geklärt. Die aus dem Knochenmark-stammenden Kollagen-produzierenden Zellen, auch Fibrozyten genannt, wurden bereits mit verschiedenen Fibrose- oder Autoimmunerkrankungen assoziiert. Der zelluläre Ursprung von Fibrozyten wurde dabei in zahlreichen *in vitro* Untersuchungen sowohl im humanen als auch im murinen System analysiert. Dabei wurde stets suggeriert, dass Fibrozyten aus Monozyten mit der Hilfe von akzessorischen Zellen und löslichen profibrotischen Faktoren entstehen. In einem murinen Modell der renalen Fibrose, der unilateralen Ureterobstruktion (UUO), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Fibrozyten lokal aus infiltrierenden Monozyten entstehen und wie Monozyten zu dem vorhandenen Fibrozyten-Pool in der Milz und im peripheren Blut beitragen. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von CD4⁺ T-Lymphozyten und Basophilen Granulozyten als sogenannte „Helperzellen“ sowie die Bedeutung des hämatopoietischen Wachstumsfaktors IL-3 bei der Fibrozytenakkumulation in der fibrotischen Niere untersucht.

Aufgrund bisheriger Daten bestanden zwei Möglichkeiten, wie Fibrozyten in entzündetem Gewebe akkumulieren und zur Entwicklung der Fibrose beitragen können. Erstens: eine Entzündung im Gewebe führt zur Infiltration von Leukozyten, inklusive Monozyten und T-Zellen, in Folge dessen Fibrozyten dann lokal aus infiltrierten Monozyten mithilfe von akzessorischen Zellen oder löslichen Faktoren differenzieren. Reduzierte oder erhöhte Migration von Monozyten und Faktoren, die die Differenzierung von Monozyten zu Fibrozyten regulieren, würden die Zahl der Fibrozyten im Gewebe bestimmen. Verminderte Zahlen der Fibrozyten im Gewebe wurden bereits in verschiedenen transgenen Mäusen defizient für Chemokinrezeptoren wie CCR1, CCR2, CCR5 und CCR7 [46-53] detektiert. Da die meisten dieser Chemokinrezeptoren auch auf Monozyten exprimiert werden, könnte die Abwesenheit dieser Rezeptoren die Migration der Monozyten und die damit verbundene Entwicklung zu Fibrozyten stören. Die zweite Hypothese für die Akkumulation von Fibrozyten am Entzündungsort könnte die Migration von vor-differenzierten Fibrozyten, die bereits Kollagen I exprimieren, sein. In der Milz und im peripheren Blut von naiven Mäusen

wurde im Rahmen dieser Arbeit eine erhebliche Zahl an Kollagen I-exprimierender CD11b⁺ CD45⁺ Fibrozyten nachgewiesen. Im murinen Modell der UUO (7 Tage) wurde daraufhin die Bedeutung der Fibrozyten in der renalen Fibrose untersucht. Das Modell der einseitigen Harnleiterligatur bietet mehrere Vorteile [103, 104]. Zum einen entwickelt sich die Progression der renalen Schädigung über einen kurzen Zeitraum und kann über die Dauer der Obstruktion kontrolliert werden. Zum anderen weist das Modell der Ureterobstruktion alle wichtigen Merkmale eines Fibrosierungsprozesses auf. Eines der Merkmale ist der Influx von inflammatorischen Zellen, wie Monozyten, aktivierte T-Zellen und vermutlich auch Fibrozyten. Im Modell der obstruktiven Nephropathie bildet sich nach 5 bis 7 Tagen eine interstitielle Fibrose aus, die unter anderem aufgrund erhöhter Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine (EZM) feststellbar ist [58, 59]. Nach der Okklusion des Ureters stieg die Zahl der rekrutierten Fibrozyten in der ligierten Niere bereits an Tag 3 rapide an und zeigte sowohl in der Milz als auch im peripheren Blut einen hohen Anstieg. Bis Tag 7 konnte in der obstruierten Niere ein 12-facher Anstieg der Fibrozyten verzeichnet werden. Die Fibrozyten in der Niere exprimieren dieselben Oberflächenmarker wie in der Milz (CD45⁺, CD11b⁺, CCR2^{int}, Gr-1⁺, Ly-6G^{high}, Ly-6C^{int}, CD115⁻). Die Abwesenheit des klassischen Monozyten-Markers CD115, die hohe Expression von Ly-6G und die intermediäre Expression von CCR2 unterscheidet Fibrozyten eindeutig von den zwei bekannten CD115⁺ Monozyten-subpopulationen in der Maus. Während die inflammatorischen Monozyten stark positiv für CCR2, Gr-1 und Ly-6C sind, weisen die sogennanten residenten Monozyten eine schwache Expression der Oberflächenmarker CCR2 und Gr-1 auf und sind negativ für Ly-6C. Dabei stellen die CCR2⁺ Monozyten das Äquivalent zu den CD14⁺ humanen Monozyten dar und die CCR2⁻ Monozytenpopulation entspricht dem CD16⁺ humanen Monozyten-Subtyp.

Die Resultate der phänotypischen Charakterisierung der Fibrozyten im Modell der renalen Fibrose lassen vermuten, dass Fibrozyten entweder ihr Repertoire an Oberflächenmolekülen nach der Entstehung aus Monozyten geändert haben, oder dass sie eine unabhängige Zellpopulation darstellen. Die in der Literatur beschriebene *in vitro* Differenzierung der Monozyten zu Fibrozyten ist ebenfalls mit einem Verlust von CD115 assoziiert [58]. Während jedoch die Differenzierung in Kultur ungefähr 10 Tage dauert, erscheinen CD115⁻ Fibrozyten in der ligierten Niere bereits an Tag 3. Dieser Zeitraum ist wahrscheinlich zu kurz, damit Fibrozyten lokal aus infiltrierten Monozyten differenzieren. In einer Studie von Kisseeleva *et al.* konnten in der Milz ebenfalls CD45⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten nachgewiesen werden. Nach Induktion einer hepatischen Entzündung expandierten Kollagen I⁺ Fibrozyten im Knochenmark und wurden rapide in die Milz rekrutiert. Die Zahl der Fibrozyten in der

Milz wurde dabei auf das 4-fache erhöht. Des Weiteren untersuchten die Autoren den Phänotyp der Fibrozyten und stellten ebenfalls fest, dass Fibrozyten in der Milz einen myeloiden Charakter durch die Expression der Oberflächenmarker CD11b, Gr-1, Ly-6G und Ly-6C aufweisen. Das ebengenannte Expressionsmuster entsprach auch den Kollagen I⁺ Fibrozyten im Knochenmark [66].

Monozyten bzw. Makrophagen werden neben T-Zellen für die wichtigsten Effektorzellen in der renalen Fibrose gehalten. Zirkulierende kurzlebige Monozyten werden zum Entzündungsort rekrutiert und differenzieren dort zu zwei phänotypisch unterschiedlichen Subpopulationen [14]. Eine Blockierung von CCR2⁺ Monozyten mithilfe von verschiedenen Antagonisten gegen den Chemokinrezeptor CCR2 führte in einer Studie von Kitagawa *et al.* zur verminderten Progression der Nierenfibrose im Modell der UUO [77]. In der vorliegenden Dissertation konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Abwesenheit der CCR2⁺ Monozyten und renaler Fibrose gefunden werden. Die inflammatorischen CCR2⁺ Monozyten wurden hierbei mit dem monoklonalen Antikörper anti-CCR2 (MC-21) depletiert. Die Depletion der Monozyten wurde allerdings nur für wenige Tage gewährleistet, denn nach kürzester Zeit entwickelte die Maus eine humorale Immunantwort gegen den verabreichten MC-21 Antikörper [116]. Aus diesem Grund konnte die Depletion der CCR2⁺ Monozyten nicht für die ganze Dauer der Ureterokklusion von 7 Tagen aufrechterhalten werden. Die Monozyten wurden jedoch durch eine Kurzzeit-Behandlung im späteren Verlauf der UUO im peripheren Blut, in der Milz sowie in den Nieren fast komplett eliminiert. Allerdings wurde weder die Zahl der Fibrozyten in der Milz oder der fibrotischen Niere noch die Ausprägung der renalen Fibrose reduziert. Beide Ergebnisse suggerieren stark, dass die in der ligierten Niere vorhandenen Fibrozyten nicht aus infiltrierten Monozyten entstehen, sondern als bereits vor-differenzierte Kollagen-produzierende Zellen in die Niere rekrutiert werden. Es ist auch unwahrscheinlich, dass sich Fibrozyten aus Monozyten in der Milz entwickeln, da die Depletion der zirkulierenden Monozyten mit MC-21 und auch die geringe Zahl der zirkulierenden Monozyten in CCR2^{-/-} Mäusen nicht in einer verringerten Zahl der Milz-Fibrozyten resultierten. Es ist eher anzunehmen, dass Fibrozyten als weitgehend ausdifferenzierte Zellen im Knochenmark generiert werden und höchstwahrscheinlich von den myeloiden Vorläuferzellen abstammen. Das Ansteigen der Fibrozytenzahl in der Milz nach unilateraler Ureterobstruktion lässt vermuten, dass die operative Intervention und / oder die renale Entzündung die Generierung der Fibrozyten reguliert, um die Wundheilung und Geweberegeneration anzutreiben. Die Regulation der Fibrozytenentstehung findet vermutlich

