

**Die physiologische Bedeutung
des Chemokinrezeptors CCR7 und
seines Liganden CCL21 für die
glomeruläre Entwicklung und Morphologie**



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Simone Wurm

aus Regensburg
im Jahr 2014

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 27.05.2014

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Armin Kurtz

Vorsitzender	Prof. Dr. Gunter Meister
1. Gutachter	Prof. Dr. Armin Kurtz
2. Gutachter	Prof. Dr. Bernhard Banas
3. Prüfer	Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer
Ersatzprüferin	Prof. Dr. Charlotte Wagner

Unterschrift

Simone Wurm

Zusammenfassung

Die Nephrone als funktionelle Einheiten der Niere setzen sich aus mehreren Kompartimenten zusammen, die ihrerseits aus verschiedenen zum Teil hochspezialisierten Zellen bestehen. Die Weichen für die fehlerfreie Funktionalität dieser Zellen werden bereits in der Entwicklung gestellt. Neben Differenzierungsprozessen entscheidet dabei auch die Fähigkeit zu Migration, Adhäsion und Apoptose über die spätere Physiologie. Während der Migrations- und Adhäsions-fördernde Effekt von Chemokinen und ihren Rezeptoren bei Immunzellen seit längerem bekannt ist, steht die Forschung zur Bedeutung dieser Moleküle in (Entwicklungs-) physiologischen Prozessen und außerhalb eines immunologischen bzw. pathologischen Kontextes noch am Anfang.

Mit dem Chemokinligand-/Rezeptorpaar CCL21/CCR7 konnte in früheren Studien erstmals ein CC-Chemokin mit seinem Rezeptor identifiziert werden, dessen Zusammenspiel *in vitro* die Migrations- und Adhäsionseffizienz von Mesangialzellen steigert. Außerdem bewirkt die Rezeptoraktivierung über CCL21 eine reduzierte Suszeptibilität gegenüber induzierter Apoptose.

In dieser Arbeit konnte erstmals im Mausmodell der *in vivo*-Beweis erbracht werden, dass CCL21 und CCR7 renal bereits von frühester Entwicklung an exprimiert werden. Während sich die mesangiale CCR7-Expression mit zunehmendem Alter als schwach und eher diffus präsentiert, lokalisiert der Chemokinligand konstitutiv auf Podozyten. Somit konnte mit den Podozyten erstmals ein epithelialer CCL21-Expressionsort identifiziert werden, der nicht der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase dient. Stattdessen profitieren Mesangialzellen – und das von frühester Nephrogenese an – von der CCL21-vermittelten Rezeptoraktivierung. Bereits die Migration mesangialer Vorläuferzellen in das sich entwickelnde Glomerulum erfolgt effizienter in wildtyp (WT) Mäusen als in CCR7-defizienten ($CCR7^{-/-}$) Tieren. Der entwicklungsphysiologisch nächste Schritt, die Aufspaltung der ersten Kapillarschlinge zum glomerulären Schlingenkonvolut durch die Mesangialzellen, erfolgt durch das Fehlen des Chemokinrezeptors verzögert. In Folge dessen verfügen $CCR7^{-/-}$ -Mäuse im Alter von fünf Wochen noch immer über Glomerula, deren Kapillarschlingenkonvolut größtenteils nicht vollständig ausgeformt ist. Auch in älteren Tieren können mit der hier vorliegenden Arbeit die Ergebnisse früherer *in vitro*-Experimente untermauert werden. Der rapide Mesangialzellverlust nach der 10. Lebenswoche verdeutlicht den Unterschied zwischen WT- und $CCR7^{-/-}$ -Mäusen hinsichtlich des mesangialen Langzeitüberlebens. Neben diesem ist auch die Physiologie der Mesangialzellen vom Fehlen des Chemokinrezeptors beeinträchtigt, da mit dem Rückgang der glomerulären Mesangialzellen eine extensive Matrixexpansion einhergeht. Zusätzlich zu einer gesteigerten Kollagenproduktion wurden vor allem zahlreiche IgA- und IgM-Immundepots festgestellt. Wie Zell-spezifisch die Bedeutung von CCL21 und CCR7 in der Niere ist, offenbart die Tatsache, dass neben dem Mesangium – weder außerhalb des Glomerulum (Tubuli), noch innerhalb von diesem (Endothelzellen, Podozyten, glomeruläre Basalmembran) – keine andere renale Struktur oder Zelle von der CCR7-Defizienz betroffen ist.

Zusammenfassend konnte mit der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Wirkspektrum des Chemokinligand-/Rezeptorpaars nicht auf die Rekrutierung von Immunzellen oder die Organisation lymphatischer Organe beschränkt ist. Stattdessen spielen CCL21 und CCR7 speziell im Kontext der Glomerulogenese und glomerulären Morphologie eine entscheidende Rolle, da das Zusammenspiel der beiden Moleküle sowohl die mesangiale Migration als auch die mesangiale Funktionalität, und damit die glomeruläre Architektur, maßgeblich beeinflusst.

Abstract

As functional renal unit each nephron is composed of several compartments, which in turn consist of various, to some extend, highly specialized cells. However, an accurate functionality of these cells is based on correctly adjusted physiological events during development. These include differentiation processes as well as the ability to migrate, adhere and survive. For immune cells chemokines and their receptors are key molecules in mediating migration and adhesion. In contrast to this, only few is known about their role in processes regarding development and physiology in a not immunological or pathological background.

Previous *in vitro* studies identified CCL21 and CCR7 as the first CC-chemokine ligand/receptor pair to influence mesangial cell migration and adhesion. Furthermore, mesangial cell stimulation by CCL21 resulted in a reduced susceptibility to induced apoptosis.

Using a mouse model this thesis clearly provides evidence that both CCL21 and CCR7 are renally expressed from the very early metanephrogenic development. Whereas mesangial CCR7 expression declines in respect of its specificity and intensity, CCL21 is constitutively expressed by podocytes in adult mice. Thereby, podocytes represent the first epithelial cell type to synthesize this chemokine under non-pathological conditions and without being involved in maintaining immune homeostasis. From the beginning of nephrogenesis, mesangial cells benefit from CCL21 mediated receptor activation. Compared to wildtype (WT) animals, mesangial precursor cells in CCR7 deficient ($CCR7^{-/-}$) mice migrate less efficiently into the developing glomerulus. After arriving and forming a mesangial core, mesangial cells start to organize the glomerular tuft by splitting the first capillary loop in several capillaries. However, in $CCR7^{-/-}$ mice this process is retarded with the result that at the age of 5 weeks the glomerular tufts are not completely developed in the majority of these animals. Analyses of older mice further confirm previous *in vitro* results regarding mesangial survival after CCL21 stimulation. Between the age of 10th and 15th week, the amount of glomerular mesangial cells rapidly decreases in $CCR7^{-/-}$ mice. This loss of mesangial cells is accompanied by an impaired mesangial functionality, which includes an increased collagen production as well as an extensive mesangial matrix expansion. Moreover, IgA and IgM immune deposits localize in the mesangial matrix. Nevertheless, all renal aspects of CCR7 deficiency exclusively affect the mesangium whereas other renal structures like tubules or the glomerular basement membrane and glomerular cells like endothelial cells or podocytes do not exhibit morphological nor physiological changes.

In conclusion, the results of this thesis reveal that CCL21 and CCR7 are not only involved in recruitment of immune cells or the organization of lymphoid organs. This chemokine ligand/receptor pair, instead, plays a pivotal role especially in the context of glomerulogenesis and glomerular morphology by affecting mesangial migration as well as mesangial functionality and as a result glomerular architecture.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	2
1.1 Niere und Nephrogenese	2
1.1.1 Die Niere – Aufbau und Funktion.....	2
1.1.2 Die Entwicklung der Nieren: die Nephrogenese	4
1.1.2.1 Die Nephronbildung.....	4
1.1.2.2 Glomerulogenese und Ausbildung des glomerulären Schlingenkonvoluts	6
1.1.3 Das glomeruläre Mesangium.....	8
1.1.3.1 Aufbau des Mesangiums	9
1.1.3.2 Die Mesangialzelle – eine Zelle mit Perizyten-/Glatte Muskelzell-Eigenschaften	9
1.1.3.3 Phagozytose im Mesangium.....	11
1.2 Chemokine	12
1.2.1 Chemokine als Dirigenten der Leukozytenmigration.....	12
1.2.1.1 Leukozytenrekrutierung unter inflammatorischen Bedingungen	12
1.2.1.2 Chemokin-abhängige Leukozytenmigration zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase	14
1.2.2 Chemokine als Schlüsselmoleküle weiterer Funktionen.....	18
1.3 Das Chemokinligand/-Rezeptorpaar CCL21 und CCR7 im renalen Kontext	20
1.3.1 Die CCR7-Liganden CCL19 und CCL21	20
1.3.2 Die renale Bedeutung von CCR7 und CCL21	21
1.3.2.1 Inflammatorische, pathophysiologische und physiologische renale Chemokin-Expression.....	21
1.3.2.2 Die Bedeutung von CCR7 und CCL21 unter nicht-inflammatorischen Bedingungen in Bezug auf das glomeruläre Mesangium	22
1.4 Zielsetzung.....	24
2 MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Materialien.....	26
2.1.1 Allgemeine Chemikalien	26
2.1.2 Chemikalien und Kits für histochemische und (Fluoreszenz)-immunhistochemische Färbungen.....	26
2.1.3 Chemikalien und Kits für molekularbiologische und proteinbiochemische Experimente.....	26
2.1.4 Chemikalien und Kits für zellbiologische Experimente.....	27
2.1.5 Chemikalien und Kits zur Untersuchung des Mausmodells	28
2.1.6 Antikörper	28
2.1.7 Software	29
2.1.8 Geräte.....	29
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Allgemeines	30
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.2.1 Isolierung und Bestimmung der Konzentration von RNA.....	30
2.2.2.2 cDNA-Synthese	30

2.2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Kolonie-PCR und Agarosegelektrophorese	30
2.2.2.4	Quantitative PCR.....	31
2.2.2.5	Klonierung	34
2.2.2.6	Transformation.....	34
2.2.2.7	Sequenzierung.....	34
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	34
2.2.3.1	Proteinextraktion.....	34
2.2.3.2	Proteinbestimmung.....	35
2.2.3.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelektrophorese.....	35
2.2.3.4	Färben von SDS-Gelen	36
2.2.3.5	Western Blot (Nasstransfer-Methode) und immunchemische Detektion.....	36
2.2.3.6	Luciferase-Assay	37
2.2.3.7	Kreatinin-Assay.....	37
2.2.3.8	Albumin-ELISA	38
2.2.4	(Immun-) Histochemische Methoden	38
2.2.4.1	Vorbereitungen und Allgemeines.....	38
2.2.4.2	Perjodsäure-Schiff-Färbung.....	39
2.2.4.3	Sirius-Rot-Färbung	39
2.2.4.4	Modifizierte Silberfärbung nach Jones.....	40
2.2.4.5	Immunhistochemische und Fluoreszenz-immunhistochemische Färbungen.....	40
2.2.4.6	Morphometrische Analysen	41
2.2.4.7	Einzelzellanalyse	42
2.2.5	Elektronenmikroskopie	43
2.2.6	Zellkultur	43
2.2.6.1	Verwendete Zellen und allgemeine Kultivierungstechniken	43
2.2.6.2	Transfektion und Induktion der Genexpression	44
2.2.7	Mäuse.....	45
2.2.7.1	Mausmodell und Tierhaltung.....	45
2.2.7.2	Gewinnung von Nieren aus Embryonen und postpartalen Mäusen	45
2.2.7.3	Gewinnung von Sammelurin, Blut und Durchführung von Perfusion und Organentnahme bei adulten Tieren.....	46
2.2.7.4	Blutdruckmessungen bei Mäusen.....	46
2.2.8	Statistik und Darstellung der Ergebnisse	46
3	ERGEBNISSE	50
3.1	Nachweis der renalen CCR7- und CCL21-Expression auf mRNA- und Proteinebene	50
3.1.1	CCR7 und CCL21 mRNA-Expression in Embryonen, postpartalen und adulten Mäusen	50
3.1.2	Immunhistochemische Lokalisation von CCR7 und CCL21.....	51
3.1.1.1	Immunhistochemischer Nachweis von CCR7	51
3.1.1.2	Immunhistochemischer Nachweis von CCL21.....	52
3.2	Charakterisierung der CCR7^{-/-}-Maus	54
3.2.1	Physiologische Daten	54
3.2.1.1	Gesamtkörpergewicht und Gewichte der Organe in Relation zum Gesamtkörpergewicht.....	54

3.2.1.2	Serumanalysen.....	58
3.2.1.3	Urinanalysen.....	60
3.2.1.4	Blutdruckmessungen	64
3.2.2	Glomeruläre Zellularität und Architektur	65
3.2.2.1	Änderungen in der glomerulären Mesangialzellzahl	65
3.2.2.2	Verzögerte Entwicklung des glomerulären Schlingenkonvoluts.....	67
3.2.2.3	PAS-Färbung	69
3.2.2.4	Sirius Rot-Färbung.....	71
3.2.2.5	Modifizierte Silberfärbung nach Jones.....	72
3.2.2.6	Elektronenmikroskopische Analysen	73
3.2.3	Immunologische Aspekte der CCR7-Defizienz.....	75
3.2.3.1	Glomeruläre Ablagerungen der Immunglobuline Typ A und M.....	75
3.2.3.2	Infiltrierende Makrophagen	77
3.2.4	Veränderte mRNA-Expression weiterer Chemokine.....	79
3.2.4.1	Das Chemokinligand-/Rezeptorpaar CXCL13 und CXCR5	80
3.2.4.2	Das Chemokinligand-/Rezeptorpaar CCL28 und CCR10	82
3.3	Erzeugung der Podocin-rtTA_CCL21a-Tet-On-Maus.....	85
3.4	Potenzielle Regulationsmechanismen in Mesangialzellen	87
3.4.1	<i>In vitro</i> -Überexpression der Fusionsproteine CCL21a-Luciferase und CCL21a-GFP.....	87
3.4.1.1	Transfektion von HEK 2T93-Zellen und MMCs mit pTRE_Luci und pTRE_CCL21a_Luci	87
3.4.1.2	Transfektion von HEK 293T-Zellen und MMCs mit pEGFP-N1 und p-CCL21a-EGFP-N1	88
3.4.2	Transfektionsexperimente mit CCL21a-Teilsequenz-Konstrukten.....	89
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	91
4	DISKUSSION	94
4.1	CCR7 und CCL21 werden renal von frühester Entwicklung an exprimiert.....	94
4.1.1	Bekannte Chemokin-Protein und CCL21/CCR7 mRNA-Expression in der Nephrogenese	94
4.1.2	CCR7 Proteinexpression	95
4.1.3	CCL21 Proteinexpression.....	98
4.2	Folgen der CCR7-Defizienz.....	100
4.2.1	CCR7 und seine Bedeutung für die Entwicklung und den Erhalt des Mesangiums.....	100
4.2.2	Glomeruläre Ablagerung in Folge der CCR7-Defizienz	104
4.2.2.1	Morphologischen Veränderungen in der Architektur des Mesangiums.....	104
4.2.2.2	Immunologische Aspekte der Matrixexpansion.....	105
4.2.3	Physiologische Unterschiede zwischen WT- und CCR7 ^{-/-} -Mäusen	107
4.3	Zusammenfassung und Ausblick.....	110

5 ANHANG	113
5.1 Literaturverzeichnis.....	113
5.2 Abkürzungsverzeichnis	127
5.3 Abbildungsverzeichnis	128
5.4 Tabellenverzeichnis.....	130
5.5 Danke.....	132
Eidesstattliche Erklärung.....	133

Einleitung

1 Einleitung

Die Niere ist eines der komplexesten Organe des Körpers. Zahlreiche hochspezialisierte Zellen bilden verschiedenste Kompartimente, in denen nicht nur Urin produziert und Abfallprodukte ausgeschieden werden, sondern auch die Regulation wichtiger Körperfunktionen stattfindet. Funktionen wie die Kontrolle des Wasserhaushalts oder der Hormonbildung beruhen dabei auf einem komplexen System von Zellen, die bereits auf geringfügige Abweichungen von der physiologischen Norm reagieren. Dies setzt allerdings eine fehlerlose Signaltransduktion voraus, welche ihrerseits nur möglich ist, wenn bereits in der Entwicklung alle physiologisch-anatomischen Eigenschaften der Niere von der Ebene der einzelnen Zelle bis zum gesamten Organ korrekt ausgebildet werden konnten.

Neben den Nieren und anderen Organen, die für die physiologischen Prozesse im Körper zuständig sind, existiert das Immunsystem, welches das biologische Verteidigungssystem gegen Pathogene aller Art bildet. Dieses unterliegt, wie auch die Nieren, fein justierten Regulationsmechanismen, ohne die eine Immunreaktion nur noch eingeschränkt erfolgt oder gegen den eigenen Körper gerichtet ist.

Lange wurden physiologische und immunologische Prozesse als voneinander unabhängig betrachtet. Allerdings zeigte sich im Lauf der Zeit, dass einerseits die physiologische Kondition das Immunsystem beeinflusst, andererseits Moleküle, deren Hauptwirkungsspektrum in der Immunabwehr liegt, auch in der Entwicklung, Funktion und Architektur verschiedener Zellen und Gewebe eine Rolle spielen.

In dieser Arbeit soll die Bedeutung von Chemokinen – im Speziellen die des Chemokinligand-Rezeptor-Paares CCL21-CCR7 – als immunologische Faktoren für die Entstehung, Funktion und Morphologie der Nieren dargestellt werden.

1.1 Niere und Nephrogenese

1.1.1 Die Niere – Aufbau und Funktion

Die zentrale Funktion der Niere ist die Harnbildung, die beim Menschen in den etwa 1,0 bis 1,4 Millionen Nephronen stattfindet. Die Nephrone stellen die funktionellen Einheiten dar, die jeweils aus einem Glomerulum und dem sich daran anschließenden Tubulusapparat bestehen (vgl. Abb. 1A). Wie in Abb. 1B dargestellt, ist das Glomerulum von der Bowman-Kapsel umgeben, in welche die afferente Arteriole mündet und von welcher die efferente Arteriole austritt. Dabei fächert sich die afferente Arteriole in der Bowman-Kapsel in 5 bis 7 Kapillaren auf, die sich vor dem Austreten aus dem Glomerulum wieder zu efferenten Arteriole vereinen und so das glomeruläre Schlingenkonvolut bilden.

Die glomerulären Kapillaren sind einerseits mit fenestrierten Endothelzellen ausgekleidet andererseits von hochspezialisierten Epithelzellen, den Podozyten, ummantelt. Beide Zelltypen sind für die Synthese der glomerulären Basalmembran (GBM) verantwortlich, die sich zwischen Endo- und Epithelzellen befindet und so die Podozyten von den Endothel- und Mesangialzellen trennt. Letztere bilden das

Mesangium und fungieren u. a. als mechanische Stütze für das Schlingenkonvolut. Charakteristisch für die Podozyten ist ihre Eigenschaft, verzweigte Fußfortsätze auszubilden, die sich mit den Fortsätzen des benachbarten Podozyten verzähnen. Endothelzellen, GBM und Podozyten bilden zusammen die glomeruläre Filterbarriere, die über eine molekulare Ausschlussgröße von 70 kDa verfügt. Neben dieser stellt die negative Ladung des glomerulären Filters seine wichtigste Eigenschaft dar, da die Filterbarriere so für Zellen wie auch Plasmaproteine nahezu unpassierbar ist, während Wasser, Elektrolyte und niedermolekulare Substanzen die Schranke durchqueren können und so vom Lumen der Kapillare in das Lumen der Bowman-Kapsel, den Urinspalt, gelangen. Dieser als Ultrafiltration des Bluts bezeichnete Prozess resultiert in der Bildung des Primärharns. Durch die Ultrafiltration produziert ein Mensch etwa 180 l Primärharn am Tag. Dieser gelangt von der Bowman-Kapsel über den proximalen Tubulus in die Henle-Schleife und schließlich in den distalen Tubulus, der in eines der zahlreichen Sammelrohre mündet, welche ihrerseits im Nierenbecken zusammenlaufen. Die Ultrafiltration erfolgt, abgesehen von Größe und Ladung, unspezifisch hinsichtlich der Art der filtrierten Moleküle. Im Gegensatz dazu werden im Tubulusapparat teils aktiv teils entlang des osmolaren Gradienten Wasser, Salze, Zucker und Aminosäuren reabsorbiert. Dadurch wird der Primärharn stetig weiter konzentriert bis er als Endharn das Nierenbecken und schließlich über den Harnleiter die Blase erreicht [Alpern et al., 2013].

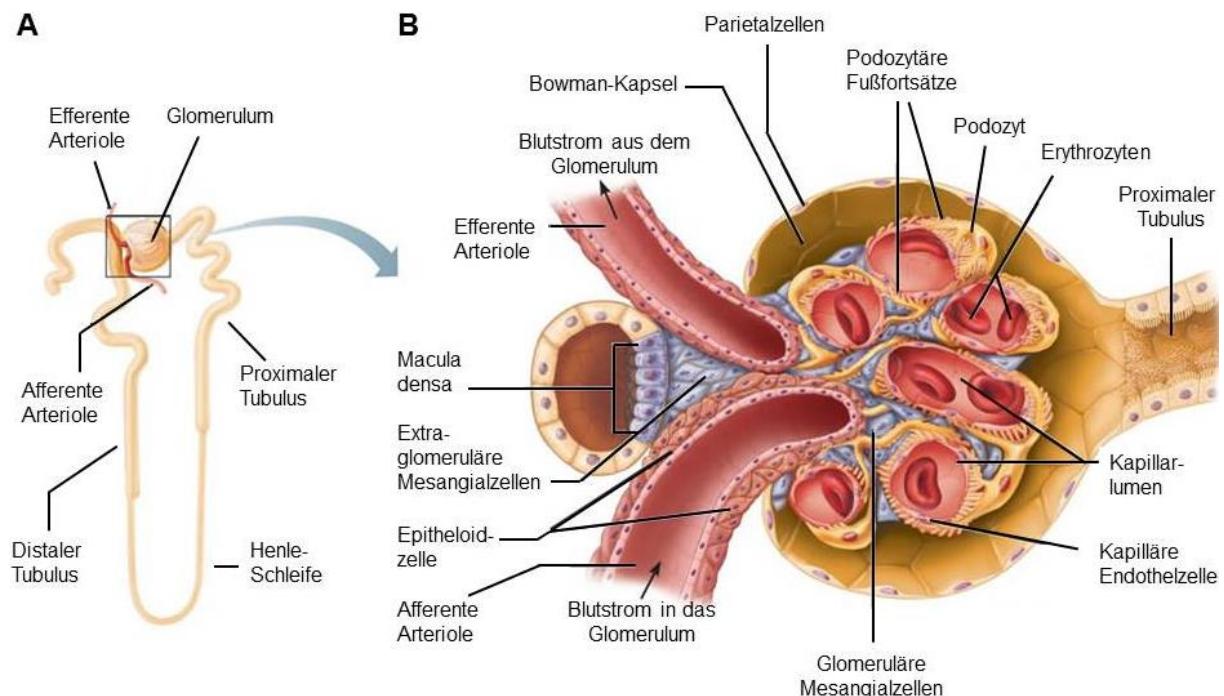


Abb. 1: Aufbau eines Nephrons und eines Glomerulums. Abb. 1A zeigt den schematischen Aufbau eines Nephrons mit dem Glomerulum und dem sich anschließenden Tubulusapparat. In Abb. 1B ist der Aufbau eines Glomerulums dargestellt. Diesem vorangeschaltet ist der juxtaglomerulärer Apparat (bestehend aus Macula densa, extraglomerulären Mesangium und afferenter bzw. efferenter Arteriole). Das von der Bowman-Kapsel umgebene Glomerulum besteht aus glomerulären Mesangialzellen, den Endothelzellen und Podozyten. Die Abbildung wurde verändert nach:
<http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio211/chap25/chap25.htm>

1.1.2 Die Entwicklung der Nieren: die Nephrogenese

Die Nephrogenese der Amnioten (Reptilien, Vögel, Säugetiere) erfolgt in drei aufeinander folgenden Entwicklungsstufen entlang eines kranio-kaudalen Gradienten. Dabei verfügen die ersten beiden Entwicklungsstufen mit dem funktionslosen Pronephros (Vorniere), [Fraser, 1950; Overton, 1959; Saxén, 1987] gefolgt vom exkretorisch aktiven Mesonephros (Urniere) über einen transitorischen Charakter, da beide zwar in der Embryogenese angelegt, im Verlauf der Entwicklung aber wieder zurückgebildet werden. Erst im letzten Entwicklungsstadium, dem Metanephros (Nachniere), entsteht die endgültige Niere [Burns, 1938; O'Rahilly und Muecke, 1972; Saxén, 1987].

In der humanen Embryogenese setzt die metanephrogene Entwicklung am 28. Tag der Schwangerschaft ein, die Nierenentwicklung ist noch *in utero* in der 38. Schwangerschaftswoche abgeschlossen [O'Rahilly und Muecke, 1972; Hoar, 1976]. Im Gegensatz dazu beginnt die murine Metanephrogenese am 11. Tag der embryonalen Entwicklung und ist mit der Geburt noch nicht abgeschlossen, so dass bis zum ca. 10. Tag *post partum* Nephronen neu gebildet werden [Hoar, 1976; Gomez et al., 1997].

1.1.2.1 Die Nephronbildung

In der Anfangsphase der metanephrogenen Entwicklung ist das Zusammenspiel des metanephrogenen Mesenchyms mit der Ureterknospe von zentraler Bedeutung. Unter der Kontrolle zahlreicher Faktoren wie beispielsweise dem GDNF (*glial-cell-line-derived neurotrophic factor*) [Sainio et al., 1997] bildet sich die Ureterknospe als Auswuchs des Wolff'schen Ganges und expandiert in Richtung des metanephrogenen Mesenchyms. Einerseits führt diese räumliche Nähe zu einer kappenförmigen Verdichtung der anfänglich locker organisierten Zellen des metanephrogenen Mesenchyms (*cap mesenchym*, kappenförmiges Mesenchym), andererseits bewirkt sie an der Spitze der Ureterknospe eine iterative Abfolge dichotomer Teilungen [Grobstein, 1953 und 1957; Saxén, 1987; Saxén und Lehtonen, 1987; Ekblom, 1989]. In Folge der etwa 15 Aufspaltungen je Ureterknospe werden die als Ampullen bezeichneten Sammelrohranlagen gebildet, wobei durch Wachstum im Bereich des Ampullenhalsses das Sammelrohrsysteem, das Nierenbecken und die Nierenkelche (vgl. Abb. 2) entstehen [Grobstein, 1955; Saxén, 1987; Neiss, 1982; Nyengaard und Bendtsen, 1992]. Das *cap mesenchym* befindet sich dorso-lateral in Relation zur Oberfläche der Spitze der Ureterknospe. Dort beginnen einzelne Zellen, die am ventral-lateral Rand dieses Kondensats lokalisiert sind, sich zum prätubulären Aggregat zu verdichten. Bei den Zellen dieses Aggregats handelt es sich um multipotente Stammzellen [Herzlinger et al., 1992; Boyle et al., 2008], die im Folgenden eine mesenchymal-epithelialen Transition durchlaufen und sich zum renalen Vesikel formieren. Die Vesikelzellen stellen den Ausgangspunkt für die Entwicklung der Epithelien sowohl im Glomerulum als auch im proximalen bzw. distalen Tubulus dar [Grobstein, 1953; Ekblom et al., 1981; Saxén, 1987; Herzlinger et al., 1992; Bard et al., 2001].

Georgas et al. [2009] konnten zeigen, dass das renale Vesikel bereits über eine Polarität verfügt, mit der die Strukturen im späteren Nephron festgelegt werden. Im Verlauf der Nephrogenese wird sich das proximale, von der Spitze der Ureterknospe am weitesten entfernte Ende, in das Glomerulum entwickeln, der distale, der Spitze der Ureterknospe zugewandte Pol hingegen wird zum distalen Tubulus differenzieren. Dem entsprechend ist die Expression von WT-1 (Wilms' tumor 1), einem Podozytenmarker, auf das das proximale Segment des renalen Vesikels beschränkt, während BMP-2 (bone

morphogenetic protein 2, Knochen-morphogenetisches Protein 2) in der Nephrogenese im distalen Abschnitt des renalen Vesikels und im fertig entwickelten Nephron im distalen Tubulus exprimiert wird [Brunskill et al., 2008; Georgas et al., 2008 und 2009]. Ferner finden bereits im frühen Stadium des renalen Vesikels die ersten Schritte für die Fusion zwischen Vesikel mit der Ureterknospe statt, wobei es zum Kontakt zwischen den Basalmembranen beider Komponenten kommt [Bard et al., 2001; Georgas et al., 2009].

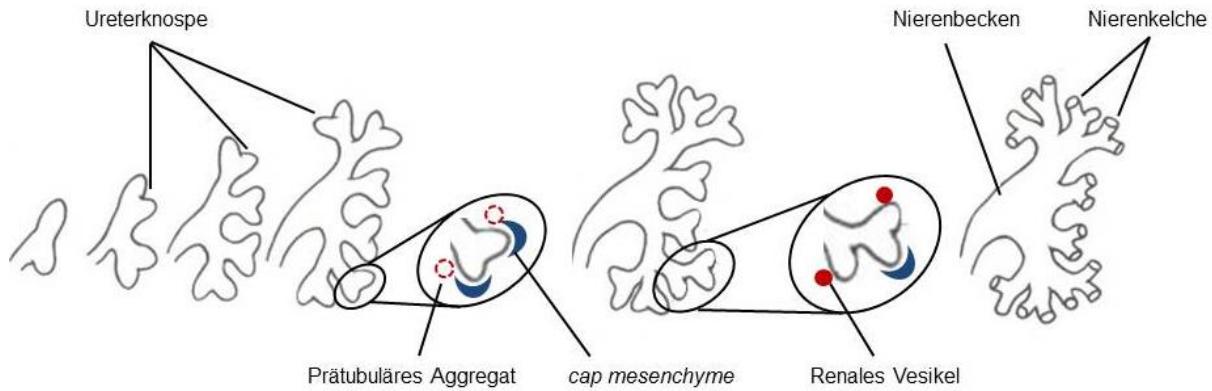


Abb. 2: Skizzenhafte Darstellung der Nierenbeckenentwicklung. Durch wiederholte dichotome Teilung der Ureterknospen entstehen das Sammelrohrsystem, die Nierenkelche und das Nierenbecken. An den Spitzen der Ureterknospen kondensiert das metanephrogene Mesenchym zum *cap mesenchyme*, wobei lateral einzelne Zellen das prätubuläre Aggregat formen, aus dem sich in der weiteren Entwicklung das renale Vesikel bildet. Die Abbildung wurde verändert nach Saxén, 1987.

Aus dem renalen Vesikel entsteht das Komma-förmige Körperchen (vgl. Abb. 3). In diesem Entwicklungsstadium, wie auch im Folgenden, dem Stadium des S-förmigen Körperchens, wurden distinkte Genexpressionsprofile der einzelnen Kompartimente nachgewiesen [Brunskill et al., 2008]. Zudem vollziehen sich im Stadium des S-förmigen Körperchens deutliche morphologische Veränderungen, die durch die Ausbildung zweier Einstülpungen gekennzeichnet sind [Saxén, 1966 und 1987]. In der Spalte am proximalen Pol bildet sich auf der proximalen Seite der Einstülpung eine Schicht von podozytären Vorläuferzellen.

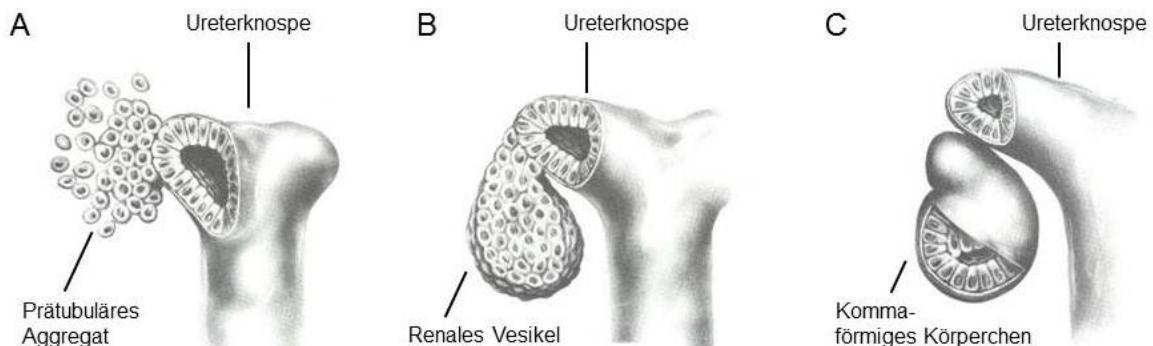


Abb. 3: Frühe Entwicklungsstadien in der Entwicklung des Nephrons. Neben der Spitze der sich dichotom teilenden Ureterknospe verdichtet sich das Mesenchym zum prätubulären Aggregat (Abb. 3A), um dann den renalen Vesikel zu formen (Abb. 3B). Dieser geht dann in das Stadium des Komma-förmigen Körperchens über (Abb. 3C). Die Abbildung wurde verändert nach Saxén, 1987.