im Knochenmark statt. Die klare Unterscheidung zwischen den zwei Zellpopulationen, Monozyten und Fibrozyten, in der Milz und in den Nieren spricht auch gegen die Hypothese, dass Fibrozyten lediglich Monozyten repräsentieren könnten, die Kollagen I aufgenommen haben. Denn weder in der Milz noch in der fibrotischen Niere konnten klassische Kollagen I⁺ Monozyten nachgewiesen werden.

Um die Rolle von CCR2 für die Migration der Fibrozyten zu untersuchen wurden CCR2^{-/-} Mäuse analysiert. Wie bereits bekannt, benötigen Monozyten den Chemokinrezeptor CCR2, um aus dem Knochenmark in die Peripherie zu migrieren [71]. Aus diesem Grund weisen CCR2^{-/-} Mäuse eine deutlich reduzierte Zahl der Gr-1⁺ und Gr-1⁻ Monozyten im peripheren Blut und den lymphatischen Organen auf, besitzen aber eine erhöhte Anzahl der Monozyten im Knochenmark [72]. Hingegen blieb die Zahl der Fibrozyten in der Milz und auch im peripheren Blut zwischen den CCR2^{-/-} und Wildtyp-Mäusen unverändert. Dies deutet darauf hin, dass Fibrozyten kein CCR2 benötigen, um das Knochenmark zu verlassen. Trotz der identischen Zahl zirkulierender Fibrozyten, zeigten CCR2^{-/-} Mäuse jedoch eine deutlich reduzierte Anzahl der Fibrozyten in der ligierten Niere sowie eine signifikante Reduktion der renalen Fibrose. Dies deutet darauf hin, dass die Migration der Fibrozyten in die Niere von dem Chemokinrezeptor CCR2 abhängt. Dieses Ergebnis stimmt mit vorherigen Arbeiten im Modell der Lungen-, Leber- und Herzfibrose überein [46-48]. Die Migration der Fibrozyten in die Niere der CCR2^{-/-} Mäuse ist jedoch nicht komplett aufgehoben. Dieses weist darauf hin, dass noch andere Chemokinrezeptoren oder chemotaktische Faktoren, wie CXCL16 [54], zur Migration der Fibrozyten beitragen. Eine reduzierte Fibrose in CCR2^{-/-} Mäusen wurde in einer früheren Arbeit auf die geringere Infiltration von Makrophagen zurückgeführt [77]. Allerdings scheinen Monozyten nicht direkt an der Entwicklung der Fibrose involviert zu sein, da die Depletion der renalen Monozyten mit dem anti-CCR2 Antikörper MC-21 die renale Fibrose nicht reduzierte. Sehr wahrscheinlich ist dies auf die nicht veränderte Fibrozytenzahl nach der MC-21 Behandlung zurückzuführen. Selbst die enorme Expansion der zirkulierenden Monozyten in Blut und Milz nach der Verabreichung vom hämatopoetischen Wachstumsfaktor IL-3 steigerte die Zahl der inflammatorischen Gr-1⁺ Monozyten in der UUO-Niere nicht. Hingegen konnte durch die IL-3 Behandlung ein Rückgang der CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten um fast 50 % verzeichnet werden. Die Progression der renalen Fibrose, die anhand der mRNA Expression von Kollagen I beurteilt wurde, war nach der Verabreichung von IL-3 signifikant niedriger als in Kontroll-behandelten Mäusen. Die bisherige Ansicht einer profibrotischen Rolle infiltrierender Monozyten in der

tubulointerstitiellen Nephritis, wird mit diesen Resultaten in Frage gestellt. Das geringere Fortschreiten der renalen Fibrose in der IL-3 behandelten Gruppe ist vermutlich auf die Abwesenheit der aus dem Knochenmark-stammenden Fibrozyten zurückzuführen. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für die zweite Hypothese, die beinhaltet, dass Fibrozyten nicht aus Monozyten differenzieren, sondern vielmehr eine gemeinsame Vorläuferzelle teilen und als bereits differenzierte Kollagen I⁺ Zellen nach einem Schädigungsreiz aus dem Knochenmark rekrutiert werden. Dafür würde auch sprechen, dass *in vitro* durch Zugabe des Zytokins IL-3 kein Einfluss auf die Fibrozytendifferenzierung erzielt wurde [60]. Weiterhin zeigten Ohmori *et al.* mit der Injektion von IL-3 in Mäusen, dass insbesondere die gemeinsame Vorläuferzelle der Monozyten und Granulozyten, GMP, gesteigert wird. Hingegen konnte die Hämatopoese der Vorläuferzelle der GMP, CMP, mit IL-3 nicht induziert werden [92]. Der Grund hierfür liegt vermutlich an der fehlenden Expression des IL-3 Rezeptors auf CMP, der jedoch auf GMP und auf den daraus stammenden Zellen exprimiert wird. Nach IL-3 Behandlung wurde der IL-3 Rezeptor auf GMP sogar hochreguliert, zeigte jedoch auf CMP keinerlei Effekt. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die Fibrozytenvorläufer und GMP aus der Vorläuferzelle CMP im Knochenmark hervorgehen und die Gabe von IL-3 einerseits die Hämatopoese in Richtung GMP verschiebt, andererseits die Bildung der Fibrozytenprogenitoren unterdrückt.

Da die direkte Depletion der Fibrozyten mit dem anti-CCR2 Antikörper MC-21 aufgrund der geringen Expression von CCR2 auf Fibrozyten nicht möglich war, wurden CD11b-DTR Knochenmark-chimäre Mäuse generiert. Das Charakteristikum dieser transgenen Mäuse ist die Expression des simianen DT Rezeptors unter der Kontrolle des CD11b Promoters, sodass eine Depletion von CD11b⁺ Zellen durch Applikation von Diphtherie Toxin ermöglicht wird. Die Herstellung der Knochenmark-chimären Mäuse erfolgte durch Transfer von Knochenmark aus transgenen CD11b-DTR Mäusen in lethal bestrahlte Wildtyp-Mäuse. Mit dem Einsatz der Knochenmark-chimären Mäuse wurden zum einen unspezifische toxische Effekte nach längerfristiger Gabe des DT vermieden und zum anderen sichergestellt, dass nur hämatopoetische Zellen im Verlauf der UUO depletiert werden. Durch Behandlung der Mäuse mit Diphtherie Toxin konnten die CD11b⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten sehr effizient in der Milz sowie fibrotischen Niere depletiert werden. Die Zahl der Fibrozyten wurde dabei auf das Niveau der kontralateralen Niere gesenkt. Neben dem Oberflächenantigen CD11b zeigte die phänotypische Charakterisierung der Fibrozyten *in vivo* auch eine hohe Expression des Oberflächenmarkers Gr-1 auf. Aus diesem Grund konnten Fibrozyten ebenfalls mit dem