Nach Saxén [1987] kommt es in Folge dessen zunächst zur Einwanderung endothelialer Vorläuferzellen, dann von Mesangialzellen. Damit einher geht die Entwicklung des S-förmigen Körperchens zum Kapillarschlingenstadium (vgl 1.1.2.2). Nach Verschmelzen des distalen Pols des S-förmigen Körperchens mit der Ureterknospe findet ein massives Längenwachstum (Tubuluselongation) zwischen den beiden Polen statt, wodurch proximaler und distaler Tubulus, sowie die Henle'sche Schleife gebildet werden. Da mit jeder dichotomen Teilung jeder Ureterknospe die Bildung des nächsten Nephrons induziert wird, sind die Nephrone arkadenartig miteinander verbunden [Osathanondh and Potter, 1963; Saxén, 1987]. Die Abb. 4 zeigt den schematischen Ablauf der Nephrogenese vom renalen Vesikel, das in unmittelbarer Nähe zur Ureterknospe lokalisiert, bis zu einer sich entwickelnden Nephronarkade, welche über unterschiedlich weit entwickelte Nephrone verfügt.

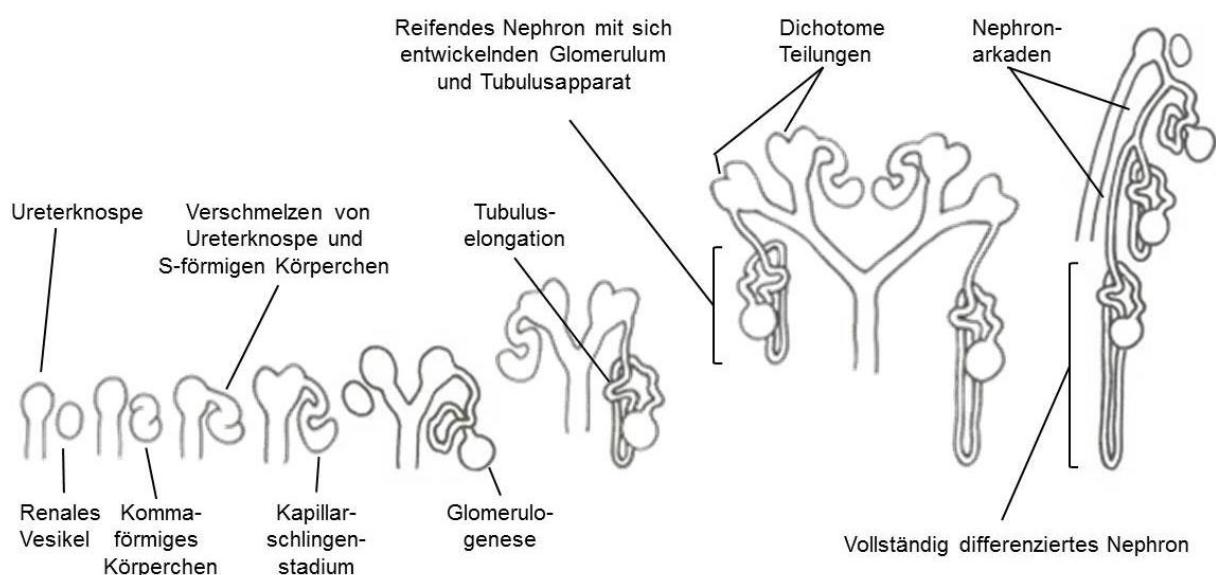


Abb. 4: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Nephrons und einer Nephronarkade. Gezeigt ist die Entwicklung des renalen Vesikels zum Komma- und S-förmigen Körperchen, das nach dem Verschmelzen mit der Ureterknospe in das Kapillarschlingenstadium übergeht. Danach kommt es proximal zur Glomerulogenese und distal zur Tubuluselongation. Durch wiederholte Teilungen entstehen die Nephronarkaden. Die Abbildung wurde verändert nach Saxén, 1987.

1.1.2.2 Glomerulogenese und Ausbildung des glomerulären Schlingenkonvoluts

Die Migration endothelialer Vorläuferzellen in die proximale Einstülpung des S-förmigen Körperchens stellt einen bedeutenden Schritt in der Glomerulogenese dar (vgl. Abb. 5). In der proximalen Spalte angekommen, beginnen die eingewanderten Endothelzellen zu proliferieren und die erste Kapillarschlinge auszuformen [Saxén, 1966 und 1987]. Dieser Prozess wird als Kapillarisation bezeichnet und durch zahlreiche Wachstumsfaktoren wie u. a. TGF- β 1 (*transforming growth factor-β1*) [Liu et al., 1999; Fierlbeck et al., 2003] und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [Kitamoto et al., 1997; Takahashi et al., 1998; Robert et al., 2000] gesteuert.

Die molekularen Grundlagen, auf denen die Kapillarisation während der Nephrogenese basiert, sind noch immer nicht vollständig erforscht. Es existieren zwei Modelle, mit denen die Entstehung des renalen Gefäßsystems erklärt wird: die Angiogenese und die Vaskulogenese. Gomez et al. [1997]

fassten diese Prozesse und ihre Bedeutung für die Nephro- und Glomerulogenese zusammen. Es ist anzunehmen, dass sowohl Angiogenese als auch Vaskulogenese in der Gefäßentwicklung eine Rolle spielen und sich nicht ausschließen [Sariola, 1991; Gomez *et al.*, 1997]. Bei der Angiogenese formen sich die Kapillaren durch Aussprossung aus bereits existierenden Blutgefäßen [Risau *et al.*, 1988]. Dabei beruht die Herkunft des renalen Gefäßsystems möglicherweise auf der embryonalen Aorta [Saxén, 1987]. Die von ihr ausgehenden Gefäße wandern der Ureterknospe folgend in das metanephrogene Mesenchym ein und stellen den Ursprungsort für die Endothelzellen dar, welche in die proximale Einstülpung des S-förmigen Körperchens migrieren [Ekblom *et al.*, 1982; Sariola *et al.*, 1983; Saxén, 1987]. Im Gegensatz dazu werden bei der Vaskulogenese Kapillaren *de novo* aus endothelialen Vorläuferzellen gebildet [Risau *et al.*, 1988]. Diese auch als Angioblasten bezeichneten Vorläuferzellen differenzieren sich aus dem Mesoderm und sind in der Lage, sich zu einfachen Blutgefäßen zu organisieren [Risau und Flamme, 1995; Abrahamson *et al.*, 1998]. Gestützt wird dieses Modell durch den Nachweis gefäßähnlicher Strukturen in unmittelbarer Nähe zu den renalen Vesikeln [Kloth *et al.*, 1994].

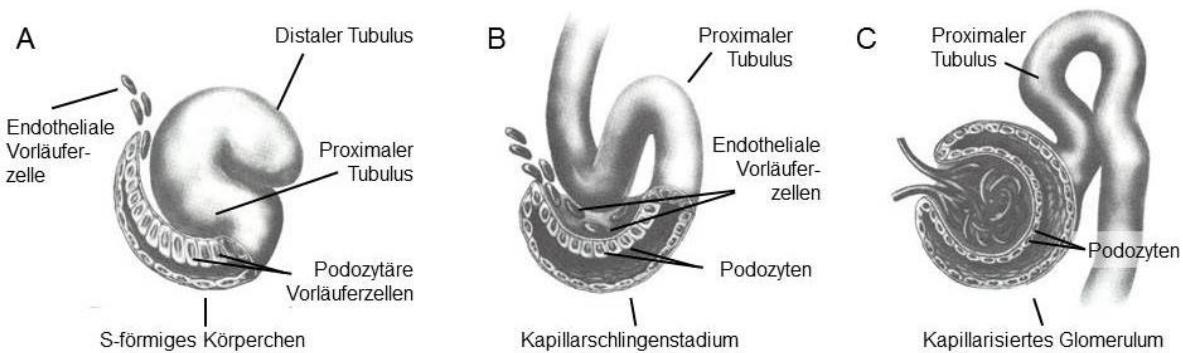


Abb. 5: Glomerulogenese vom Stadium des S-förmigen Körperchens über das Kapillarschlingenstadium bis zum kapillariserten Glomerulum. Abb. 5A zeigt ein S-förmiges Körperchen, das über podozytäre Vorläuferzellen verfügt, an die sich der spätere Abschnitt des proximalen und distalen Tubulus anschließt. In die Spalte zwischen den Vorläuferpodozyten und dem proximalen Tubulus wandern endothiale Vorläuferzellen ein. Abb. 5B zeigt das frühe Kapillarschlingenstadium mit einhergehender Tubuluselongation. Die Entwicklung des Glomulerulums ist, wie in Abb. 5C schematisch dargestellt, nach der Ausbildung des glomerulären Kapillarschlingenkonvoluts abgeschlossen. Die Abbildung wurde verändert nach Saxén, 1987.

Wie bereits beschrieben, folgt auf die Entwicklungsstufe des S-förmigen Körperchens das Kapillarschlingenstadium. Dieses ist durch eine Kapillarschlinge gekennzeichnet, die einen Kern aus zuvor eingewanderten Mesangialzellen umgibt [Ricono *et al.*, 2003]. Charakteristisch für die frühe erste Kapillarschlinge ist einerseits das Fehlen eines Lumens, da dieses anfänglich noch mit Endothelzellen gefüllt ist, und andererseits die geringe vaskulare Permeabilität und das Fehlen der Fenestrae [Reeves *et al.*, 1980]. Das offene Kapillarlumen wird durch die TGF- β 1-induzierte Apoptose der intrakapillären Endothelzellen generiert [Fierlbeck *et al.*, 2003]. Roberts und Palade [1995] konnten im Tiermodell zeigen, dass VEGF sowohl in Venolen als auch Kapillaren die Permeabilität des Endothels deutlich erhöht. Zudem bewirkte eine Injektion von VEGF in die Versuchstiere bereits nach 10 min eine Fenestrierung des Endothels. Dies geschah selbst bei den Endothelien, die unter physiologisch normalen Bedingungen keine Fenestrae besitzen. VEGF wird dabei schon von den podozytären Vorläu-

ferzellen im S-förmigen Körperchen, sowie später von differenzierten Podozyten exprimiert, während glomeruläre Endothelzellen verschiedene VEGF-Rezeptoren sowohl während Nephrogenese als auch im vollständig entwickelten Nephron exprimieren [Robert et al., 1998; Eremina und Quaggin, 2004].

Neben den bereits aufgeführten Faktoren, die die glomeruläre Entwicklung und Differenzierung kontrollieren, spielt auch PDGF-B (*platelet-derived growth factor B*) eine bedeutende Rolle in der Glomerulogenese. PDGF-B wird von den zuvor eingewanderten Endothelzellen sezerniert [Lindahl et al., 1997; Seifert et al., 1998; Hellström et al., 1999] und bewirkt den Influx der PDGF Rezeptor beta (PDGFR- β) exprimierenden Mesangialzellen [Alpers et al., 1993; Seifert et al., 1998]. Diese formieren sich im Zentrum des frühen Glomerulums zu einem Kern (vgl. Abb. 6), der von der ersten Kapillarschlinge umgeben ist [Lindahl et al., 1998; Vaughan und Quaggin, 2008]. Durch ihre Fähigkeit an die G-Domäne der Laminin- $\alpha 5$ -Kette in der GBM zu adhärieren, wird die Kapillarschlinge in mehrere Kapillaren geteilt bis das glomeruläre Schlingenkonvolut entstanden ist [Kikkawa et al., 2003]. Bei PDGF-B- bzw. PDGFR- β -defizienten Mäusen findet keine Mesangialzell-Migration in das sich entwickelnde Glomerulum statt, mit der Konsequenz, dass diese Tiere über eine ballonartig aufgeblähte und unverzweigte Kapillare im Inneren der Bowman-Kapsel verfügen [Levéen et al., 1994; Soriano, 1994; Lindahl et al., 1998].



Abb. 6: Entwicklung von der einzelnen Kapillarschlinge zum glomerulären Schlingenkonvolut. Der von den Endothelzellen produzierte Faktor PDGF bewirkt die Migration der Mesangialzellen in das sich entwickelnde Glomerulum, wodurch die Teilung der einzelnen Kapillarschlinge in das glomeruläre Schlingenkonvolut erst möglich ist. Die Abbildung wurde verändert nach Vaughan und Quaggin, 2008.

1.1.3 Das glomeruläre Mesangium

Im Glomerulum als dem Teil des Nephrons, in dem der Primärharn entsteht, wirken drei hochspezialisierte Zelltypen zusammen: Epithel-, Endothel- und Mesangialzellen. Während die beiden ersten die glomeruläre Filterbarriere formen, spielen die Mesangialzellen eine entscheidende Rolle zur Aufrechterhaltung der dauerhaften Funktionalität des glomerulären Filters. Die Mesangialzellen bilden zusammen mit der von ihnen produzierten Matrix das Mesangium und machen als glatte Muskelzell-/Perizyten-ähnliche Zellen etwa 90 % der im Mesangium befindlichen Zellen aus. Bei den restlichen Zellen handelt es sich um aus dem Knochenmark stammende, mononukleäre Phagozyten.

1.1.3.1 Aufbau des Mesangiums

Mittels 3D-Rekonstruktion konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Mesangium um ein Kontinuum handelt, das mit dem vaskulären Pol in Verbindung steht und in dem es keine isolierten Mesangialzellinseln gibt [Inkyo-Hayasaka *et al.*, 1996]. Dabei fungieren die Mesangialzellen aufgrund ihrer gegenseitigen Verbindung via *gap junctions* als ein funktionelles Synzytium, das nicht nur auf das intraglomeruläre Mesangium beschränkt ist, sondern sich über das extraglomeruläre Mesangium bis zum juxtaglomerulären Apparat erstreckt [Pricam *et al.*, 1974; Taugner *et al.*, 1978].

Innerhalb des Glomerulums lassen sich zwei extrazelluläre Matrizen identifizieren: die Matrix der GBM und die Mesangialzellmatrix. Die GBM entsteht im Lauf der Glomerulogenese durch Fusion der endo- und epithelialen Basalmembran [Reeves *et al.*, 1980; Sariola *et al.*, 1984; Abrahamson, 1985]. Die mesangiale Matrix wird von den Mesangialzellen synthetisiert und weist eine dynamische Komposition auf, die flexibel von der physiologischen Konstitution der glomerulären Zellen abhängt [Mené *et al.*, 1989; Kriz *et al.*, 1995]. Sie besteht hauptsächlich aus Fibronectin [Weiss *et al.*, 1979; Courtoy *et al.*, 1982], einem essentiellen Bestandteil von Mikrofibrillen [Schwartz *et al.*, 1985; Mundel *et al.*, 1988], Kollagen IV [Latta, 1961; Courtoy *et al.*, 1982; Desjardins und Bendayan, 1989], den Proteoglykanen Heparansulfat [Klein *et al.*, 1986; Desjardins und Bendayan, 1989] und Chondroitinsulfat [Kanwar *et al.*, 1983] sowie zu geringeren Mengen aus Laminin [Courtoy *et al.*, 1982; Desjardins und Bendayan, 1989]. Obwohl die GBM, abgesehen von Chondroitinsulfat [Kanwar *et al.*, 1983], aus denselben Komponenten [Latta, 1961; Courtoy *et al.*, 1982; Desjardins und Bendayan, 1989] zusammengesetzt ist, unterscheiden sich die beiden Matrizen. Zum einen ist die mesangiale Matrix lockerer gepackt und strukturell weniger definit. Zum anderen verfügt die GBM zwar über deutlich weniger Fibronectin, dafür über mehr Kollagen IV. Während Laminin einen Hauptbestandteil der GBM darstellt [Timpl *et al.*, 1979], beschränkt sich das Vorkommen des Proteins in der mesangialen Matrix auf die Kontaktbereiche von Mesangialzellen zur angrenzenden GBM oder benachbarten Endothel- und Mesangialzellen [Courtoy *et al.*, 1982; Desjardins und Bendayan, 1989].

1.1.3.2 Die Mesangialzelle – eine Zelle mit Perizyten-/Glatte Muskelzell-Eigenschaften

Mesangialzellen als dritter glomerulärer Zelltyp wurden erstmals 1933 von Zimmermann beschrieben. Später charakterisieren Farquhar und Palade bzw. Schlöndorff die Mesangialzelle als eigenen Zelltyp mit Perizyten-ähnlichen Eigenschaften oder als spezialisierten Perizyten, respektive [Zimmermann, 1933; Farquhar und Palade, 1962; Schlöndorff, 1987]. Perizyten bilden eine heterogene Zelltypgruppe, die einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und Stabilität von Kapillarnetzen hat [Shepro und Morel, 1993]. Sie sind in der Lage in andere mesenchymale Zelltypen wie glatte Muskelzellen [Meyrick und Reid, 1978] zu differenzieren. Von diesen unterscheiden sie sich hauptsächlich dadurch, dass sie der Stabilisierung von Mikrogefäßen dienen, während glatte Muskelzellen eher größere Blutgefäße stützen [Nehls und Drenckhahn, 1991; Hirschi und D'Amore, 1996]. Zudem sind Perizyten zusammen mit Endothelzellen, mit denen sie via *gap junctions* in Kontakt stehen [Larson *et al.*, 1987], von einer Basallamina umgeben, die sie z. T. selbst produzieren. Die letztendliche Morphologie und Funktion eines Perizyten hängt vom entsprechenden Gewebe ab [Sims, 1986; Shepro und Morel, 1993].