gegen Gr-1 gerichteten Antikörper in der UUO-Niere und Milz fast komplett eliminiert werden. Zusätzlich resultierte die Depletion der Fibrozyten sowohl mit DT als auch mit anti-Gr-1 Antikörper in einer beträchtlichen und statistisch signifikanten Reduktion der renalen Fibrose, die anhand der mRNA Expression und immunfluoreszenztechnischem Anfärben von Kollagen I bestimmt wurde. Der Einsatz von Knochenmark-chimären Mäusen demonstriert, dass Fibrozyten aus dem Knochenmark stammen und schließt die Depletion von CD11b⁺ nicht-hämatopoetischen Zellen sowie deren Beteiligung an der Reduktion der Fibrose aus. Die Verringerung der renalen Fibrose in CD11b-DTR Mäusen wurde zusätzlich in der Arbeit von Machida *et al.* im Modell der UUO demonstriert [84]. Dabei wurde auch die maßgebliche Bedeutung der CD11b⁺ Zellen in der Progression der renalen Fibrose klar herausgestellt. Diese Interventionen mit DT und anti-Gr-1 Antikörper zeigen allerdings ebenfalls eine Reduktion der Monozyten bzw. Makrophagen-Zahl und wahrscheinlich auch anderen CD11b⁺ oder Gr-1⁺ Zellen, die einen indirekten Einfluss auf das Fortschreiten der renalen Fibrose haben könnten. Fibrozyten könnten ebenso einen indirekten Einfluss auf die Fibrose ausüben, indem sie Faktoren exprimieren, die zur Aktivierung der ortsständigen Fibroblasten und darauf folgende exzessive Ablagerung von EZM beitragen. In weiterführenden Experimenten ist es wichtig den relativen Beitrag von Fibroblasten, Fibrozyten und Epithelzellen zur Produktion von Kollagenen und anderen extrazellulären Matrixproteinen zu ermitteln. Obwohl renale Fibrozyten nach DT- und anti-Gr-1-Behandlung fast komplett eliminiert wurden, konnte dennoch eine Deposition von Kollagen I in der ligierten Niere detektiert werden. Diese Resultate deuten darauf hin, dass auch andere Mechanismen, wie Aktivierung von Fibroblasten und Perizyten sowie EMT oder EndoMT zum Fortschreiten der renalen Fibrose beitragen.

Bei der *in vitro* Fibrozytendifferenzierung konnten CD4⁺ T-Lymphozyten in mehreren unabhängigen Studien als sogennante „Helperzellen“ identifiziert werden. In murinen Splenozyten verhinderte die Depletion von CD4⁺ T-Zellen fast komplett das Auswachsen der Fibrozyten. Hingegen steigerte die Kokultur von aufgereinigten Monozyten und nicht aktivierten CD4⁺ T-Zellen maßgeblich die Entwicklung der Fibrozyten [58]. Übereinstimmend dazu wurde in Zellkulturansätzen mit humanen PBMC und bei gleichzeitiger Anwesenheit von CD4⁺ T-Lymphozyten eine signifikant höhere Zahl an spindelförmigen Fibrozyten detektiert [34]. In Anknüpfung an diese *in vitro* Daten wurde im Modell der UUO in T- und B-Zell defizienten SCID Mäusen demonstriert, dass die Anwesenheit von Lymphozyten für die Entwicklung der Fibrozyten sowie der renalen Fibrose

von großer Bedeutung ist [58]. In der vorliegenden Dissertation wurden CD4⁺ T-Zellen mithilfe des monoklonalen Antikörpers anti-CD4 (GK1.5) im murinen Modell der renalen Fibrose depletiert. Anschließend wurde die Zahl der Fibrozyten sowie die Ausbildung der renalen Fibrose untersucht. Dabei wurden die Ergebnisse der vorhergehenden Studien dahingehend untermauert, dass CD4⁺ T-Zellen auch *in vivo* in Zusammenhang mit der Fibrozytenentwicklung und renaler Fibrose assoziiert sind. Diese Ergebnisse sind konform mit den Veröffentlichungen von Tapmeier *et al.* und Liu *et al.* [89, 121]. Tapmeier *et al.* konnten zeigen, dass RAG1^{-/-} Mäuse, denen wie SCID Mäusen reife T- und B-Zellen fehlen, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine geringere Kollagen-Ablagerung nach UUO aufweisen [89]. Nach der Rekonstitution der RAG1^{-/-} Mäuse mit CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen, konnten nur CD4⁺ T-Lymphozyten die renale Fibrose auf das Niveau der Wildtyp-Mäuse wiederherstellen. Die Autoren konnten zudem demonstrieren, dass die Abwesenheit von T-Zellen keinen Einfluss auf die Infiltration von Makrophagen hat. In der vorliegenden Dissertation wurde jedoch durch die Depletion von CD4⁺ T-Lymphozyten eine geringere Fibrozytenzahl in der ligierten Niere festgestellt. Diese Ergebnisse sprechen wiederum für die Hypothese, dass Fibrozyten und Monozyten zwei unabhängige Zellpopulationen darstellen, und dass deren Rolle in der Nierenfibrose differenziell ausfällt. Die Studie von Liu *et al.* demonstrierte ebenfalls mithilfe eines depletierenden Antikörpers die wichtige Rolle von CD4⁺ T-Zellen in der tubulointerstitiellen Fibrose [121]. Zudem konnten sie anhand von Rekonstitutionsversuchen in T-Zell defizienten Mäusen (Balb/c Nu/Nu) T_H2 polarisierte Zellen als dominierende Zellpopulation im Modell der renalen Fibrose identifizieren. Weitere Arbeiten legten dar, dass das Zytokinmilieu für die Fibrozytendifferenzierung von entscheidender Bedeutung ist. Dabei wurden T_H2-Zytokine als unterstützende und T_H1-Zytokine als inhibierende Faktoren beschrieben [58, 60].

Basophile Granulozyten können durch Sekretion von bestimmten Zytokinen, z.B. IL-4 oder IL-6, die T-Zelldifferenzierung zu einer T_H2 vermittelten Entzündungsreaktion unterstützen [94, 95]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle Basophiler Granulozyten als weitere „Helperzellen“ in der Pathogenese der tubulointerstitiellen Nierenfibrose sowie in der Fibrozytenentstehung analysiert. Hierbei wurden Basophile Granulozyten mit dem monoklonalen Antikörper anti-FcεRIα (MAR1) bis Tag 7 nach Ureterligatur depletiert. Zwischen den Gruppen wurde jedoch kein Unterschied in der Zahl der Fibrozyten oder in der Akkumulation von Kollagen I als Marker der renalen Fibrose festgestellt. Der Grund dafür könnte in der Abwesenheit der Basophilen Granulozyten am

Entzündungsort liegen. Durchflusszytometrisch wurden keine IgE⁺ Dx5⁺ Zellen in der UUO-Niere oder in der gesunden kontralateralen Niere detektiert. Die Bedeutung von Basophilen Granulozyten in Nierenerkrankungen ist bisher nur ansatzweise untersucht. Charles *et al.* konnten jedoch kürzlich im tierexperimentellen SLE-Modell Basophile Granulozyten mit der Pathogenese des Lupusnephritis assoziieren [97]. Dabei können Basophile Granulozyten die Produktion der Autoantikörper, insbesondere die Zirkulation der autoreaktiven IgE und somit auch die Progression der Nephritis beeinflussen. Allerdings scheinen Basophile Granulozyten bei der Fibrozytenakkumulation in der fibrotischen Niere keine entscheidende Rolle zu spielen, denn auch nach Aktivierung und starker Expansion der Basophilen Granulozyten mit dem Zytokin IL-3 wurde die Zahl der Fibrozyten in der UUO-Niere nicht gesteigert, sondern im Gegenteil signifikant reduziert. Der starke Rückgang der Fibrozyten ist höchstwahrscheinlich auf den direkten Einfluss von IL-3 auf die Vorläuferzellen im Knochenmark zurückzuführen. IL-3 stimuliert die Differenzierung von Basophilen Granulozyten, Neutrophilen Granulozyten und Monozyten, jedoch nicht die damit vermutlich in Konkurrenz stehende Differenzierung von Fibrozyten.

6 Zusammenfassung

Die renale Fibrose, die das Endstadium der meisten Nierenerkrankungen darstellt, ist durch eine exzessive Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen, z.B. Kollagen I, gekennzeichnet. Dieser Prozess kann zur irreversiblen Narbenbildung und Organversagen führen. Nierenersatztherapien stehen zwar zur Verfügung, verursachen jedoch enorme Kosten und führen zum Verlust von Lebensqualität bei den betroffenen Patienten. Die Aufklärung der für die Nierenfibrose und den Funktionsverlust verantwortlichen molekularen und zellulären Mechanismen ist für die Entwicklung neuer Therapieansätze von großer Bedeutung, stellt jedoch gleichzeitig eine große Herausforderung dar, da unterschiedlichste Zellpopulationen am Prozess der tubulointerstitiellen Fibrose beteiligt sind und möglicherweise miteinander interagieren. Kollagen-produzierende und aus dem Knochenmark-stammende Zellen, sogenannte Fibrozyten, wurden nicht nur mit renaler Fibrose, sondern mit vielen anderen Erkrankungen assoziiert. Zahlreiche *in vitro* Studien suggerierten stets Monozyten als zellulären Ursprung der Fibrozyten.

In dieser Dissertation wurde im Fibrose Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) erstmals gezeigt, dass Fibrozyten *in vivo* nicht aus den klassischen Monozyten entstehen, sondern als CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen I⁺ Zellpopulation bereits in der Milz und im peripheren Blut von naiven Mäusen vorzufinden sind. Nach Induktion der renalen Fibrose durch einseitige Ureterligatur waren Kollagen I⁺ Fibrozyten bereits an Tag 3 mit einem 10-fachen Anstieg in der ligierten Niere vertreten und zeigten auch in der Milz und im peripheren Blut einen erheblichen Anstieg. Die nähere phänotypische Charakterisierung ergab, dass sich Fibrozyten in der Niere und der Milz stark ähneln und sich deutlich von Monozyten und Granulozyten unterscheiden.

Die Zahl zirkulierender Fibrozyten im peripheren Blut und in der Milz war weder nach Depletion von Monozyten mit dem monoklonalen Antikörper MC-21 noch in CCR2^{-/-} Mäusen, die kaum Monozyten in der Peripherie aufweisen, reduziert. Im Gegensatz zu Monozyten emigrierten Fibrozyten CCR2-unabhängig aus dem Knochenmark in die Peripherie. Die Migration der Kollagen I⁺ Fibrozyten in die entzündete Niere war hingegen von dem Chemokinrezeptor CCR2 abhängig und mit einer signifikant niedrigeren Ausprägung der renalen Fibrose assoziiert. Zudem ermöglichte die Applikation von Diphtherie Toxin in Knochenmark-chimären CD11b-DTR Mäuse oder der Einsatz des

monoklonalen Antikörpers anti-Gr-1 eine sehr effiziente Depletion der Kollagen I⁺ Fibrozyten aus der fibrotischen Niere. Die Abwesenheit der Fibrozyten in der ligierten Niere resultierte dabei stets in einer geringeren Akkumulation von Kollagen I und damit reduzierten Progression der renalen Fibrose.

T-Zellen spielen für die Entstehung einer Nierenfibrose eine wichtige Rolle. Basophile Granulozyten verschieben die T-Zelldifferenzierung zu einer T_H2 vermittelten Entzündungsreaktion und könnten auch in renalen tubulointerstitiellen Erkrankungen eine wichtige Rolle einnehmen. Die Untersuchung von CD4⁺ T-Zellen und Basophilen Granulozyten für die Fibrozytenakkumulation in der ligierten Niere erfolgte durch Depletion dieser sogennanter „Helferzellen“ mithilfe monoklonaler Antikörper. Dabei wurde die wichtige Rolle CD4⁺ T-Lymphozyten nicht jedoch von Basophilen Granulozyten in der Fibrozytenrekrutierung sowie renaler Fibrose gezeigt. Darüber hinaus stellte sich das Zytokin IL-3 als wichtiger Regulator in der Fibrozytenentstehung heraus. IL-3 steigert die Hämatopoese von Granulozyten-Makrophagen Progenitoren (GMP). Hingegen verminderten sich durch die Injektion von IL-3 maßgeblich die Zahl der Kollagen I⁺ Fibrozyten und der damit einhergehende Grad der renalen Fibrose. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass Fibrozyten und GMP aus einer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle hervorgehen. Die Generierung der Fibrozyten wird dabei vermutlich durch Induktion der renalen Entzündung im Knochenmark reguliert, um die Wundheilung und Geweberegeneration zu fördern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Fibrozyten nicht aus infiltrierenden Monozyten entstehen, sondern dass beide Zellpopulationen vermutlich aus einer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle im Knochenmark hervorgehen und das Zytokin IL-3 dabei als wichtiger regulatorischer Faktor fungiert. Weiterhin ist es im Rahmen dieser Arbeit erstmals gelungen Fibrozyten nur mithilfe von extrazellulären Oberflächenantigenen zu charakterisieren und zu depletieren. Zudem konnte demonstriert werden, dass Fibrozyten einen signifikanten Beitrag zur Entstehung der renalen Fibrose leisten. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für weiterführende Studien und sind gleichzeitig die Grundlage für die Entwicklung neuer antifibrotischer Therapien.

7 Literaturverzeichnis

1. Ulfig, N, *Kurzlehrbuch Histologie*. Vol. (3. Auflage). 2011, Stuttgart; New York: Thieme. 243.
2. Silbernagl, S and A Despopoulos, *Taschenatlas Physiologie*. 8., überarb. und erw. Aufl. ed. 2012, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XII, 455 S.
3. Wynn, TA and TR Ramalingam, *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease*. Nat Med, 2012. **18**(7): p. 1028-40.
4. Hallan, SI, K Matsushita, Y Sang, BK Mahmoodi, et al., *Age and association of kidney measures with mortality and end-stage renal disease*. JAMA, 2012. **308**(22): p. 2349-60.
5. El Nahas, MA and AK Bello, *Chronic kidney disease: the global challenge*. Lancet, 2005. **365**(9456): p. 331-40.
6. Frei, U and H-J Schober-Halstenberg, *Nierenersatztherapie in Deutschland*. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. 2008, Berlin.
7. Boor, P and J Floege, *The renal (myo-)fibroblast: a heterogeneous group of cells*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(8): p. 3027-36.
8. Schieppati, A and G Remuzzi, *Proteinuria and its consequences in renal disease*. Acta Paediatr Suppl, 2003. **92**(443): p. 9-13; discussion 5.
9. Arnold, F and DC West, *Angiogenesis in wound healing*. Pharmacol Ther, 1991. **52**(3): p. 407-22.
10. Singer, AJ and RA Clark, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 738-46.
11. Schreml, S, RM Szeimies, L Prantl, S Karrer, et al., *Oxygen in acute and chronic wound healing*. Br J Dermatol, 2010. **163**(2): p. 257-68.
12. Eddy, AA, *Proteinuria and interstitial injury*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2004. **19**(2): p. 277-281.
13. Remuzzi, G and T Bertani, *Pathophysiology of progressive nephropathies*. N Engl J Med, 1998. **339**(20): p. 1448-56.
14. Liu, Y, *Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2011. **7**(12): p. 684-96.
15. Wynn, TA, *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 199-210.

16. Meran, S and R Steadman, *Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis*. Int J Exp Pathol, 2011. **92**(3): p. 158-67.
17. Kaissling, B and M Le Hir, *The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(2): p. 247-62.
18. Strutz, F and M Zeisberg, *Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(11): p. 2992-8.
19. Lin, SL, T Kisseleva, DA Brenner, and JS Duffield, *Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney*. Am J Pathol, 2008. **173**(6): p. 1617-27.
20. Strutz, F, H Okada, CW Lo, T Danoff, et al., *Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1*. J Cell Biol, 1995. **130**(2): p. 393-405.
21. Chang, HY, JT Chi, S Dudoit, C Bondre, et al., *Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12877-82.
22. Maxwell, PH, MK Osmond, CW Pugh, A Heryet, et al., *Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice*. Kidney Int, 1993. **44**(5): p. 1149-62.
23. Ng, YY, TP Huang, WC Yang, ZP Chen, et al., *Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats*. Kidney Int, 1998. **54**(3): p. 864-76.
24. Iwano, M, D Plieth, TM Danoff, C Xue, et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 341-50.
25. Yang, J and Y Liu, *Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis*. Am J Pathol, 2001. **159**(4): p. 1465-75.
26. Humphreys, BD, SL Lin, A Kobayashi, TE Hudson, et al., *Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis*. Am J Pathol, 2010. **176**(1): p. 85-97.
27. Zeisberg, EM, O Tarnavski, M Zeisberg, AL Dorfman, et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis*. Nat Med, 2007. **13**(8): p. 952-61.
28. Li, J, X Qu, and JF Bertram, *Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice*. Am J Pathol, 2009. **175**(4): p. 1380-8.
29. Zeisberg, EM, SE Potenta, H Sugimoto, M Zeisberg, et al., *Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(12): p. 2282-7.