Innerhalb des Glomeruls lassen sich Mesangialzellen durch zahlreiche Perizyten- bzw. glatte Muskelzellmarker identifizieren. Unter diesen befinden sich Marker wie α -SMA (*smooth muscle type alpha-actin*) [Nehls und Drenckhahn, 1991], Desmin [Ishino *et al.*, 1991; Nehls *et al.*, 1992] und PDGFR- β [Alpers *et al.*, 1993; Seifert *et al.*, 1998]. Trotz der Tatsache, dass Mesangialzellen und Perizyten eine Vielzahl von übereinstimmenden Markern exprimieren, ist es immer noch umstritten, ob es sich bei Mesangialzellen tatsächlich um spezialisierte Perizyten handelt.

Die Bedeutung der Mesangialzelle zeigt sich bereits während der Glomerulogenese. Ohne diesen Zelltyp ist die Bildung des glomerulären Kapillarnetzes nicht möglich (vgl. 1.1.2.2). Aber auch nach der abgeschlossenen Nephrogenese spielen Mesangialzellen eine entscheidende Rolle für die glomeruläre Gestalt, indem sie, wie in Abb. 7 dargestellt, als Rückgrat der glomerulären Struktur fungieren. Dies wird durch Zellausläufer gewährleistet, die durch zahlreiche Bündel aus Mikrofilamenten ihre Form erhalten [Sakai und Kritz, 1987]. Die Mikrofilamente bestehen, wie bei glatten Muskelzellen, u. a. aus den kontraktilen Proteinen Aktin und Myosin [Drenckhahn *et al.*, 1990] sowie Tropomyosin und α -Aktinin [Drenckhahn *et al.*, 1990; Ishino *et al.*, 1991] und sind entweder direkt mit der GBM verbunden oder über extrazelluläre Mikrofibrillen [Sakai und Kritz, 1987; Mundel *et al.*, 1988]. Die Mikrofibrillen stellen einen Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix dar und stehen mit den Bereichen der mesangialen Zellmembran in Verbindung, wo intrazelluläre Aktinfilamente verankert sind [Mundel *et al.*, 1988].

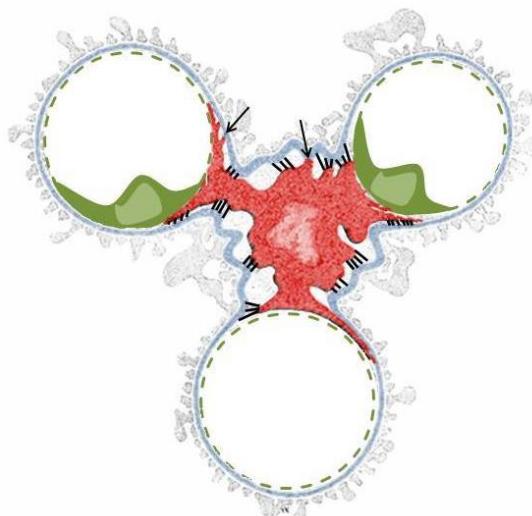


Abb. 7: Schematische Darstellung eines glomerulären Ausschnitts mit einer Mesangialzelle, die von drei Kapillaren umgeben ist. Die Mesangialzelle (rot) hat über drei Hauptzellausläufer Kontakt zu je einer Kapillare, wobei sich diese Zellausläufer weiter verzweigen und bis in den Bereich zwischen Endothelzelle (grün) und GBM (blau) expandieren. Der Kontakt zwischen der Mesangialzelle und der GBM wird entweder direkt (Pfeile) oder über extrazelluläre Mikrofibrillen (schwarz) hergestellt. Die Podozyten sind in grau dargestellt. Die Abbildung wurde verändert nach Sakai und Kritz, 1987.

Die Mikrofibrillen bilden ein dichtes, aber unverzweigtes Netz, das die Mesangialzelle mit der *lamina densa* der GBM verbindet. An den Stellen, wo das Kapillarendothel auf eine Mesangialzelle trifft („mesangial angle“), erstrecken sich die mesangialen Zellfortsätze bis in den subendothelialen Raum. Während die Mikrofibrillen im übrigen Mesangium in keiner bestimmten Orientierung angeordnet sind,

verlaufen sie im perikapillaren Raum tangential zur glomerulären Kapillare [Sakai und Kritz, 1987; Mundel et al., 1988; Kriz et al., 1995]. Zur weiteren Stabilisierung tragen Bereiche bei, die als „mesangial loop“ bezeichnet wurden. Hier ist die Kapillare ausschließlich von Mesangialzellen umgeben [Inkyo-Hayasak et al., 1996].

Mesangialzellen verfügen wie glatte Muskelzellen über zahlreiche kontraktile Proteine (vgl. 1.1.3.1), wobei es allerdings Unterschiede hinsichtlich der Expression bestimmter Isoformen wie z. B. bei Myosin [Nakai et al., 1995] und Tropomyosin [Ishino et al., 1991] gibt. Zudem reagieren beide Zelltypen auf Kontraktion- bzw. Relaxation-induzierende Hormone. Die mesangiale Zellkontraktion ist Resultat eines spannungsabhängigen Ca^{2+} -Influx aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Cytoplasma, vermittelt durch Faktoren wie Endothelin [Badr et al., 1989; Simonson und Dunn, 1990 und 1991], Angiotensin II (Ang II) [Bianchi et al., 1986; Okuda et al., 1986; Takeda et al., 1988] oder Vasopressin [Bonventre et al., 1986; Okuda et al., 1986]. In Folge der Mesangialzell-Kontraktion kommt es zu einer Abnahme der Kapillaroberfläche, was sowohl einen Rückgang der glomerulären Filtrationsrate als auch eine Erhöhung des Blutdrucks zur Konsequenz hat [Stockand und Sansom 1998]. Als Antagonisten der Kontraktion fungieren u. a. der atriale natriuretische Faktor [Ballermann et al., 1985; Bianchi et al., 1986; Cogan 1986] und Stickstoffmonoxid [Shultz et al., 1990; Tsukahara et al., 1994].

1.1.3.3 Phagozytose im Mesangium

Mesangialzellen ähneln in ihren Zellmerkmalen nicht nur Perizyten, sondern verfügen auch über phagozytische Eigenschaften [Farquhar und Palade, 1962]. Dabei muss in diesem Zusammenhang zwischen klassisch phagozytierenden Zellen, wie Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen, und semiprofessionellen Phagozyten unterschieden werden. In der Tat konnte gezeigt werden, dass ein Teil der residenten glomerulären Zellen über das Ia-Antigen verfügt, ein Zelloberflächenprotein, welches im Genlokus des MHC-2 (*major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex) kodiert wird [Schreiner und Cortan, 1982]. Diese Zellen exprimieren zu einem Fc-Rezeptoren (*crystallisable fragment*, kristallisierbares Fragment), mit denen Immunglobuline gebunden werden können, zum anderen haben sie phagozytische Eigenschaften [Schreiner et al., 1981]. Allerdings handelt es sich hier nicht um endogene Nierenzellen, sondern um aus dem Knochenmark stammende, mononukleäre Phagozyten, die ca. 5 bis 15 % der mesangialen Zellpopulation ausmachen [Gurner et al., 1987; Schreiner, 1992]. Bei den „typischen“ Mesangialzellen, die das Gros der Zellen im Mesangium ausmachen, handelt es sich um semiprofessionelle Phagozyten. Dabei endozytieren Mesangialzellen entgegen früherer Meinung [Striker et al., 1979] nicht nur Makromoleküle und Immunkomplexe [Sedor et al., 1987; Singhal et al., 1987 und 1990]. *In vitro*-Experimente legten auch dar, dass sie wie auch vaskuläre glatte Muskelzellen [Bennett et al., 1995] in der Lage sind, apoptotische Nachbarzellen zu phagozytieren [Hughes et al., 1997; Cortes-Hernandez et al., 2002].

1.2 Chemokine

Als "chemotaktische Cytokine" gehören Chemokine einer Superfamilie von ca. 50 Molekülen an, die sich basierend auf Position und Anordnung konservierter Cystein-Reste (C) in vier Unterfamilien gliedern lassen. Dabei differenziert man zwischen der CC-, CXC- [Oppenheim *et al.*, 1991], CX3C- [Bazan *et al.*, 1997] und XC- [Kelner *et al.*, 1994] Familie. Bei allen Familien mit Ausnahme der XC-Familie wird zwischen dem ersten und dritten bzw. zweiten und vierten dieser Cysteine eine Disulfidbrücke gebildet. Entscheidend für die Einteilung ist die Anzahl der Aminosäuren (X), die sich zwischen den ersten beiden Cysteinen im N-Terminus befinden. Ein weiteres Charakteristikum, das allen Chemokinen zu eigen ist, stellt ihre geringe Länge von 70 bis 125 Aminosäuren und damit ihr relativ niedriges Molekulargewicht von 6 bis 14 kDa dar. Die Chemokin-Signalübertragung kann je nach Ligand über einen oder mehrere Rezeptoren verlaufen. Gleichzeitig kann ein Rezeptor nur einen bzw. mehrere Chemokinliganden binden [Mackay, 1997; Rollins, 1997; Rossi und Zlotnik, 2000].

Chemokinrezeptoren gehören ihrerseits der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) mit sieben Transmembranhelices an. Die Interaktion eines Chemokins mit seinem membranständigen Rezeptor an der Zelloberfläche kann verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden in Gang setzen, die mit der Spaltung des Rezeptor-assoziierten G-Proteins in die G_{α} - und $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten beginnen. In einem der über die G_{α} -Untereinheit induzierten Signalwege wird die Kaskade mittels der Phospholipase C-vermittelten Bildung der *second messenger* Inositol-(1,4,5)-Triphosphat und Diacylglycerin weitergeleitet, was schließlich über die Freisetzung von intrazellulären Ca^{2+} bzw. Aktivierung der Proteinkinase C zur Phosphorylierung zahlreicher Proteine führt. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern über die Kontrolle der Genexpression zahlreiche zelluläre Prozesse wie Proliferation, Migration oder Apoptose steuern. Neben diesem können noch weitere Signalwege u. a. über die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit beschritten werden [Wu *et al.*, 1993; Murphy, 1994; Bokoch, 1995].

1.2.1 Chemokine als Dirigenten der Leukozytenmigration

Chemokine spielen aufgrund ihrer chemotaktischen Wirkung auf Immunzellen eine entscheidende Rolle in der Leukozytenrekrutierung. Diese kann in Folge einer Entzündungsreaktion oder konstitutiv zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase erfolgen. In beiden Fällen führt die Interaktion des betreffenden Chemokins mit seinem Rezeptor zu einer gerichteten Migration der Zielzelle zum Ort der Entzündung bzw. in eines der sekundären lymphatischen Organe.

1.2.1.1 Leukozytenrekrutierung unter inflammatorischen Bedingungen

Einen entscheidenden Schritt hin zur gerichteten Immunantwort stellt die Sezernierung von Chemokinen dar. Dies geschieht in Folge eines inflammatorischen Stimulus wie beispielsweise bakterieller Produkte sowohl in Organen und Geweben [Colditz und Movat, 1984; Warner und Libby, 1989] als auch durch aktivierte Leukozyten [Yoshimura *et al.*, 1987; Wolpe *et al.* 1988]. Dabei entsteht ein loka-

ler Chemokingradient, dessen Konzentration am Ort der Entzündung am höchsten ist [Oppenheim *et al.*, 1991; Lawrence und Springer, 1991; Springer, 1994; Rollins, 1997]. Die Aufrechterhaltung dieses Gradienten wird durch Bindung der Chemokine an Heparansulfatproteoglykane bewirkt, welche ihrerseits in der extrazellulären Matrix von kapillären Endothelzellen oder verschiedenen Geweben vorhanden sind [Tanaka *et al.*, 1993; Luster *et al.*, 1995]. Leukozyten (vgl. Abb. 8), die sich im Blutkreislauf befinden, zirkulieren in den Gefäßen in Form einer Selektin-vermittelten rollenden Bewegung („*rolling circle*“) entlang des Endothels [Atherton und Born, 1972; Bevilacqua *et al.*, 1987; Lawrence und Springer, 1991; Ley *et al.*, 1991]. Kommt es im Verlauf dieser Bewegung zur Interaktion zwischen den Chemokinrezeptoren auf der Leukozyten-Zelloberfläche mit ihren Liganden, führt dies zu einer Aktivierung des Leukozyten [Rot *et al.*, 1992; Murphy, 1994; Bokoch, 1995] mit der Folge, dass der Leukozyt entsprechend des aufsteigenden Chemokingradienten in Richtung des inflammatorischen Stimulus migriert [Zigmond, 1974; Issekutz *et al.*, 1981; Schall *et al.*, 1990].

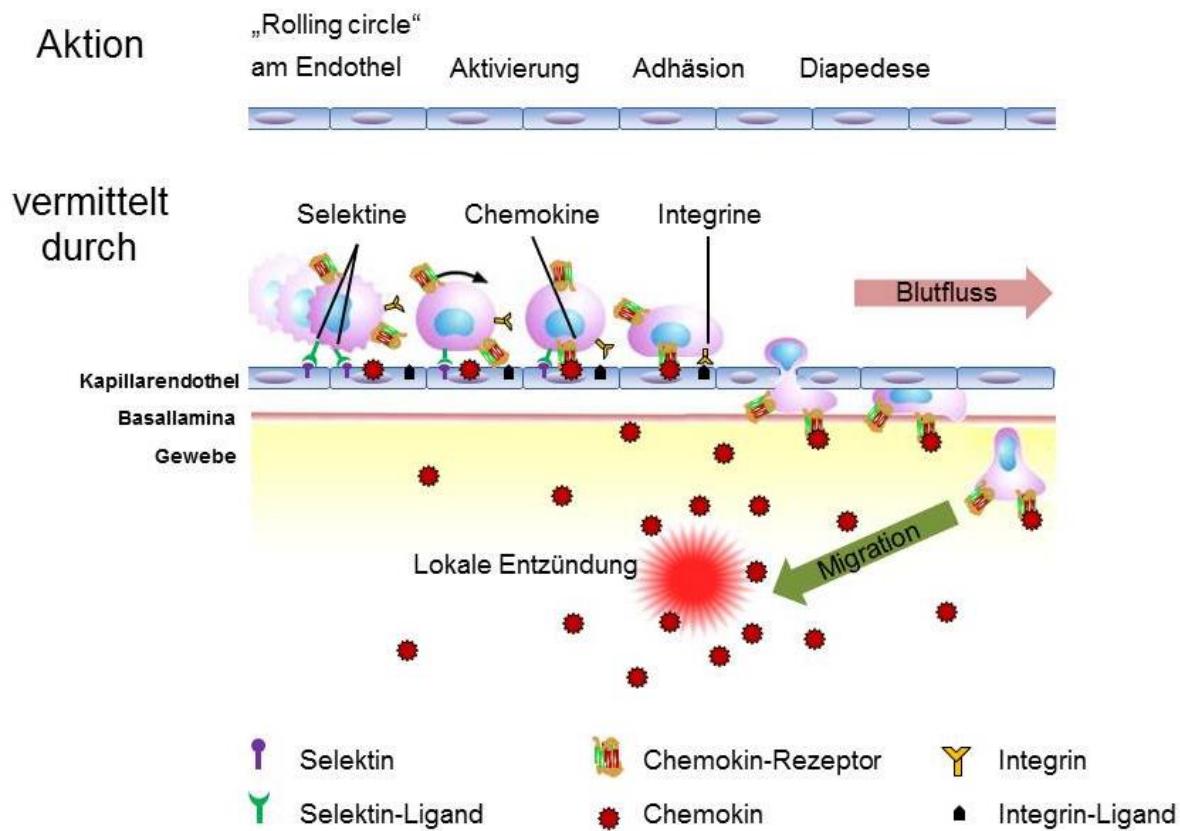


Abb. 8: Mehrstufiger Ablauf der Leukozytenrekrutierung in entzündetes Gewebe. Am Ort einer lokalen Entzündung werden Chemokine (rot) sezerniert, die durch das Gewebe bis zur Kapillare wandern, um dort an die Endotheloberfläche zu binden. Endothelzellen exprimieren verschiedene Selektine (lila) und Integrinliganden (schwarz). Lymphozyten ihrerseits produzieren verschiedene Zelloberflächenmoleküle, wie Selektinliganden (grün), die mit dem entsprechenden Selektin auf dem Endothel interagieren und so eine rollende Bewegung am Kapillarendothel entlang ermöglichen. Chemokinrezeptoren (grün/rot), die nach Bindung ihres Liganden den Lymphozyten aktivieren, und schließlich Integrine (gelb), die nach vorangegangener Aktivierung durch Wechselwirkung mit den Integrinliganden eine feste Adhäsion des Lymphozyten an das Endothel bewirken. In Folge dessen kommt es zur Diapedese der Immunzelle aus der Kapillare in das Gewebe und zur weiteren Chemokin-vermittelten Migration zum Ort der Entzündung. Die Abbildung wurde verändert nach Muller, 2002.