30. Hong, KM, JA Belperio, MP Keane, MD Burdick, et al., *Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22910-20.
31. Bucala, R, LA Spiegel, J Chesney, M Hogan, et al., *Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair*. Mol Med, 1994. **1**(1): p. 71-81.
32. Chesney, J, C Metz, AB Stavitsky, M Bacher, et al., *Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 419-25.
33. Pilling, D, T Fan, D Huang, B Kaul, et al., *Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7475.
34. Abe, R, SC Donnelly, T Peng, R Bucala, et al., *Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7556-62.
35. Phillips, RJ, MD Burdick, K Hong, MA Lutz, et al., *Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis*. Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**(3): p. 438-446.
36. Herzog, EL and R Bucala, *Fibrocytes in health and disease*. Exp Hematol, 2010. **38**(7): p. 548-56.
37. Hartlapp, I, R Abe, RW Saeed, T Peng, et al., *Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo*. FASEB J, 2001. **15**(12): p. 2215-24.
38. Chesney, J, M Bacher, A Bender, and R Bucala, *The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6307-12.
39. Peng, H and EL Herzog, *Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation*. Curr Opin Pharmacol, 2012. **12**(4): p. 491-6.
40. Galligan, CL and EN Fish, *The role of circulating fibrocytes in inflammation and autoimmunity*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(1): p. 45-50.
41. Broekema, M, MC Harmsen, MJ van Luyn, JA Koerts, et al., *Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the renal interstitial myofibroblast population and produce procollagen I after ischemia/reperfusion in rats*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(1): p. 165-75.
42. Hashimoto, N, H Jin, T Liu, SW Chensue, et al., *Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis*. Journal of Clinical Investigation, 2004. **113**(2): p. 243-252.

43. Galligan, CL and EN Fish, *Circulating fibrocytes contribute to the pathogenesis of collagen antibody-induced arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(11): p. 3583-93.
44. Schmidt, M, G Sun, MA Stacey, L Mori, et al., *Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma*. *J Immunol*, 2003. **171**(1): p. 380-9.
45. Chu, PY, J Mariani, S Finch, JR McMullen, et al., *Bone marrow-derived cells contribute to fibrosis in the chronically failing heart*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(4): p. 1735-42.
46. Scholten, D, D Reichart, YH Paik, J Lindert, et al., *Migration of fibrocytes in fibrogenic liver injury*. *Am J Pathol*, 2011. **179**(1): p. 189-98.
47. Moore, BB, JE Kolodick, VJ Thannickal, K Cooke, et al., *CCR2-Mediated Recruitment of Fibrocytes to the Alveolar Space after Fibrotic Injury*. *The American Journal of Pathology*, 2005. **166**(3): p. 675-684.
48. Xu, J, SC Lin, J Chen, Y Miao, et al., *CCR2 mediates the uptake of bone marrow-derived fibroblast precursors in angiotensin II-induced cardiac fibrosis*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(2): p. H538-47.
49. Sun, L, MC Louie, KM Vannella, CA Wilke, et al., *New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011. **300**(3): p. L341-53.
50. Ishida, Y, A Kimura, T Kondo, T Hayashi, et al., *Essential roles of the CC chemokine ligand 3-CC chemokine receptor 5 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte infiltration*. *Am J Pathol*, 2007. **170**(3): p. 843-54.
51. van Deventer, HW, QP Wu, DT Bergstrahl, BK Davis, et al., *C-C chemokine receptor 5 on pulmonary fibrocytes facilitates migration and promotes metastasis via matrix metalloproteinase 9*. *Am J Pathol*, 2008. **173**(1): p. 253-64.
52. Sakai, N, T Wada, H Yokoyama, M Lipp, et al., *Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(38): p. 14098-103.
53. Moore, BB, L Murray, A Das, CA Wilke, et al., *The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006. **35**(2): p. 175-81.
54. Chen, G, SC Lin, J Chen, L He, et al., *CXCL16 recruits bone marrow-derived fibroblast precursors in renal fibrosis*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(10): p. 1876-86.
55. Okon, K, A Szumera, and M Kuzniewski, *Are CD34+ cells found in renal interstitial fibrosis?* *Am J Nephrol*, 2003. **23**(6): p. 409-14.
56. Galligan, CL, KA Siminovitch, EC Keystone, V Bykerk, et al., *Fibrocyte activation in rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2010. **49**(4): p. 640-51.

57. Curnow, SJ, M Fairclough, C Schmutz, S Kissane, et al., *Distinct types of fibrocyte can differentiate from mononuclear cells in the presence and absence of serum*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9730.
58. Niedermeier, M, B Reich, M Rodriguez Gomez, A Denzel, et al., *CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17892-7.
59. Sakai, N, T Wada, K Matsushima, R Bucala, et al., *The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes*. J Hypertens, 2008. **26**(4): p. 780-90.
60. Shao, DD, R Suresh, V Vakil, RH Gomer, et al., *Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(6): p. 1323-33.
61. Gan, Y, R Reilkoff, X Peng, T Russell, et al., *Role of semaphorin 7a signaling in transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis and scleroderma-related interstitial lung disease*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(8): p. 2484-94.
62. Murray, LA, Q Chen, MS Kramer, DP Hesson, et al., *TGF-beta driven lung fibrosis is macrophage dependent and blocked by Serum amyloid P*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(1): p. 154-62.
63. Pilling, D, D Roife, M Wang, SD Ronkainen, et al., *Reduction of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by serum amyloid P*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 4035-44.
64. Castano, AP, SL Lin, T Surowy, BT Nowlin, et al., *Serum amyloid P inhibits fibrosis through Fc gamma R-dependent monocyte-macrophage regulation in vivo*. Sci Transl Med, 2009. **1**(5): p. 5ra13.
65. Crawford, JR, D Pilling, and RH Gomer, *FcgammaRI mediates serum amyloid P inhibition of fibrocyte differentiation*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(4): p. 699-711.
66. Kisseleva, T, M von Kockritz-Blickwede, D Reichtart, SM McGillivray, et al., *Fibrocyte-like cells recruited to the spleen support innate and adaptive immune responses to acute injury or infection*. J Mol Med (Berl), 2011. **89**(10): p. 997-1013.
67. Geissmann, F, S Jung, and DR Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
68. Auffray, C, MH Sieweke, and F Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.
69. Robbins, CS and FK Swirski, *The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(16): p. 2685-93.
70. Swirski, FK, M Nahrendorf, M Etzrodt, M Wildgruber, et al., *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. Science, 2009. **325**(5940): p. 612-6.

71. Tsou, CL, W Peters, Y Si, S Slaymaker, et al., *Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 902-9.
72. Serbina, NV and EG Pamer, *Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 311-7.
73. Seita, J and IL Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.
74. Sunderkötter, C, T Nikolic, MJ Dillon, N Van Rooijen, et al., *Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4410-7.
75. Brühl, H, K Wagner, H Kellner, M Schattenkirchner, et al., *Surface expression of CC- and CXC-chemokine receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases*. Clin Exp Immunol, 2001. **126**(3): p. 551-9.
76. Mack, M, H Brühl, R Gruber, C Jaeger, et al., *Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(5): p. 981-8.
77. Kitagawa, K, T Wada, K Furuichi, H Hashimoto, et al., *Blockade of CCR2 Ameliorates Progressive Fibrosis in Kidney*. The American Journal of Pathology, 2004. **165**(1): p. 237-246.
78. Nelson, PJ, AJ Rees, MD Griffin, J Hughes, et al., *The renal mononuclear phagocytic system*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(2): p. 194-203.
79. Yrlid, U, CD Jenkins, and GG MacPherson, *Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4155-62.
80. Tacke, F, F Ginhoux, C Jakubzick, N van Rooijen, et al., *Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 583-97.
81. Xu, H, A Manivannan, R Dawson, IJ Crane, et al., *Differentiation to the CCR2+ inflammatory phenotype in vivo is a constitutive, time-limited property of blood monocytes and is independent of local inflammatory mediators*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6915-23.
82. Wang, Y and DC Harris, *Macrophages in renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(1): p. 21-7.
83. Lin, SL, AP Castano, BT Nowlin, ML Luper, Jr., et al., *Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6733-43.

84. Machida, Y, K Kitamoto, Y Izumi, M Shiota, et al., *Renal Fibrosis in Murine Obstructive Nephropathy Is Attenuated by Depletion of Monocyte Lineage, Not Dendritic Cells*. Journal of Pharmacological Sciences, 2010. **114**(4): p. 464-473.
85. Kitamoto, K, Y Machida, J Uchida, Y Izumi, et al., *Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy*. J Pharmacol Sci, 2009. **111**(3): p. 285-92.
86. Duffield, JS, PG Tipping, T Kipari, JF Cailhier, et al., *Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis*. Am J Pathol, 2005. **167**(5): p. 1207-19.
87. Ko, GJ, CS Boo, SK Jo, WY Cho, et al., *Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(3): p. 842-52.
88. Reilkoff, RA, R Bucala, and EL Herzog, *Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(6): p. 427-35.
89. Tapmeier, TT, A Fearn, K Brown, P Chowdhury, et al., *Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction*. Kidney Int, 2010. **78**(4): p. 351-62.
90. Chirumbolo, S, *State-of-the-art review about basophil research in immunology and allergy: is the time right to treat these cells with the respect they deserve?* Blood Transfus, 2012. **10**(2): p. 148-64.
91. Mack, M and AR Rosenkranz, *Basophils and mast cells in renal injury*. Kidney Int, 2009. **76**(11): p. 1142-7.
92. Ohmori, K, Y Luo, Y Jia, J Nishida, et al., *IL-3 induces basophil expansion in vivo by directing granulocyte-monocyte progenitors to differentiate into basophil lineage-restricted progenitors in the bone marrow and by increasing the number of basophil/mast cell progenitors in the spleen*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2835-41.
93. Wadhwa, M and R Thorpe, *Haematopoietic growth factors and their therapeutic use*. Thromb Haemost, 2008. **99**(5): p. 863-73.
94. Siracusa, MC, MR Comeau, and D Artis, *New insights into basophil biology: initiators, regulators, and effectors of type 2 inflammation*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1217**: p. 166-77.
95. Denzel, A, UA Maus, M Rodriguez Gomez, C Moll, et al., *Basophils enhance immunological memory responses*. Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 733-42.
96. Rodriguez Gomez, M, Y Talke, N Goebel, F Hermann, et al., *Basophils support the survival of plasma cells in mice*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7180-5.
97. Charles, N, D Hardwick, E Daugas, GG Illei, et al., *Basophils and the T helper 2 environment can promote the development of lupus nephritis*. Nat Med, 2010. **16**(6): p. 701-7.

98. Eddy, AA, JM Lopez-Guisa, DM Okamura, and I Yamaguchi, *Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models*. Pediatr Nephrol, 2012. **27**(8): p. 1233-47.
99. Miner, JH and JR Sanes, *Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome*. J Cell Biol, 1996. **135**(5): p. 1403-13.
100. Donoviel, DB, DD Freed, H Vogel, DG Potter, et al., *Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(14): p. 4829-36.
101. Wang, Y, YP Wang, YC Tay, and DC Harris, *Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events*. Kidney Int, 2000. **58**(4): p. 1797-804.
102. Topham, PS, V Csizmadia, D Soler, D Hines, 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.
103. Chevalier, RL, MS Forbes, and BA Thornhill, *Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy*. Kidney Int, 2009. **75**(11): p. 1145-52.
104. Truong, LD, L Gaber, and G Eknayan, *Obstructive uropathy*. Contrib Nephrol, 2011. **169**: p. 311-26.
105. Vaughan, ED, Jr., D Marion, DP Poppas, and D Felsen, *Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York*. J Urol, 2004. **172**(6 Pt 2): p. 2563-9.
106. Schreiner, GF, KP Harris, ML Purkerson, and S Klahr, *Immunological aspects of acute ureteral obstruction: immune cell infiltrate in the kidney*. Kidney Int, 1988. **34**(4): p. 487-93.
107. Truong, LD, A Farhood, J Tasby, and D Gillum, *Experimental chronic renal ischemia: morphologic and immunologic studies*. Kidney Int, 1992. **41**(6): p. 1676-89.
108. Lee, SB and R Kalluri, *Mechanistic connection between inflammation and fibrosis*. Kidney Int Suppl, 2010(119): p. S22-6.
109. Bennett, CL and BE Clausen, *DC ablation in mice: promises, pitfalls, and challenges*. Trends Immunol, 2007. **28**(12): p. 525-31.
110. Valent, P, J Besemer, M Muhm, O Majdic, et al., *Interleukin 3 activates human blood basophils via high-affinity binding sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(14): p. 5542-6.
111. Finkelman, FD, KB Madden, SC Morris, JM Holmes, et al., *Anti-cytokine antibodies as carrier proteins. Prolongation of in vivo effects of exogenous cytokines by injection of cytokine-anti-cytokine antibody complexes*. J Immunol, 1993. **151**(3): p. 1235-44.

112. Jones, AT and HJ Ziltener, *Enhancement of the biologic effects of interleukin-3 in vivo by anti-interleukin-3 antibodies*. Blood, 1993. **82**(4): p. 1133-41.
113. Pfaffl, MW, GW Horgan, and L Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. e36.
114. Mack, M, J Cihak, C Simonis, B Luckow, et al., *Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4697-704.
115. Arnold, L, A Henry, F Poron, Y Baba-Amer, et al., *Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis*. J Exp Med, 2007. **204**(5): p. 1057-69.
116. Reich, B, K Schmidbauer, M Rodriguez Gomez, FJ Hermann, et al., *Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model*. Kidney Int, 2013.
117. Daley, JM, AA Thomay, MD Connolly, JS Reichner, et al., *Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(1): p. 64-70.
118. Bosma, GC, RP Custer, and MJ Bosma, *A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse*. Nature, 1983. **301**(5900): p. 527-30.
119. Cobbold, SP, A Jayasuriya, A Nash, TD Prospero, et al., *Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo*. Nature, 1984. **312**(5994): p. 548-51.
120. Dialynas, DP, ZS Quan, KA Wall, A Pierres, et al., *Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule*. J Immunol, 1983. **131**(5): p. 2445-51.
121. Liu, L, P Kou, Q Zeng, G Pei, et al., *CD4+ T Lymphocytes, especially Th2 cells, contribute to the progress of renal fibrosis*. Am J Nephrol, 2012. **36**(4): p. 386-96.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1 Aufbau der Niere	9
Abb. 1.2 Schematische Darstellung der einzelnen Phasen in der tubulointerstitiellen Fibrose.....	11
Abb. 1.3 Ursprung der Myofibroblasten in der renalen Fibrose.	13
Abb. 1.4 Potentieller Einfluss von Fibrozyten in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen.	18
Abb. 1.5 Modell der hämatopoetischen Hierarchie.....	23
Abb. 1.6 Entwicklung, Aktivierung und Funktion Basophiler Granulozyten.....	26
Abb. 3.1 Versuchsaufbau zur Depletion der CCR2 ⁺ Monozyten mit MC-21 im UUO-Modell.	41
Abb. 3.2 Depletion der CD11b ⁺ Zellen in transgenen Mäusen mit dem hochaffinen DTR.....	42
Abb. 3.3 Versuchsaufbau zur Depletion von CD11b ⁺ Monozyten im Modell der renalen Fibrose. CD11b-DTR	42
Abb. 3.4 Versuchsaufbau zur Depletion der Gr-1 ⁺ Zellen mit anti-Gr-1 Antikörper im UUO-Modell....	43
Abb. 3.5 Versuchsaufbau zur Untersuchung von CD4 ⁺ T-Zellen bei der Fibrozytenentstehung in der fibrotischen Niere.	43
Abb. 3.6 Versuchsaufbau zur Untersuchung Basophiler Granulozyten bei der Fibrozytenakkumulation in der fibrotischen Niere.	44
Abb. 3.7 Versuchsaufbau zur Untersuchung aktiver Basophiler Granulozyten bei der Fibrozytenakkumulation nach Ureterobstruktion.	45
Abb. 4.1 Gating Strategie zur Identifizierung der Fibrozyten mittels FACS am Beispiel der Milz.....	53
Abb. 4.2 Zahl der Fibrozyten im Verlauf der UUO.	54
Abb. 4.3 Phänotypische Charakterisierung der Fibrozyten in der UUO-Niere und in der Milz anhand der Expression verschiedener Oberflächenmarker.	55
Abb. 4.4 Depletion der Monozyten nach der Behandlung mit MC-21 von Tag -1 bis Tag 6.	56
Abb. 4.5 Zahl der Fibrozyten und mRNA Expression von Kollagen I nach MC-21 Behandlung von Tag -1 bis 6.	57
Abb. 4.6 Depletion der Monozyten mit dem monoklonalen Antikörper MC-21 von Tag -1 bis Tag 2....	58
Abb. 4.7 Depletion der Monozyten mit dem monoklonalen Antikörper MC-21 von Tag 4 bis 6.	59
Abb. 4.8 Monozyten in CCR2 ^{-/-} und Wildtyp-Mäusen.	60