Bei dieser gerichteten Migration in Richtung der lokalen Entzündung muss der Leukozyt das Blutgefäß verlassen. Dazu werden im Zuge der Leukozytenaktivierung die Adhäsionseigenschaften der Immunzelle so verändert [Tanaka *et al.*, 1993; Lloyd *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 1998; Constantin *et al.*, 2000], dass diese zunächst auf dem Endothel arretiert und schließlich in einem als Extravasation oder Diapedese bezeichneten Prozess die Kapillare verlässt und über das Endothel in das entzündete Gewebe einwandert [Florey und Grant, 1961; Huber *et al.*, 1991; Greenwood *et al.*, 1995; Engelhardt und Wolburg, 2004]. Entscheidend für den Leukozytenarrest und die Diapedese ist das Zusammenspiel von Integrinen mit ihren Liganden. Die vorangegangene Chemokin-vermittelte Aktivierung des Leukozyten erlaubt nun eine Signaltransduktion über membranständige Integrine wie beispielsweise LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen 1*) [Sanchez-Madrid *et al.*, 1982; Van Epps *et al.*, 1989] und VLA-4 (*very late antigen 4*), [Hemler *et al.*, 1987; Elices *et al.*, 1990] welche dann ihre Liganden ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule 1*) [Horley *et al.*, 1989; Diamond *et al.*, 1991] bzw. VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) [Osborn *et al.*, 1989; Carlos *et al.*, 1990] binden können.

1.2.1.2 Chemokin-abhängige Leukozytenmigration zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase

Chemokine entfalten ihre chemoattraktive Wirkung auf Leukozyten nicht nur unter inflammatorischen Bedingungen sondern auch in Geweben zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase mittels konstitutiver Expression auf verschiedenen Immunzellen bzw. lymphoiden Organen.

a) Beteiligte Zellen und deren Expressionsorte

Von entscheidender Bedeutung sind dabei die Chemokinrezeptoren CXCR5 [Dobner *et al.*, 1992; Kaiser *et al.*, 1993] und CCR7 [Birkenbach *et al.*, 1993; Schweickart *et al.*, 1994; Burgstahler *et al.*, 1995], die in diesem Zusammenhang auf verschiedenen Immunzellen exprimiert werden. CXCR5 bindet den Chemokinliganden CXCL13 [Gunn *et al.*, 1998 (a); Legler *et al.*, 1998], während CCR7 mit CCL19 [Rossi *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1997] und CCL21 [Nagira *et al.*, 1997; Hromas *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1998] wechselwirkt. Die genannten Chemokine werden ihrerseits u. a. von sekundären lymphatischen Geweben exprimiert.

CXCR5 wurde hauptsächlich auf B-Zellen nachgewiesen [Dobner *et al.*, 1992; Ansel *et al.*, 2000], während CCR7 sowohl auf naiven (antigenunerfahrenen) T-Zellen als auch auf einer Untergruppe von Gedächtnis-T-Zellen [Nagira *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1999], sowie auf reifenden dendritischen Zellen (*dendritic cell, DC*) [Sallusto *et al.*, 1998; Yanagihara *et al.*, 1998] und in geringerem Maße auch auf B-Zellen [Nagira *et al.*, 1998; Reif *et al.*, 2002] detektiert wurde. CXCL13 konnte auf Stromazellen in der B-Zellzone sekundärer lymphatischer Organe lokalisiert werden [Gunn *et al.*, 1998 (a)], CCL19 und CCL21 hingegen auf Stromazellen in der T-Zellzone [Nagira *et al.*, 1998; Willimann *et al.*, 1998; Luther *et al.*, 2000]. Einen weiteren Expressionsort für CCL19 stellen DCs in der T-Zellzone des Lymphknotens, dem Parakortex, dar [Ngo *et al.*, 1998], sowie im Fall von CCL21 Endothelzellen in hochendothelialen Venolen (*high endothelial venule, HEV*) [Gunn *et al.*, 1998 (b)] und lymphatischen Gefäßen [Tal *et al.*, 2011]. Allerdings ist CCL21 auf mRNA-Ebene nur bei murinen nicht aber humangen HEVs detektierbar [Carlsen *et al.*, 2005]. Beide Liganden können jedoch via Transzytose vom Lymphknoten-Stroma auf die apikale HEV-Seite gelangen [Stein *et al.*, 2000; Baekkevold *et al.*, 2001].

b) Rolling-circle, Adhäsion, Diapedese und Migration

Mittels CCR7 und seinen Liganden CCL19 und CCL21 werden sowohl naive T-Zellen (Lymphozyten-Homing) als auch reifende Antigen-präsentierende DCs in die T-Zellzone sekundärer lymphatischer Organe dirigiert, damit dort die beiden Leukozytentypen miteinander in Kontakt treten und sich so naive T-Zellen zu Effektor-T-Zellen weiterentwickeln können [Förster et al., 1999; Braun et al., 2011]. Dieser Prozess wird im Folgenden anhand der Leukozytenrekrutierung naiver T-Zellen und reifender DCs in die Lymphknoten erläutert und ist in Abb. 9 in Teilen schematisch dargestellt.

Die Rekrutierung naiver im Blutkreislauf zirkulierender T-Zellen in sekundäre lymphatische Organe, die wie die Lymphknoten und Peyer'schen Plaques über HEVs verfügen, beruht wie die Leukozytenrekrutierung unter inflammatorischen Bedingungen (vgl. 1.2.1.1) auf dem korrekten Ablauf der *rolling circle*-Bewegung der Lymphozyten entlang der Endothelzellen, sowie ihrer Aktivierung, der Adhäsion an und der Diapedese durch das Endothel. Die *rolling circle*-Bewegung der naiven T-Zelle steht dabei unter der Kontrolle von Selektin-Liganden, die nur auf der Zelloberfläche des spezialisierten hohen Venolenendothels [Girard und Springer, 1995] exprimiert werden. Zu diesen Liganden zählen u. a. GlyCAM-1 (*glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*) [Kikuta und Rosen, 1994] und MAdCAM-1 (*mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*) [Berg et al., 1993], die über Interaktion mit dem leukozytär konstitutiv exprimierten L-Selektin [Gallatin et al., 1983; Griffin et al., 1990] den ersten Kontakt zwischen Immunzelle und Endothel vermitteln.

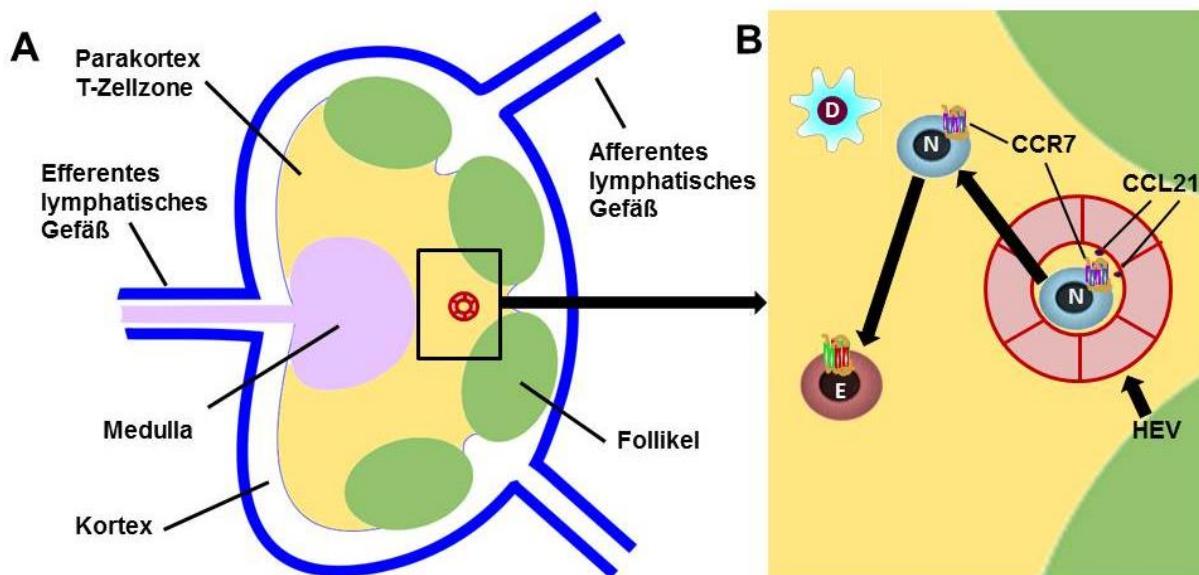


Abb. 9: Rekrutierung einer naiven T-Zelle in die T-Zellzone eines Lymphknotens. Abb. 9A zeigt schematisch den Aufbau eines Lymphknotens. Die Lympflüssigkeit gelangt über afferente lymphatische Gefäße in bzw. über efferente lymphatische Gefäße aus den Lymphknoten hinaus. Zentral liegt die Medula, die von der T-Zellzone, dem Parakortex umgeben ist. Zwischen Parakortex und Kortex befinden sich die als B Zellzone bezeichneten Follikel. Der Lymphknoten ist von speziellen Blutgefäßen mit hohem Endothel (high endothelial venules, hochendothiale Venolen) durchzogen. Abb. 9B stellt die Migration einer naiven T-Zelle (blau, N) nach Interaktion des Chemokinrezeptors CCR mit seinem Oberflächen-exponierten Liganden CCL21 aus der Venole (rot) in die T-Zellzone (gelb) dar. Nach Interaktion der naiven T-Zelle mit einer DC (türkis, D) differenziert die naive T-Zelle zu einer Effektor T Zelle (dunkelrot, E).

Ohne diesen Kontakt ist der folgende Schritt im Lymphozyten-*Homing* – die CCL21-vermittelte Aktivierung des naiven T-Lymphozyten – massiv beeinträchtigt [Arbonés *et al.*, 1994]. Dieser erfolgt mittels Signaltransduktion durch Interaktion des Chemokins mit seinem lymphozytär exprimierten Rezeptor CCR7 [Nakano *et al.*, 1997; Gunn *et al.*, 1998 (b); Nakano *et al.*, 1998; Gunn *et al.*, 1999; Vassileva *et al.*, 1999; Stein *et al.*, 2000]. CCL21 wird seinem Rezeptor durch Oberflächen-exponierte Bindung an Heparansulfat [Tanaka *et al.*, 1993; Luster *et al.*, 1995] präsentiert. Aber auch der zweite CCR7-Ligand, CCL19, lokalisiert auf der apikalen Zelloberfläche der HEVs und trägt zum effizienten T-Zell-*Homing* bei [Baekkevold *et al.*, 2001]. Heparansulfat wird u. a. von den hohen Endothelzellen in den Lymphknotenvenolen synthetisiert und stellt einen Bestandteil der apikalen ECM dar [Tsuboi *et al.*, 2013]. Neben diesem exprimieren HEVs auch konstitutiv die Liganden ICAM-1 und ICAM-2 [Girard und Springer, 1995; Sasaki *et al.*, 1996]. Solange sich die Immunzelle lediglich in der *rolling circle*-Bewegung befindet, ist ein Kontakt zwischen dem Rezeptor LFA-1 und seinen Liganden irrelevant. Eine vorangegangene Chemokin-vermittelte Aktivierung jedoch führt binnen kürzester Zeit zu einer Konformationsveränderung von LFA-1 mit der Konsequenz, dass der Rezeptor nun hochaffin auf seine Liganden reagiert. In Folge dessen kommt es augenblicklich zum Arrest des Lymphzyten am Endothel [Lawrence und Springer; 1991; Campbell *et al.*, 1998; Warnock *et al.*, 1998; Shamri *et al.*, 2005; Boscacci *et al.*, 2010]. Die anschließende Diapedese wird einerseits dadurch ermöglicht, dass ICAM-1 nicht nur apikal sondern auch basolateral auf den Zelloberflächen der HEVs präsentiert wird [Oppenheimer-Marks *et al.*, 1991]. Andererseits unterliegt die Bindungsaffinität von Ligand und Rezeptor dem sich wiederholenden Konformationswechsel von LFA-1. Dabei wird im Zuge von Adhäsion und Deadhäsion von LFA-1 [Morin *et al.*, 2008] lokal die Rezeptor-Liganden-Bindung mehrfach abwechselnd verstärkt und gelockert, um der Immunzelle eine sukzessive Passage durch das Endothel zu erlauben [Shulman *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010]. Im Verlauf jenes Prozesses verliert der T-Lymphozyt seine runde Form und flacht zunehmend ab (vgl. Abb. 10), wobei immer mehr Zellausläufer für die Extravasation entstehen [Shulman *et al.*, 2009].

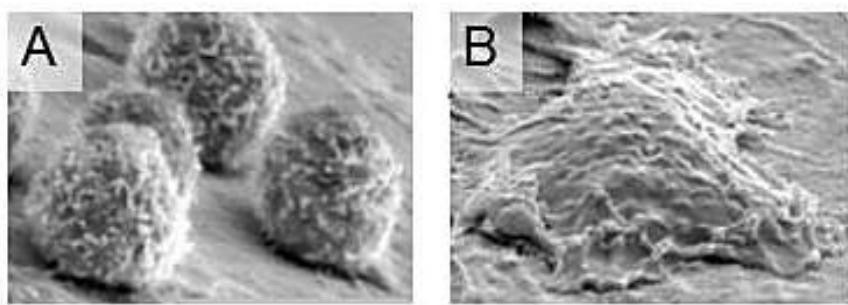


Abb. 10: Lymphozyten-Adhäsion. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Lymphozyten, die sich, vgl. Abb. 10A, in der *rolling circle*-Bewegung befinden, bzw., wie in Abb. 10B gezeigt, von einem stark abgeflachten an das Endothel adhärierenden Lymphozyten. Die Abbildung wurde verändert nach Barreiro und Sánchez-Madrid, 2009.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Immunzelle umso stärker polarisiert, je höher die CCL21-Konzentration ist [Stachowiak *et al.*, 2006]. Die Extravasation scheint sowohl auf trans- als auch parazelluläre Weise möglich [Anderson und Anderson, 1976; Indrasingh *et al.*, 2002; Engelhardt und Wol-

burg, 2004]. Nach Verlassen der HEV befindet sich die naive T-Zelle im Parakortex des Lymphknotens. Dessen Organisation beruht auf speziellen Stromazellen, den fibroblastischen Retikulumzellen (*fibroblastic reticular cells*, FRC). Diese bilden einerseits durch Synthese von Kollagenfasern und weiteren ECM-Komponenten das dreidimensionale retikuläre Netzwerk [Gretz *et al.*, 1996]. Andererseits exprimieren sie sowohl zahlreiche Adhäsionsmoleküle [Mueller und Germain, 2009] als auch CCL19 und CCL21 [Luther *et al.*, 2000]. Für die eingewanderte T-Zelle fungieren die FRC-Fasern dieses Netzwerks als Hauptverkehrswege, entlang derer sie im Parakortex zirkulieren (vgl. Abb. 11).

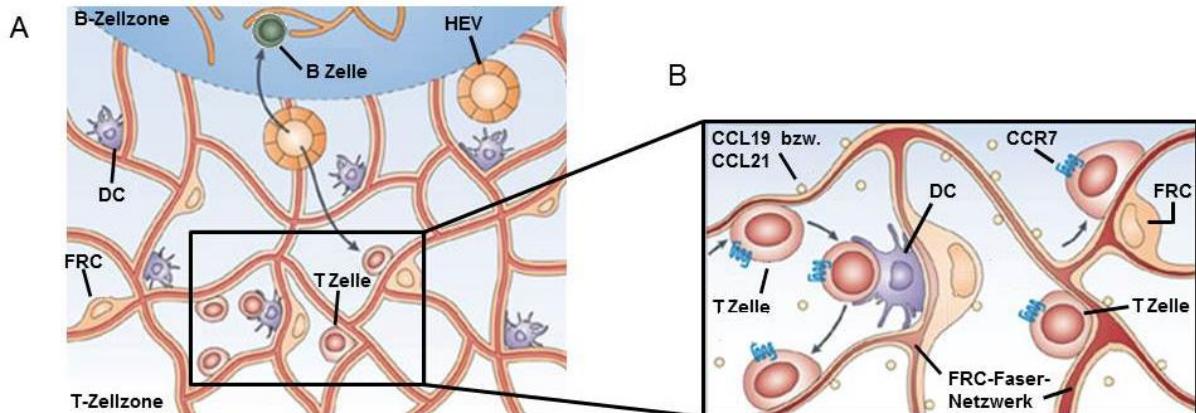


Abb. 11: Lymphozytenmigration entlang des retikulären Netzwerks im Lymphknoten. Abb. 11A zeigt einen Ausschnitt aus einem Lymphknoten mit B-Zellzone (dunkelblau unterlegt) und T-Zellzone (hellblau unterlegt). Letztere ist von HEVs durchzogen. In Abb. 11B ist ein vergrößerter Bereich von Abb. 11A gezeigt: Naive T-Zellen (rot) wandern (geschwungene Pfeile) entlang des FRC-Faser-Netzwerks geleitet von CCL19 bzw. CCL21 (gelbe Kreise). Dabei kommen sie in Kontakt mit DCs (lila) als Antigen-präsentierende Zellen. Die Abbildung wurde verändert nach Mueller und Germain, 2009.

Für die Migration innerhalb der T-Zellzone scheinen die Integrine LFA-1 und VLA-4 jedoch deutlich weniger von Bedeutung zu sein [Woolf *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2010] als CCR7 und seine Liganden: Im Mausmodell zeigten CCR7-defiziente ($CCR7^{-/-}$) Spender-T-Zellen, die in WT-Tiere transferiert wurden und dort in den Parakortex wanderten, eine deutlich reduzierte Migrationsgeschwindigkeit [Okada und Cyster, 2007; Worbs *et al.*, 2007]. Zudem ist auch die generelle Art der Lymphozytenbewegung betroffen, da sich $CCR7^{-/-}$ -T-Zellen weniger linear bewegen [Huang *et al.*, 2007]. Die Interaktion von CCR7 mit seinen Liganden führt bei der Immunzelle nicht nur zu einem gesteigerten Migrationstempo, sondern auch zu einem längeren Aufenthalt im Lymphknoten [Pham *et al.*, 2008] und damit letztendlich zum Überleben [Link *et al.*, 2007]. Sie verhindert außerdem, dass der Lymphozyt die T-Zellzone in die B-Zellzone oder die Medulla verlässt [Nakano *et al.*, 1998; Förster *et al.*, 1999; Bajenoff *et al.*, 2006; Asperti-Boursin *et al.*, 2007; Pham *et al.*, 2008].

c) T-Zellaktivierung durch eingewanderte dendritische Zellen

Sinn und Zweck des T-Zell-*Homings* ist die Aktivierung des naiven T-Lymphozyten. Dieser Prozess verläuft über den direkten Kontakt der naiven T-Zelle mit einer Antigen-präsentierenden Zelle (*antigen presenting cell*, APC). Dabei ist das Mitwirken zahlreicher weiterer Oberflächenmoleküle auf beiden Zelltypen erforderlich [Huang *et al.*, 2012]. In Folge der Aktivierung beginnt die naive T-Zelle zu proliferieren und in Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen zu differenzieren, die das sekundäre lymphoide Organ

verlassen. In den Zielorganen führt die Exposition des entsprechenden Antigens zur Ausschüttung cytotoxischer Cytokine oder zur Induktion der Apoptose der infizierten Zelle [Zehn *et al.*, 2012].

Zu den klassischen APCs zählen DCs und Makrophagen. Die Rolle der DCs konnte anhand von Langerhans-Zellen charakterisiert werden, die in der Epidermis lokalisierten, dort Antigene aufnehmen und diese prozessieren. Dieser Vorgang resultiert in der Differenzierung der Langerhans-Zellen zu antigenpräsentierenden DCs, die im Zuge dieses Prozesses vom Gewebe über die lymphatischen Gefäße in die T-Zellzone der Lymphknoten migrieren [Silberberg-Sinakin *et al.*, 1976; Kupiec-Weglinski *et al.*, 1988; Romani *et al.*, 1989]. Gleichzeitig ändert sich in Folge dessen das dendritische Chemokinrezeptor-Expressionsmuster, so dass anstelle von CCR1 und CCR5 nun vermehrt CCR7 gebildet wird [Dieu *et al.*, 1998; Sozzani *et al.*, 1998; Tal *et al.*, 2011]. Dies erlaubt eine effektive Reagibilität der Immunzellen gegenüber dem CCR7-Liganden CCL21, welcher immobilisiert an der Basalmembran der initialen Lymphgefäß lokalisiert [Tal *et al.*, 2011]. Damit ermöglicht die CCL21-CCR7-Wechselwirkung zunächst den Eintritt der DCs in die lymphatischen Gefäße und schließlich die weitere Wanderung in den Parakortex [Gunn *et al.*, 1999; Britschgi *et al.*, 2010; Braun *et al.*, 2011]. Im retikulären Netzwerk des Lymphknoten Stomas akkumulieren bevorzugt aus der Peripherie eingewanderte DCs [Bajenoff *et al.*, 2006]. Dort reduzieren sie ihre Migrationsgeschwindigkeit deutlich [Lindquist *et al.*, 2004]. Sie adhärieren einerseits an das FRC-Faser-Netzwerk und präsentieren andererseits naiven T-Zellen, die entlang des retikulären Geflechts wandern, ihre Antigene [Katakai *et al.*, 2004 (a) und (b)]. Vermutlich wird die Interaktion zwischen T-Lymphozyt und DC noch dadurch verstärkt, dass DCs im Parakortex CCL19 exprimieren und so eine chemoattraktive Wirkung auf CCR7-positive T-Zellen ausüben [Ngo *et al.*, 1998]. Dennoch scheint die Bindung von CCL19 an CCR7 nicht obligatorisch zu sein, da auch in CCL19^{-/-}-Mäusen eine T-Zellaktivierung festgestellt werden konnte [Britschgi *et al.*, 2010].

1.2.2 Chemokine als Schlüsselmoleküle weiterer Funktionen

Neben ihrer Bedeutung für die Rekrutierung von Immunzellen (vgl. 1.2.1) konnten mit zahlreichen Studien und Experimenten weitere Funktionen für Chemokine und ihre Rezeptoren beschrieben werden. Damit ist das Wirkungsspektrum dieser Moleküle nicht nur auf Zellen und Gewebe des Immunsystems beschränkt, sondern lässt sich auf viele (patho-) physiologische Prozesse erweitern. In Abb. 12 ist zusammenfassend dargestellt, an welchen biologischen Abläufen Chemokine und Chemokinrezeptoren beteiligt sind.

Wie vielfältig der Einflussbereich der Chemokine ist, zeigen Arbeiten, in denen die chemotaktischen Cytokine als positive bzw. negative Regulatoren der Angiogenese beschrieben wurden. So konnte die proangiogenetische Wirkung der Chemokine CXCL1, 2, 3, 5, 8 und 12 gezeigt werden [Koch *et al.*, 1992; Strieter *et al.*, 1992 und 1995 (b); Tachibana *et al.*, 1998], während CXCL4, 9 und 10 inhibitorisch auf die Angiogenese wirken [Strieter *et al.*, 1995 (a) und (b)]. 2001 konnten Müller *et al.* zeigen, dass die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4 die Metastasen-Bildung von malignen Brusttumoren begünstigen. Ursache ist die Expression der Rezeptoren auf Brustkrebszellen, während gleichzeitig die entsprechenden Liganden CCL21 bzw. CXCL12 besonders in den Geweben zu finden sind, die die ersten Zielorte der Metastasierung darstellen [Müller *et al.*, 2001]. Außerdem spielen die Chemo-

kinrezeptoren CCR5 [Dean *et al.*, 1996] bzw. CXCR4 [Feng *et al.*, 1996] als Co-Rezeptoren eine entscheidende Rolle beim Eintritt des HI-Virus in die Wirtszelle [Berger *et al.*, 1999].

Auch an Entwicklungsprozessen sind Chemokine in vielfältiger Weise beteiligt. So konnte im Mausmodell die Bedeutung der Rezeptor-Ligand-Paare CXCR5-CXCL13 [Ansel *et al.*, 2000] und CCR7 mit seinen Liganden CCL19 und CCL21 für die Entwicklung sekundärer lymphoider Organe beschrieben werden. Während eine CXCR5-Defizienz eine veränderte Architektur der B-Zellfollikel in Milz und den Payer'schen Plaques nach sich zieht [Fürster *et al.*, 1996], führt die Abwesenheit von CCR7 zum Fehlen der T-Zellzone in Lymphknoten und Payer'schen Plaques [Fürster *et al.*, 1999]. Ebenso sind CCR7 und seine Liganden für die Neogenese lymphoider Organe von Bedeutung [Fan *et al.*, 2000]. Das Ausschalten von CXCL12 bzw. CXCR4 hat den einzigen letalen Chemokin-Knockout (KO) zur Konsequenz. Tiere, denen entweder der Ligand oder der Rezeptor fehlt, sterben perinatal an schweren Entwicklungsstörungen, die u. a. das ventrikuläre Septum [Zou *et al.*, 1998], das Cerebellum [Ma *et al.*, 1998] und das renale Gefäßsystem betreffen [Takabatake *et al.*, 2009]. Auch in der Niere scheinen Chemokine an Entwicklungsprozessen beteiligt. 2002 konnten Gröne *et al.* die Chemokine CX3CL1, CXCL10 und CXCL12 und ihre Rezeptoren CX3CR1, CXCR3 bzw. CXCR4 in embryonalen humanen Nierengewebe immunhistochemisch nachweisen. Dabei wurden beispielsweise CX3CL1, CXCL12, sowie CXCR3 einerseits im Komma- und S-förmigen Körperchen andererseits auf Mesangialzellen des sich entwickelnden Glomerulums detektiert [Gröne *et al.*, 2002].

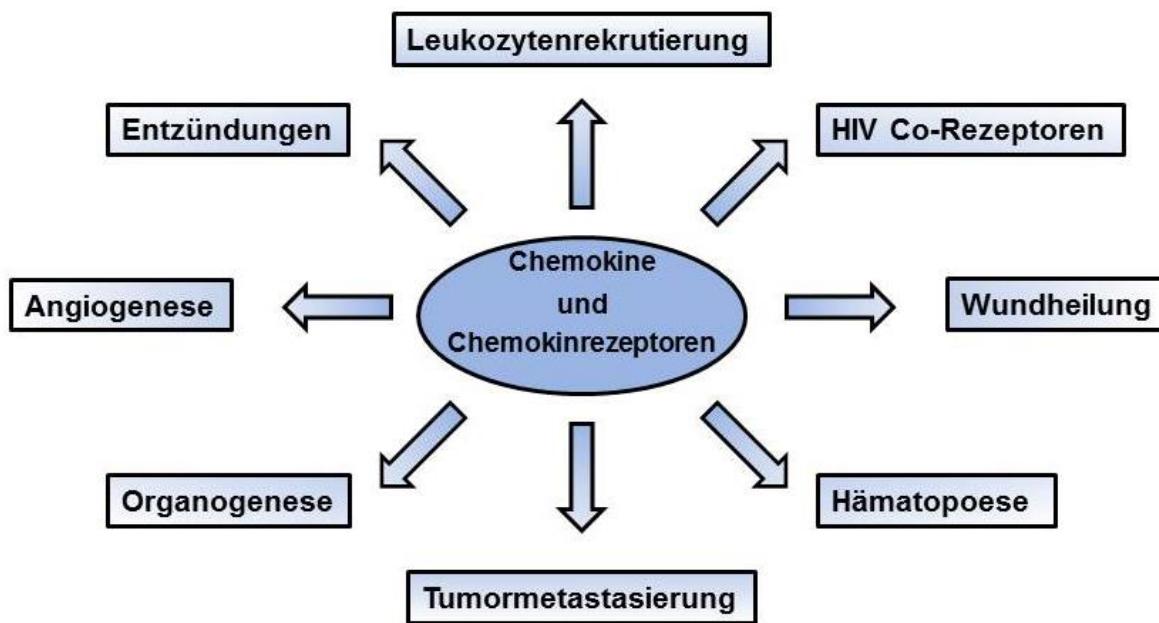


Abb. 12: Wirkspektrum von Chemokinen und ihren Rezeptoren.

1.3 Das Chemokinligand/-Rezeptorpaar CCL21 und CCR7 im renalen Kontext

1.3.1 Die CCR7-Liganden CCL19 und CCL21

1993 beschrieben Birkenbach *et al.* als Erste die Expression von CCR7. Damals wurde CCR7 noch als Epstein-Barr Virus- (EBV) induziertes (EBI-1) Gen bzw. als Burkitt-Lymphom-Rezeptor 2 (BLR-2) charakterisiert, der von T- und B-Lymphozyten, sowie der Milz und etwas weniger ausgeprägt den Tonsillen exprimiert wird. Auch aktivierte reife DCs stellen einen Ort hoher CCR7-Expression dar [Birkenbach *et al.*, 1993; Schweickart *et al.*, 1994; Burgstahler *et al.*, 1995; Dieu *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998; Sozzani *et al.*, 1998; Yanagihara *et al.*, 1998].

Einer der beiden CCR7-Liganden ist CCL21, das auch bekannt ist als SLC (*Secondary Lymphoid-tissue Chemokine*), 6Ckine, TCA-4 (*Thymus-derived Chemotactic Agent 4*) oder Exodus-2 [Nagira *et al.*, 1997; Hromas *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1998]. Dieses Chemokin unterscheidet sich in mehrererlei Hinsicht von anderen Chemokinen. Zunächst gehört es einer kleinen Untergruppe von CC-Chemokinen an, die über sechs statt vier konservierte Cysteine verfügen [Hedrick und Zlotnik, 1997]. Ein weiteres strukturelles Merkmal stellt eine spezifische 37 Aminosäuren-lange Carboxy-(C)-terminale Verlängerung des Proteins dar [Hromas *et al.*, 1997]. Diese verleiht dem Molekül gegenüber anderen Chemokinen eine deutlich höhere Affinität zu Herparansulfat [Christopherson *et al.* 2002]. Das Fehlen dieser Extension inhibiert die Immobilisierung von CCL21 im HEV-Lumen [Stein *et al.*, 2000]. *In vitro*-Analysen konnten in diesem Zusammenhang aufdecken, dass DCs über die Fähigkeit verfügen, den C-Terminus proteolytisch abzuspalten, was die Wirkung von CCL21 modifiziert [Schumann *et al.*, 2010]. Generell können Zellen auf Chemokine mit Haptotaxis oder Haptokinese bzw. mit Chemotaxis oder Chemokinese reagieren. Dabei findet bei der Haptotaxis und -kinese eine gerichtete bzw. zufällige Migration statt, bei der gleichzeitig die Zelladhäsion induziert wird. Im Gegensatz dazu verläuft die gerichtete bzw. zufällige Bewegung bei der Chemotaxis und -kinese adhäisionsabhängig [Friedl *et al.*, 2001]. An die HEV-Matrix gebunden, ist für CCL21 ein haptotaktischer Effekt charakteristisch, im Gegensatz dazu zeichnet sich CCL21 nach proteolytischer Spaltung, also in seiner löslichen Form, durch seine chemotaktische Wirkung aus [Schumann *et al.*, 2010].

Die Entdeckung, dass das T-Zell-Defizit in den Lymphknoten von *plt*-Mäusen (*paucity of lymph node T-cells*, Mangel an Lymphknoten-T-Zellen) [Nakano *et al.*, 1997] mit dem Fehlen von CCL21 in Verbindung steht, brachte erste Informationen über die physiologische Funktion von CCL21 [Nakano *et al.*, 1998; Vassileva *et al.*, 1999]. So resultiert aus der reduzierten T-Zellen-Anzahl in den Lymphknoten von *plt*-Mäusen eine verzögerte, wenn gleich verstärkte T-Zell-Immunantwort [Mori *et al.*, 2001]. Ferner gelang mit diesen Tieren der Nachweis, dass von CCL21 insgesamt 3 Isoformen (CCL21a, b und c) existieren, die durch Genduplikation entstanden und in unterschiedlichen Mausstämmen verschieden exprimiert werden. Der einzige Unterschied, der das Protein *per se* betrifft, ist eine Mutation an Position 65: während CCL21a hier über ein Serin verfügt, befindet sich an bei CCL21b und c an dieser Stelle ein Leucin. Ansonsten differieren nur nicht-kodierende Bereich der genomischen DNA [Vassileva *et al.*, 1999; Nakano und Gunn, 2001]. Charakteristisch für *plt*-Mäuse ist die Deletion des CCL21a-Gens, während funktionelles CCL21b weiterhin exprimiert werden kann. Durch die Gendupli-

kationen entwickelten sich auch divergente Expressionsmuster zwischen den CCL21-Isoformen. Während in mesenterialen Lymphknoten bei weitem am meisten CCL21a-mRNA exprimiert wird, stellt die Lunge den Hauptexpressionsort von CCL21b dar. Weitere Organe, in denen zum Teil deutlich mehr CCL21b- als CCL21a-mRNA detektiert wurde, waren u. a. die Nieren und das Herz [Vassileva *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002].

Die Analyse der *plt*-Mäuse ergab nicht nur das Fehlen der CCL21a-Expression, sondern auch des zweiten CCR7-Liganden: CCL19, auch bekannt als ELC (*EBI1 ligand chemokine*) oder MIP-3 β (*macrophage inflammatory protein-3-beta*). In derselben Veröffentlichung konnte auch gezeigt werden, dass es bei CCL19 ebenfalls zu Genduplikationen gekommen war. Allerdings handelt es sich hier um 3 Pseudogene, die zu keinem funktionellen Protein führen [Nakano und Gunn, 2001]. Da CCL19 im Gegensatz zu CCL21 über keine C-terminale Extension verfügt, induziert es als meist lösliches Molekül eine chemotaktische aber nicht eine haptotaktische Bewegung [Schumann *et al.*, 2010].