Abb. 4.9 Fibrozyten in CCR2 ^{-/-} und Wildtyp-Mäusen	61
Abb. 4.10 Ausprägung der renalen Fibrose in CCR2 ^{-/-} und Wildtyp-Mäusen.	62
Abb. 4.11 Depletion der Monozyten in CD11b-DTR Knochenmark-chimären Mäusen.....	63
Abb. 4.12 Depletion der Fibrozyten in CD11b-DTR Knochenmark-chimären Mäusen.....	64
Abb. 4.13 Depletion von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten nach Behandlung mit anti-Gr-1 von Tag -1 bis Tag 6.....	65
Abb. 4.14 Depletion der Fibrozyten nach der Behandlung mit anti-Gr-1 von Tag -1 bis Tag 6.....	66
Abb. 4.15 Depletion der Monozyten und Neutrophilen Granulozyten nach der Behandlung mit anti-Gr-1 von Tag 3 bis 6.....	67
Abb. 4.16 Depletion der Fibrozyten nach der Behandlung mit α Gr-1 von Tag 3 bis 6	68
Abb. 4.17 Depletion der Monozyten, Neutrophilen Granulozyten und Fibrozyten nach der Behandlung mit anti-Gr-1 von Tag -1 bis 2.....	69
Abb. 4.18 Depletion der CD4 ⁺ T-Zellen nach Behandlung mit GK1.5.....	71
Abb. 4.19 Zahl der Fibrozyten und Grad der renalen Fibrose nach Behandlung mit GK1.5.....	72
Abb. 4.20 Depletion Basophiler Granulozyten nach Behandlung mit MAR1.....	74
Abb. 4.21 Zahl der Monozyten nach Behandlung mit MAR1.....	75
Abb. 4.22 Zahl der Fibrozyten und Ausprägung der renalen Fibrose nach der Behandlung mit MAR1.....	76
Abb. 4.23 Expansion der Basophilen Granulozyten nach Behandlung mit IL-3 und IL-3 Immunkomplex.....	77
Abb. 4.24 Expansion der Monozyten und Neutrophilen Granulozyten nach Behandlung mit IL-3 Immunkomplex.....	79
Abb. 4.25 Zahl der Fibrozyten und die mRNA Expression von Kollagen I nach Behandlung mit IL-3 Immunkomplex.....	80
Tab. 1.1 Marker einiger EZM-produzierender Zellen in der renalen Fibrose.....	16

9 Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha, anti
A	Fläche
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
α SMA	alpha smooth muscle actin
β	Beta
Basos	Basophile Granulozyten
BLM	Bleomycin
BMD	Bone marrow derived
BMDC	Bone marrow derived cells
BMP-7	Bone morphogenetic protein - 7
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
CCL	CC-Ligand
CCR	CC-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
CIA	Collagen induced arthritis
cm	Zentimeter
CMP	Common myeloid progenitor
Col4 α 3	Collagen 4 alpha 3
C _T	Cycle threshold, Schwellenwert-Zyklus
CTGF	Connective tissue growth factor
CXCL	CXC-Ligand
CXCR	CXC-Rezeptor
Δ	Delta
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleosidtriphosphat
DT	Diphtherie Toxin
DTR	Diphtherie Toxin Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ε	Epsilon
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EndoMT	Endothelial-mesenchymale Transition
EPO	Erythropoietin
<i>et al.</i>	et alteri (lat.), und andere

EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum, Fötale Kälberserum
FGF2	Fibroblast growth factor 2, auch b-FGF genannt
FLSZ	Fibroblasten-ähnliche Synovialzellen
FSC	Forward scatter, Vorwärtsstreulicht
FSP1	Fibroblast-specific protein 1
γ	Gamma
GAGs	Glycosaminglykan
GFP	Green fluorescent protein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GITC	Guanidinithiocyanat
GMP	Granulozyten-Makrophagen Progenitor
Gy	Gray
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA-DP	$\alpha\beta$ -heterodimer cell-surface receptor
HLA-DQ	$\alpha\beta$ -heterodimer cell-surface receptor
HLA-DR	$\alpha\beta$ -heterodimer cell-surface receptor
HMWHA	hochmolekulare Hyaluronsäure
hPAP	humane plazentare alkalische Phosphatase
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
i.p.	intraperitoneal
IFN γ	Interferon gamma
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IR	Ischämie-Reperfusion
IRI	Ischämie Reperfusionsschaden
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
Laser	Light amplification by stimulated emission of radiation
LMWHA	niedermolekulare Hyaluronsäure
μ l	Mikroliter
MAP	Mitogen-activated protein
MCP	Monocyte chemoattractant protein
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
min.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/Liter)

M-MLV	Moloney-Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger ribonucleic acid
Mst1	Mammalian sterile 20-like Kinase 1
MW	Mittelwert
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NSF	Nephrogene systemische Fibrose
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR β	Platelet-derived growth factor receptor beta
PRKDC	Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide
PRR	Pattern recognition receptors
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RA	Rheumatoide Arthritis
RAG1	Recombination-activating protein 1
RANTES	Regulated and normal T cell expressed and secreted
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
SAP	Serum Amyloid A
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
sec	Sekunden
SEM	Standard error of the mean
SLE	Systemischer Lupus erythmatodes
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Tab.	Tabelle
TBM	Tubuläre Basalmembran
TGF- β	Transforming growth factor-beta
T _H	T-Helfer
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
t-PA	Tissue-type plasminogen activator
TSLP	Thymic stromal lymphopoitin
U	Unit
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion

uvm.	und vieles mehr
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
Vers.	Version
W	Weite
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

10 Anhang

10.1 Danksagung

„Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.“

Johann Wolfgang von Goethe

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und ein paar Worte des Dankes aussprechen, auch wenn diese sich manchmal nur schwer ausdrücken lassen.

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias Mack bedanken. Ich danke vor allem für die Möglichkeit die Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können und das in mich gesetzte Vertrauen. Seine außerordentlich kompetente Unterstützung, sein Enthusiasmus für die Forschung im Allgemeinen und für das Thema der Fibrozyten haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem sollen seine Großzügigkeit und die stetige Förderung bei der Teilnahme an weiterbildenden Kursen, Kongressen und Kooperationsprojekten nicht unerwähnt bleiben.

Bei Prof. Dr. Richard Warth und Prof. Dr. Hans-Robert Kalbitzer bedanke ich mich für die Übernahme des Fachmentorats seitens der Regensburger Internationalen Graduiertenschule für Lebenswissenschaften (RIGeL).

Prof. Dr. Frank Schweda danke ich für die freundliche Bereitschaft diese Dissertation als Zweitgutachter zu beurteilen.

Ein riesengroßer Dank gebührt meinen ehemaligen und derzeitigen Kollegen/innen der „AG Mack“: Marianne, Andrea, Shahzad, Manuel, Fabian, Kerstin, Gabi, Yvonne, Nicole, Isabel und Kathrin. Marianne: du hast mich rasch, aber in aller Ausführlichkeit in das Fibrozyten-Projekt und insbesondere in die Durchführung der einseitigen Ureterligatur eingearbeitet. Deine beachtlichen Vorarbeiten waren die Basis meiner Dissertation, sodass ich sehr schnell darauf aufbauen und „positive“ Ergebnisse verzeichnen konnte. Andrea: dir danke ich für das Einführen in das richtige Handling der Mäuse und auch für das Mitmachen der einen oder anderen sportlichen Aktivität als Ablenkung zum Arbeitsalltag. Shahzad: danke für das Zurverfügungstellen von Software-Programmen, die mir die Präsentation der Ergebnisse unheimlich erleichtert haben. Manuel, Fabian, Kerstin: euch danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit, eure Anregungen, eure ständige Bereitschaft über kleine und große „Problemchen“ im Laboralltag bzw. des „Doktoranden-Lebens“ zu diskutieren und auch für das Aushelfen, wo auch immer der Schuh drückt. Gabi: deine frische und unendlich

positive Energie hat mich besonders in der Schlussphase des Schreibens sehr motiviert. Durch dein äußerst aufmerksames Lesen, deine konstruktive Kritik und deine hilfreichen Tipps konnte dieser Arbeit der letzte Schliff verliehen werden. Yvonne: du hast mir insbesondere in den ersten Jahren der Promotion sehr viel unter die Arme gegriffen. So wurden die langen Tage der Versuchsenden mit deiner Hilfe (bereits sehr früh am Morgen) ziemlich verkürzt. Außerdem hast du überaus viele organisatorische Aufgaben innerhalb des Labors übernommen, was mir oftmals das Arbeiten extrem erleichtert hat. Nicht umsonst wirst du von uns „Labor-Mutti“ genannt. Nicole: dir danke ich für den intravenösen Transfer der Zellen in bestrahlte Mäuse, deine Geduld beim Beibringen dieser Methode und auch für weitere Hilfestellungen bei den Versuchsenden oder sonstigen Kleinigkeiten. Isabel: du warst einige Male die Retterin in letzter Sekunde. Danke für das (meistens) spontane Aushelfen bei der Durchführung von FACS Färbungen. Kathrin: dir kann ich gar nicht genug für die vielen Immunfluoreszenz-Färbungen und qPCR-Ansätze danken, die du freundlicherweise für mich erledigt hast. Auf dich kann ich mich immer ausnahmslos verlassen. Vielen Dank dafür.

Ein großer Dank geht auch an alle anderen Mitarbeiter/innen der Inneren Medizin II für den einen oder anderen Tipp und das Aushelfen mit Reagenzien o.ä. Ein besonderer Dank gilt dabei Dr. Andreas Steege und PD Dr. Klaus Stark für ihre Ratschläge nicht nur bei molekularbiologischen Fragestellungen, sondern auch konstruktive Kritik bei Probevorträgen oder sonstigen Präsentationen. Ein Dankeschön geht auch an die Tierpfleger des Tierstalls H1 für die gute Zusammenarbeit und Betreuung der wichtigsten „Teilnehmer“ dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner großen Familie für zahllose aufmunternde Gespräche und motivierende Worte speziell in der Abschlussphase dieser Arbeit bedanken. Vor allen Dingen danke ich meinen Eltern, die mich stets in jeglicher Form bedingungslos unterstützt und in meinen Plänen bestärkt haben. Zu guter Letzt danke ich Sakeh Forcob; du begleitest mich nicht nur in allen Lebenslagen, sondern hast mir damals (vor vielen Jahren) den Impuls zur akademischen Laufbahn gegeben. Du inspirierst mich immerfort nach höheren Zielen zu streben und trägst alle Entscheidungen, die meinen beruflichen Werdegang betreffen, in besonderem Maße mit. Ein außerordentliches Dankeschön dafür.

Herzlichen Dank an Alle, denen ich auf diesem Weg begegnen durfte.

10.2 Publikationen

Veröffentlichungen

B. Reich, K. Schmidbauer, M. Rodriguez Gomez, F. J. Hermann, N. Göbel, H. Brühl, I. Ketelsen, Y. Talke and M. Mack (2013). "Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model." Kidney Int. 84(1):78-89.

M. Mack, M. Niedermeier and **B. Reich** (2012). "Immunoregulation of Fibrocyte Differentiation." In: Bucala, R. (Hrsg.). "Fibrocytes in Health and Disease." Singapore: World Scientific.

J. R. Martins*, D. Faria*, P. Kongsuphol*, **B. Reich**, R. Schreiber and K. Kunzelmann (2011). "Anoctamin 6 is an essential component of the outwardly rectifying chloride channel." Proc Natl Acad Sci U S A 108(44): 18168-18172. *: contributed equally

Rodriguez Gomez, M., Y. Talke, N. Göbel, F. Hermann, **B. Reich** and M. Mack (2010). "Basophils support the survival of plasma cells in mice." J Immunol 185(12): 7180-7185.

Niedermeier, M., **B. Reich**, M. Rodriguez Gomez, A. Denzel, K. Schmidbauer, N. Göbel, Y. Talke, F. Schweda and M. Mack (2009). "CD4⁺ T cells control the differentiation of Gr1⁺ monocytes into fibrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 106(42): 17892-17897.

Vorträge

B. Reich, F. Hermann, Y. Talke, M. Rodriguez Gomez, K. Schmidbauer, N. Göbel, I. Ketelsen and M. Mack. "Fibrocyte development: role of CCR2⁺ Gr-1⁺ monocytes." 49th ERA-EDTA Congress, Paris, 24. – 27. Mai 2012

B. Reich, Y. Talke, M. Rodriguez Gomez, F. Hermann, I. Ketelsen, N. Göbel and M. Mack. "Fibrozytenentstehung: Rolle der Monozytenrekrutierung über den Chemokinrezeptor CCR2." 3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin, 10. – 13. September 2011

B. Reich, M. Rodriguez Gomez, A. Denzel, Y. Talke, M. Ostler, N. Göbel and M. Mack. "Genesis of Fibrocytes." Summer School SFB 423 / SFB 699, Hersbruck, 09. – 10. Juli 2010

Posterbeiträge

B. Reich, F. Hermann, M. Rodriguez Gomez, K. Schmidbauer, Y. Talke, I. Ketelsen, N. Göbel and Matthias Mack. "Depletion Gr-1⁺ CD11b⁺ Monozyten reduziert die Zahl der Fibrozyten und die renale Fibrose im Modell der einseitigen Ureterobstruktion (UUO) bei Mäusen." 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Hamburg, 06. – 09. Oktober 2012

M. Rodriguez Gomez, Y. Talke, C. Hofmann, I. Ketelsen, F. Hermann, **B. Reich**, N. Goebel, S. Nawaz Syed, M. Mack. "Basophils Control Disease Activity and T cell Responses in Experimental Murine Colitis." European Congress of Immunology, Glasgow, 05. – 08. September 2012

B. Reich, Y. Talke, M. Rodriguez Gomez, F. Hermann, I. Ketelsen, N. Göbel and M. Mack. "Fibrocyte development: role of monocytes recruited via the chemokine receptor CCR2." 3rd International Symposium of the Collaborative Kidney Research Centre SFB 699, Regensburg, 07. – 08. Oktober 2011

B. Reich, M. Niedermeier, M. Rodriguez Gomez, A. Denzel, Y. Talke, M. Ostler, N. Göbel and M. Mack. "CD4⁺ T cells and basophils regulate differentiation of murine monocytes into fibrocytes." XLVII ERA-EDTA Congress, II DGfN Congress, München, 25. – 28. Juni 2010

M. Niedermeier, A. Denzel, M. Rodriguez Gomez, **B. Reich**, K. Schmidbauer, N. Göbel, Y. Talke and M. Mack. "CD4⁺ T-Zellen regulieren die Differenzierung von Monozyten in Fibrozyten." 1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Göttingen, 26. – 29. September 2009

M. Niedermeier, A. Denzel, M. Rodriguez Gomez, **B. Reich**, K. Schmidbauer, N. Göbel, Y. Talke and M. Mack. "CD4⁺ T cells control the differentiation of monocytes into fibrocytes." 2nd International Symposium of the Collaborative Research Centre SFB 699, Regensburg, 03. – 04. Juli 2009