Obwohl die beiden CCR7-Liganden über die gleiche Bindungsaffinität zu ihrem Rezeptor verfügen [Sullivan *et al.*, 1999] und trotz der Tatsache, dass bei CCL19 [Ott *et al.*, 2004 und 2006] und CCL21 [Love *et al.*, 2012] vor allem die Interaktion des jeweiligen Amino-(N)-terminalen Endes zur Rezeptorbildung beiträgt, unterscheiden sich die zwei Liganden hinsichtlich ihrer biochemischen Wirkung auf die nachfolgende Signaltransduktionskaskade. Dies basiert wahrscheinlich auf der geringen Aminosäure-Sequenzidentität von lediglich 25%. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass im Gegensatz zu CCL21 die Wechselwirkung von CCL19 mit seinem Rezeptor zu dessen Internalisierung führt [Bardi *et al.*, 2001; Byers *et al.*, 2008], welche in Abhängigkeit von β -Arrestin geschieht und über den ERK1/2-(*extracellular signal-regulated kinase*)-Signalweg verläuft. Obwohl beide Liganden die Kapazität haben, die ERK1/2-Signaltransduktionskaskade zu induzieren, erfolgt die ERK1/2-Aktivierung mittels CCL19 um den Faktor 4 gesteigert [Kohout *et al.*, 2004; Zidar *et al.*, 2009]. Basierend auf dieser differentiellen Reagibilität wird z. B. beim *Homing* naiver T-Lymphozyten sichergestellt, dass die Zellen, die in den HEVs und im Parakortex hohen CCL21-Konzentrationen ausgesetzt sind, nicht zu früh desensibilisiert werden, was die Migrationseigenschaften der Immunzelle erheblich einschränken würde.

1.3.2 Die renale Bedeutung von CCR7 und CCL21

1.3.2.1 Inflammatorische, pathophysiologische und physiologische renale Chemokin-Expression

Als Reaktion auf ein proinflammatorisches Agens sezernieren verschiedene renale Zellen Chemokine. *In vitro*-Untersuchungen an kultivierten humanen Mesangialzellen [Schwarz *et al.*, 1997] bzw. primären Tubulusepithelzellen [Deckers *et al.*, 1997] konnten belegen, dass diese nach Applikation von IFN- γ , TNF- α oder IL-1 α bzw. β bzw. verschiedenen Kombinationen daraus mit der Ausschüttung von CCL2, CCL5 und CXCL8 beginnen. Eine wichtige Rolle spielt dabei CCL2, auch bekannt als *macrophage chemoattractant protein-1* (MCP-1), welches essentiell für die Rekrutierung von Makrophagen und Monozyten in entzündete Gewebe ist. Verschiedene Gruppen konnten dies schon früh darlegen [Rovin *et al.*, 1992; Satriano *et al.*, 1993; Prodjosudjadi *et al.*, 1995].

Aber auch bei Autoimmunerkrankungen wie der IgA-Nephropathie kommt es zu Veränderungen im Expressionsmuster von Chemokinen und ihren Rezeptoren. Während der Chemokinrezeptor CXCR3

bei gesunden Personen kaum von Mesangialzellen exprimiert wird, konnte mittels Immunhistochemie bei Patienten mit IgA Nephropathie bzw. membranproliferativer Glomerulonephritis eine deutliche Zunahme von mesangial produzierten CXCR3 festgestellt werden [Romagnani *et al.*, 1999].

Außerdem konnten Wolf *et al.* [1997] mit *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten zeigen, dass auch unter nicht-inflammatorischen Bedingungen bei Nicht-Immunzellen ein Chemokinexpression induziert werden kann. So reagierten glomeruläre Ratten-Endothelzellen nach Stimulation mit Ang II mit der Ausschüttung von CCL5.

1.3.2.2 Die Bedeutung von CCR7 und CCL21 unter nicht-inflammatorischen Bedingungen in Bezug auf das glomeruläre Mesangium

Renale Zellen, insbesondere Mesangialzellen, können allerdings nicht nur Chemokine sezernieren, sondern auch auf diese reagieren. So konnten Luo und Dorf [1996] sowohl einen chemoattraktiven also auch Adhäsions-fördernden Effekt von CCL1 und CCL2 auf kultivierte murine Primär-Mesangialzellen feststellen. Zusätzlich wurde eine Proliferations-fördernde Wirkung von CCL21 beschrieben.

Allerdings stellt CCR8 den einzigen bis *dato* bekannten CCL1-Rezeptor dar und zumindest im *in vitro*-Humanmodell konnte in späteren Analysen keine mesangiale CCR8-Expression festgestellt werden. Neben diesem waren auch die Chemokinrezeptoren CCR2 bis CCR5 weder in unstimulierten noch stimulierten humanen Mesangialzellen nachweisbar. Lediglich CCR1 verfügt über eine induzierbare mesangiale Expression [Banas *et al.*, 1999]. CCR7-mRNA hingegen wird von dieser Zelllinie unabhängig von der Verwendung proinflammatorischer Stimulanzien produziert. Durch Untersuchung von gesundem humanem Nierengewebe konnte zusätzlich die glomeruläre mRNA-Expression des CCR7-Liganden CCL21 gezeigt werden. Immunhistochemische Analysen deckten eine konstitutive Proteinbiosynthese beider Moleküle auf, wobei CCR7 über ein mesangiales und CCL21 über ein podozytäres Expressionsmuster verfügt. In derselben Publikation konnte auch erstmals die Bedeutung des Zusammenspiels von CCR7 und CCL21 für Nicht-Immunzellen unter nicht-inflammatorischen Bedingungen demonstriert werden. Dazu wurden in Zellkulturexperimenten mit humen Mesangialzellen diese mit rekombinantem CCL21 versetzt. Die Folge war eine Dosis-abhängige Steigerung der mesangialen Migrationsaktivität. Analog dazu hatte CCL21 eine Proliferations-fördernde Wirkung. Gleichzeitig übt CCL21 einen anti-apoptotischen Effekt auf jene Zellen aus, indem das Chemokin den Fas-induzierten Zelltod inhibiert [Banas *et al.*, 1999 und 2002].

Wie in 1.2.1.2 b) erläutert, hängt die Fähigkeit von Zellen an (Zell-) Oberflächen zu adhärieren mit ihrem Migrationspotential zusammen. Dabei bewirkt die Chemokin-vermittelte Aktivierung von Integrinen eine starke Adhäsion, was in einer deutlichen Abflachung (Polarisation) der Zellen und der Ausbildung von Uropoden resultiert. Diese beruht auf der Integrin-induzierten Neuorganisation des Zytoskeletts, da Integrine wie LFA-1 mit den zellulären Aktinfilamenten über Adaptormoleküle in Verbindung stehen. Im Fall der Chemokin-vermittelten Leukozytenaktivierung bedeutet dies eine effiziente Rekrutierung der Aktinpolymerisations-Maschinerie [Vicente-Manzanares und Sánchez-Madrid, 2004; Barreiro *et al.*, 2007]. Als Beispiel hierfür fungiert die LFA-1-Untereinheit β_2 -Integrin in neutrophilen Leukozyten. Diese kann in Folge der Zellaktivierung mit α -Aktinin, einem Aktin-bindenden Protein assoziieren [Pavalko und LaRoche, 1993].

Der Nachweis, dass Nicht-Immunzellen nach einer Chemokine-Exposition ebenfalls mit einer Neuorganisation ihres Zytoskelettes reagieren können, gelang 2004 Banas *et al.* mit Hilfe von kultivierten Mesangialzellen, die mit CCL21 behandelt wurden. Wie in Abb. 13 dargestellt, bewirkt eine 12-stündige Inkubation der Zellen mit dem Chemokin eine Reorganisation des Zytoskeletts, wobei Zellausläufer ausgebildet werden, die mit Nachbarzellen in Kontakt treten. In Folge dessen kommt es zu einer verstärkten Adhäsion an Fibronectin-beschichteten Kulturplatten [Banas *et al.*, 2004]. Da Fibronectin einen wesentlichen Bestandteil der glomerulären Mesangialzellmatrix *in vivo* darstellt [Weiss *et al.*, 1979; Courtoy *et al.*, 1982] und sich die Zellen somit in einer Umgebung befanden, die der nativen Milieu relativ nahe kommt, konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass das Chemokin-ligand-/Rezeptorpaar für die Aufrechterhaltung der glomerulären Homöostase eine bedeutende Rolle spielt. Zudem konnte gezeigt werden, dass rasch nach der CCL21-Applikation die Proteinmenge der Glykogensynthase-Kinase 3 (*glycogen synthase kinase-3*, GSK-3) und der Proteinkinase B (*protein kinase kinase B*, PKB) ansteigt [Banas *et al.*, 2004]. Die Integrinuntereinheit $\beta 1$ interagiert in Folge eines Fibrogen-Stimulus mit der Integrin-gebundenen Kinase (*Integrin-linked kinase*, ILK) [Hannigan *et al.*, 1996]. Diese kontrolliert vermittelt in einem Phosphoinositid-3-Kinase- (*phosphatidylinositol-3-kinase*, PI3K)-abhängigen Signalweg die Aktivität von GSK-3 und PKB [Delcommenne *et al.*, 1998; Ivaska *et al.*, 2002]. Letztere in ihrer aktivierte Form verhindert nach Bachelder *et al.* [2001] die Apoptose in Folge einer Zellablösung von einer Matrixoberfläche.

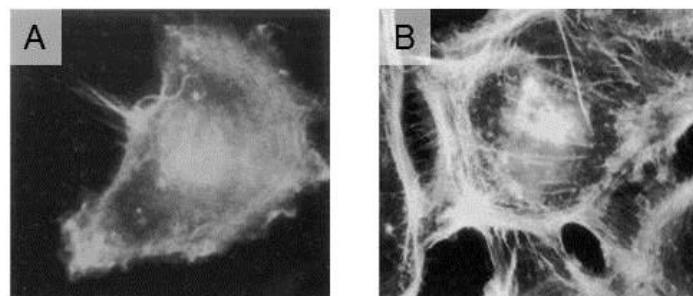


Abb. 13: Effekt von CCL21 auf kultivierte Mesangialzellen, dargestellt durch immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen gegen F-Aktin. Abb. 13A zeigt eine unbehandelte Mesangialzelle, während in Abb. 13B deutliche Veränderungen in der Organisation des Zytoskeletts nach 12-stündiger Stimulation mit CCL21 sichtbar sind. Die Abbildung wurde verändert nach Banas *et al.*, 2004.

Ein vergleichbarer, wenn auch weniger deutlich ausgeprägter, Effekt hinsichtlich der proliferativen Eigenschaften konnte durch Zugabe der Chemokine CXCL9 bzw. CXCL10 und zu kultivierten Mesangialzellen [Banas *et al.*, 1999] erzielt werden [Wörnle *et al.*, 2004]. Diese agieren durch Bindung an CXCR3. Parallel durchgeführte Experimente zur Analyse der Wirkung der genannten Chemokine auf die Fas-induzierte Apoptose legten offen, dass die Stimulation von CXCR3 keinen präventiven Einfluss auf den programmierten Zelltod hat. Analoge Experimente mit Applikation von CCL5 als Stimulans für CCR1 konnten weder einen Proliferations-fördernden noch Apoptose-verhindernden Effekt zeigen [Wörnle *et al.*, 2004]. Damit stellen CCL21 und CCR7 das bis *dato* einzige Ligand-Rezeptor-Paar dar, das die Physiologie der Mesangialzelle so entscheidend beeinflusst.

1.4 Zielsetzung

Basierend auf den Zellkulturexperimenten und Expressionsanalysen an humanem Nierengewebe in unserer Arbeitsgruppe kann für das Chemokinligand-/Rezeptorpaar CCL21/CCR7 eine bedeutende Rolle in der mesangialen und damit glomerulären Homöostase angenommen werden. Die *in vitro*-Versuche lassen vermuten, dass Mesangialzellen auch *in vivo* von einer CCL21-vermittelten Stimulation hinsichtlich ihrer Migrations-, Proliferations- und Überlebensfähigkeit profitieren. Zusätzlich zu diesen, sowie der konstitutiven glomerulären Expression von CCL21 und CCR7 im gesunden erwachsenen Menschen einerseits und der renalen Expression verschiedener Chemokine und ihrer Rezeptoren in der Embryogenese andererseits, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass bereits die Nephrogenese von CCL21 und seinem Rezeptor beeinflusst wird.

Die Bedeutung des Chemokinligand-/Rezeptorpaars CCL21/CCR7 für die renale und insbesondere glomeruläre Entwicklung und Funktion soll nun erstmals im Mausmodell untersucht werden.

Das Ziel ist die Analyse der renalen CCL21- und CCR7-Expression sowohl auf mRNA- also auch auf Proteinebene. Als Untersuchungsmaterial kommen dafür Nieren von Mausembryonen, sowie von jungen Tieren nach der Geburt und von adulten Mäusen in Frage. Diese sollen einerseits mit Hilfe von qPCR-Analysen auf ihr renales CCL21- bzw. CCR7-mRNA-Expressionsmuster untersucht werden, andererseits ist für beide Moleküle in der Niere eine immunhistochemische Lokalisation vorgesehen.

Ein weiterer Arbeitspunkt ist die Beschreibung eines renalen Phänotyps bei CCR7-defizienten Mäusen und der Vergleich zu altersgleichen Wildtyp-Tieren. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem glomerulären Mesangium. Dadurch, dass die CCL21-CCR7-Achse bei diesen Tieren unterbrochen ist, müssen Auswirkungen auf die Physiologie der Mesangialzelle in Betracht gezogen werden. Als Konsequenz der CCR7-Defizienz kommen in Frage: eine reduzierte Anzahl der glomerulären Mesangialzellen, strukturelle Modifikationen, die entweder nur das Mesangium oder das gesamte Glomerulum betreffen, oder physiologische Veränderungen. Ein zentrales Experiment stellt dabei die Bestimmung der glomerulären Mesangialzellzahl in Relation zur glomerulären Gesamtzellzahl dar. Ferner soll die Struktur und Architektur der Glomerula mittels (immun-) histochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchen analysiert werden. Auch Seren- und Urinanalysen sollen erfolgen. Zusätzlich sollen die mRNA-Expressionsmuster anderer Chemokine und Chemokinrezeptoren beschrieben werden, um mögliche reaktive oder kompensatorische Effekte in Folge der CCR7-Defizienz festzustellen.

Als weiteres Modell für die Untersuchung der Bedeutung des Chemokinligand-/Rezeptorpaars CCL21/CCR7 soll eine Maus generiert werden, bei der das glomeruläre Chemokinsystem stärker als unter physiologischen Bedingungen stimuliert werden soll. Dazu soll komplementär zur CCR7-defizienten Maus eine transgene Maus erzeugt werden, bei der spezifisch im Podozyten durch Gabe von Doxycycline eine lokale CCL21-Überexpression induziert werden kann. Ziel ist es zunächst *in vitro* die Induzierbarkeit der CCL21-Expression mit Hilfe des tet-On-Vektorsystem zu testen, bevor die CCL21-Gensequenz über Pronukleusinjektion in das Mausgenom eingebracht wird.

Diese Arbeit soll am Beispiel von CCL21 und CCR7 zum Verständnis der Bedeutung von Chemokinen unter physiologischen, nicht-inflammatorischen oder pathophysiologischen Bedingungen beitragen.

Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Alle Verbrauchschemikalien und Chemikalien für den allgemeinen Laborbedarf wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), der Carl Roth GmbH (Karlsruhe), der AppliChem GmbH (Darmstadt) oder Merck KGaA (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Chemikalien und Kits für histochemische und (Fluoreszenz)-immunhistochemische Färbungen

Hersteller	Substanz
AppliChem GmbH, Darmstadt	Mayer's Hämalaun
Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Albumin, IgG-frei, Roti®-Histokitt, Roti®-Histol
Merck KGaA, Darmstadt	Schiff's Reagenz
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Direct Red 80, Fast Green FCF, Levamisol
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-phosphat) NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)
Vector Laboratories Inc., Burlingame, (Kalifornien, USA)	Antigen Unmasking Solution, Avidin/Biotin Blocking Kit, Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) Vectastain ABC Kit Standard, Vectastain ABC-AP Kit Standard Nuclear Fast Red

2.1.3 Chemikalien und Kits für molekularbiologische und proteinbiochemische Experimente

Hersteller	Substanz
5 Prime Inc., Gaithersburg (Maryland, USA)	5 PRIME Master Mix
Clontech Laboratories Inc., Mountain View (Kalifornien, USA)	pTRE tight Vector, pTet-On-Advanced Vector
BD Biosciences, San Jose (Kalifornien, USA)	Proteinstandard, 80 mg/ml, HAS and gamma-globulins
Bethyl Laboratories Inc., Montgomery (Texas, USA)	Mouse Albumin ELISA Quantification Set
Bio-Rad Laboratories GmbH,	SDS Solution 20% (w/v) (Sodiumdodecylsulfat)

München	10x Tris/Glycin Buffer, 10x Tris/Glycin/SDS Buffer
GE Healthcare, Little Chalfont (UK)	ECL Western Blotting Detection Reagents
Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH, Berlin	PCR Nucleotide Mix, 25 mM
LifeTechnologies GmbH, Darmstadt	LT-Sys Creatinin PAP, flüssig
Macherey-Nagel GmbH, Düren	SimplyBlue™ SafeStain, Sybr® Safe DNA Gel Stain
New England Biolabs Inc., Ipswich (Massachusetts, USA)	TOPO TA Cloning® Kit (pCR® 2.1-TOPO® Vektor) NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) BamHI, EcoRI, HindIII, Ncol, Xhol
Promega Corporation, Madison (Wisconsin, USA)	T4 DNA Ligase Dual-Luciferase® Reporter Assay System M-MLV Reverse Transcriptase (M-MLV RT), Random Primers, Recombinant RNAsin Ribonuclease Inhibitor
Qiagen GmbH, Hilden	QuantiTect SYBR Green PCR Kit, QIAGEN Plasmid Maxi Kit QIAshredder, RNase-Free DNase Set, RNeasy Mini Kit
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Liquid Substrat System for ELISA
Thermo Scientific, Schwerte	6x DNA Loading Dye

2.1.4 Chemikalien und Kits für zellbiologische Experimente

Hersteller	Substanz
Biomol GmbH, Hamburg	Interferon gamma, Recombinant, Murine (INF γ)
LifeTechnologies GmbH, Darmstadt	DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium 21885 DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium 41966 HEPES, L-Glutamin 200 mM, RPMI 1640 + Glutamax I 61870
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	FuGene HighPerfect
PAA Laboratories GmbH, Cölbe	Fetal Bovine Serum (FBS), Sodium Pyruvat
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Dimethylsulfoxid (DMSO), Sodium Bicarbonat

2.1.5 Chemikalien und Kits zur Untersuchung des Mausmodells

Hersteller	Substanz
Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim	Isofluran
Bela-Pharm GmbH & Co.K KG, Vechta	Ketamin 10%
DeltaSelect Gmbh, Pfullingen	Di-Natrium-EDTA
LifeTechnologies GmbH, Darmstadt	HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)
Rotexmedica GmbH, Trittau	Heparin-Natrium
Serumwerk Bernburg AG, Bernburg	Xylazin 2%

2.1.6 Antikörper

Hersteller	Primärantikörper	Spezifikation
Abcam plc, Cambridge, (UK)	Anti-CCL21 Antibody PDGF Receptor beta Antibody CCR7 Antibody	Rabbit Polyclonal to Mouse (für Western Blot) Rabbit Monoclonal [Y92] IgG to Mouse
Aviva Systems Biology L.L.G., San Diego (Kalifornien, USA)		Rabbit Polyclonal Ig
Bethyl Laboratories Inc., Montgomery (Texas, USA)	Mouse Albumin Coating Antibody Mouse IgA Antibody	Goat Polyclonal IgG Goat Polyclonal IgG
Cedarlane, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching	Anti-Mouse/Human MAC-2	Rat Monoclonal M3/38, IgG _{2a}
Novus Biologicals, Littleton (Colorado, USA)	Mouse IgM Antibody	Goat Polyclonal IgM
R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt	Mouse CCL21/6Ckine Antibody	Rat Monoclonal IgG _{2B} , Clone # 59106; (für Immunhistochemie)
Santa Cruz Biotechnologie Inc., Dallas (Texas, USA)	Actin (I-19)	Goat Polyclonal IgG

Hersteller	Sekunärantikörper	Spezifikation
Abcam plc, Cambridge (UK)	Secondary Antibody to Goat IgG	Rabbit F(ab')2 Polyclonal IgG H&L (Biotin)
	Secondary Antibody to Rabbit IgG	Goat F(ab')2 Polyclonal IgG (Fab')2 (Biotin)
	Secondary Antibody to Rat IgG	Goat F(ab')2 Polyclonal IgG (Fab')2 (Biotin)
Bethyl Laboratories Inc., Montgomery (Texas, USA)	HRP Conjugated Mouse Albumin Detection Antibody	Goat Polyclonal IgG
Santa Cruz Biotechnologie Inc., Dallas (Texas, USA)	Anti-Rabbit Anti-Goat	Goat Polyclonal IgG, HRP-linked Rabbit Polyclonal IgG, HRP-linked

2.1.7 Software

Hersteller	Software
Carl Zeiss Jena GmbH, Jena	AxioVision Release 4.8.1
IBM Corporation, Armonk (New York, USA)	IBM SPSS Statistics 21
Invitrogen (LifeTechnologies GmbH) Darmstadt	Vector NTI
Systat Software, Chicago (Illinois, USA)	Sigma Plot 11.0
TissueGnostics GmbH, Wien (Österreich)	HistoQuest 3.0

2.1.8 Geräte

Hersteller	Substanz
Biocare Medical, Concord, Kalifornien (USA)	Decloaking Chamber
Kent Scientific Corporation, Torrington Connecticut USA)	Coda 2 Standard Non-Invasive Blood Pressure System – Tail Cuff Method
Carl Zeiss Jena GmbH, Jena	Axiostar plus, Observer. Z1
Eppendorf, Hamburg	Mastercycler Pro S
LifeTechnologies GmbH, Darmstadt	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
M. P. Biomedicals, Solon (Ohio, USA)	Homogenisator FastPrep-24
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Geldokumentationssystem Quantum 1100 Superbright NanoDrop 2000c Spectrophotometer
Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim	Infinite® 200 PRO series

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeines

Sofern nicht anders beschrieben wurden alle Agentien und Kits gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung und Bestimmung der Konzentration von RNA

Die Isolierung von RNA aus Zellen und Organen einschließlich DNase-Verdau erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits. Neben der Konzentration der eluierten RNA wurde auch die Absorption bei den Wellenlängen 260, 280 und 230 nm am NanoDrop 2000c Spectrophotometer erfasst. Diese Wellenlängen entsprachen den Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren, Protein bzw. anderen Kontaminationen, die meist durch die mRNA-Extraktion selbst hervorgerufen wurden. Bei reiner RNA liegt die 260/280-Ratio bei 2, die 260/230-Ratio zwischen 2 und 2,2. Für den Fall, dass für eine oder beide Ratios ein Wert von 1,8 oder weniger berechnet wurde, wurde die RNA einem weiteren *RNA Clean-up* mittels RNeasy Mini Kit unterzogen und erneut vermessen. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden pro Reaktionsansatz 2 µg RNA mit 0,5 µg Random Primer in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 3 min auf 70°C erhitzt, 1 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert und sofort auf Eis aufbewahrt. Nach Zugabe von 4 µl 2,5 mM PCR Nucleotid Mix, 4 µl 5x M-MLV RT-Puffer, 1 µl Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitior und 1 µl M-MLV RT fand die cDNA-Primärstrangsynthese für 1 h bei einer Extensionstemperatur von 37°C statt. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 95°C für 2 min gestoppt. Nach Einstellen der cDNA-Endkonzentration von 6,67 ng/µl wurde die cDNA bei -20°C aufbewahrt. Außerdem wurde zu jeder cDNA-Synthese ein Kontrollansatz (RT-) ohne M-MLV RT hergestellt. Dieser wurde ansonsten identisch behandelt und diente als Kontrolle für eine eventuelle Kontamination durch genomische DNA.

2.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Kolonie-PCR und Agarosegelektrophorese

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) erlaubt die Amplifikation von DNA unabhängig ihrer Herkunft. Das Prinzip der PCR beruht auf sich wiederholenden Zyklen von Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Primerhybridisierung an die Einzelstrang-DNA und Elongation des Einzelstrangs beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers. Die Zusammensetzung für einen Standard-PCR-Ansatz ist in Tabelle 1 beschrieben. Die verwendeten Primer für Standard-, Kolonie- und qPCR sind in Tabelle 3 unter 2.2.2.4 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes

Menge / Volumen	Verwendete Substanzen
5 – 50 ng	Template-DNA
1 µl	10 µM forward und reverse Primer
8 µl	5 PRIME Master Mix
ad 20 µl	ddH ₂ O (doppelt destilliertes H ₂ O)

Bei einer Kolonie-PCR wurden die zu untersuchenden *E.coli*-Kolonien einzeln von einer Agar-Patte abgenommen, in 5 µl H₂O resuspendiert und für 5 min bei 95°C lysiert. Wie für die PCR bereits beschrieben wurden Primer und 5PRIME MasterMix hinzugefügt und amplifiziert. Amplifikation erfolgte in beiden Fällen folgendermaßen:

Inkubationsschritt	Temperatur	Dauer
Initialer Denaturierungsschritt	95°C	2 min
Amplifikation der DNA in 40 Zyklen: Denaturierung Primerhybridisierung Elongation	95°C 50-65°C 72°C	5 s 15 s 6 s pro 100 Basen Template-DNA
Finaler Elongationsschritt	72°C	1 min

Die Separierung der amplifizierten DNA geschah mittels Agarosegelektrophorese. Dazu wurden je nach erwarteter Produktgröße 0,5 bis 2,5 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA) durch Erhitzen vollständig gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde die Agarose-TBE-Lösung mit dem DNA-Farbstoff Sybr® Safe DNA Gel Stain versetzt. Nachdem die Agarosemoleküle im Zuge des Erkaltens die Gelmatrix gebildet hatten, wurden die mit 6x DNA Loading Dye versetzten DNA Proben elektrophoretisch separiert. Die anschließende Visualisierung und Dokumentation erfolgte mit dem Geldokumentationssystem Quantum 1100 Superbright.

2.2.2.4 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (qPCR) erlaubt nach jedem Zyklus eine Messung der Menge an entstandenen PCR-Produkt. Grund hierfür stellt der dem Reaktionsansatz (Zusammensetzung vgl. Tabelle 2) beigegebene Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green dar, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert und dessen relative Fluoreszenz in der exponentiellen Phase der PCR linear zum entstandenen PCR-Produkt ansteigt.

Tabelle 2: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes

Menge / Volumen	Verwendete Substanzen
13,3 ng	cDNA
1 µl	10 µM Primer
5 µl	QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
ad 10 µl	ddH ₂ O

Die Amplifikation der Template-DNA geschah unter folgenden Bedingungen:

Inkubationsschritt	Temperatur	Dauer
Initiation	50°C	2 min
Initialer Denaturierungsschritt	95°C	15 min
Amplifikation der DNA in 40 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	15 s
Primerhybridisierung	58°C	30 s
Elongation	72°C	30 s
Schmelzkurve		
Denaturierung	95°C	15 s
Hybridisierung der Einzelstränge	60°C	1 min
Denaturierung	60°C bis 95°C in 0,05°C Schritten	1 s pro 0,05°C

Die Proben wurden in Triplikaten in einer 384-Lochplatte angesetzt. Nach der Amplifikation wurde zur Kontrolle der Spezifität des PCR-Produkts dessen Schmelzkurve dokumentiert. Nach Hybridisierung der Einzelstränge fiel bei einem spezifischen PCR-Produkt die gemessene Fluoreszenz zunächst langsam und stetig, dann aber vollständig auf null, wenn jene Temperatur erreicht wurde, bei der die DNA in zwei Einzelstränge dissozierte. Neben der Kontrolle hinsichtlich der Spezifität wurden auch die cDNA und die Agentien auf mögliche Kontamination mit genomischer DNA untersucht. Dazu wurden je in Triplikaten untranskribierte RNA (vgl. 2.2.2.2) und ein Ansatz ohne cDNA (*no template control*, NTC) verwendet. Nur wenn bei diesen kein Produkt festgestellt werden konnte bzw. die C_T-Werte (s. u.) in RT- und NTC-Ansatz um mindestens 10 höher waren, als in den Proben, wurden die Berechnungen bezüglich Expressionslevel und -unterschiede durchgeführt.

Neben der qPCR auf das zu untersuchende Gen (*gene of interest*, GOI) wurde simultan für alle Proben eine qPCR auf ein Referenzgen durchgeführt. Bei diesem handelte es sich um Cyclophilin B (Peptidylprolyl-Isomerase B), ein *housekeeping gene*. Unabhängig davon, ob das Expressionslevel *per se* festgestellt oder die Expression des GOI zwischen mehreren Gruppen verglichen werden sollte, wurden die C_T-Werte des GOI auf die C_T-Werte des Referenzgens normalisiert. Bei dem C_T-Wert einer Probe handelt es sich um die Anzahl der Zyklen (Schwellenzyklus, *threshold cycle*, C_T) die nötig waren, um ein Fluoreszenzsignal zu erreichen, dessen Stärke die Grundfluoreszenz signifikant überstieg. Die Grundfluoreszenz wurde durch die Basislinie dargestellt und automatisch über den der Software zugrunde liegenden Algorithmus berechnet.

Die Differenz zwischen dem C_T-Wert des GOI (Minuend) und dem C_T-Wert des Referenzgens (Subtrahend) ergab den ΔC_T-Wert, welcher zur Basis 2 potenziert wurde. Das Ergebnis, der 2^{-ΔC_T}-Wert, repräsentiert die relative Genexpression normalisiert auf das Referenzgen. Der Zahlenwert 2 (wegen der theoretischen Verdopplung des PCR-Produkts in der exponentiellen Phase) ergab sich im Falle einer 100 %-igen Amplifikationseffizienz durch Berechnung der Steigung der Standardkurve. Diese wurde für jedes Gen über vier Verdünnungsschritte einer Vergleichs-cDNA erstellt. Die vergleichende Quantifizierung wurde nur dann durchgeführt, wenn die berechnete Effizienz zwischen 85 und 115% lag und sich gleichzeitig die Effizienzen von GOI und *housekeeping gene* um nicht mehr als 10 unterschieden.

Nach Berechnen der $2^{-\Delta C_T}$ -Werte wurden die Werte pro Gruppe hinsichtlich ihrer Normalverteilung untersucht (vgl.: 2.2.8 Statistik und Darstellung der Ergebnisse). Um die Genexpression bei normalverteilten Daten zwischen zwei Gruppen vergleichen zu können, wurde die delta-delta-C_T-($\Delta\Delta C_T$)-Methode angewandt, die ein Weiterarbeiten mit Mittelwerten und Standardabweichung erlaubte. In dieser Arbeit stellte die jeweilige CCR7⁺-Gruppe die zu untersuchende Gruppe dar, während auf die altersgleiche WT-Gruppe kalibriert wurde. Zur Berechnung des x-fachen Unterschieds der Genexpression wurde in beiden Gruppen die C_T-Werte des GOI auf die C_T-Werte des Referenzgen normalisiert. Die erhaltenen ΔC_T -Werte wurden voneinander subtrahiert($\Delta\Delta C_t$) und zur Basis 2 potenziert ($2^{\Delta\Delta C_T}$) [Livak und Schmittgen, 2001].

Bei nicht-normalverteilten Daten wurde der Median der einzelnen $2^{-\Delta C_T}$ -Werte pro Gruppe bestimmt. Analog zu den normalverteilten Daten wurde hier der mediane Gruppen- $2^{-\Delta C_T}$ -Wert der jeweiligen CCR7⁺-Gruppe auf den der altersgleichen WT-Gruppe kalibriert. Das Ergebnis stellte den medianen x-fachen Expressionsunterschied eines Genes zwischen einer CCR7⁺- und einer altersgleichen WT-Gruppe dar. Auch die Werte für 25 und 75%-Quartil der CCR7⁺-Gruppe wurden auf den Median der altersgleichen WT-Gruppe kalibriert, so dass der Interquartilsabstand berechnet werden konnte.

Tabelle 3: Verwendete Primer für die Klonierungen und die qPCRs

Gen	Zweck	forward-Primer	reverse-Primer
CCL21a	Klonierung	TCATGGCTCAGATGATGACTC	CTATCCTCTTGAGGGCTGTG
CCL21a (1-116)	Klonierung	GAATT CATGGCTCAGATGATGAC	GGATCCTTCTCTGGCTGTACTTAAG
CCL21a (91-209)	Klonierung	GAATT CATGTGCTGCCTTAAGTACAG	GGATCCGAGTGCTTCCGGGGTG
CCL21a (190-326)	Klonierung	GAATT CATGTTCTCACCCCGGAAGC	GGATCCGTTCCCCGGTTCTTC
CCL21a (304-398)	Klonierung	GAATT CATGGCTGCAGGAAGAAC	GGATCCCCTTGTAGGGCTGTG
CCL21	qPCR	GGGCTGCAAGAGAACTGAAC	CTGTGAGTTGGACCGTGAAC
CCL28	qPCR	GCTGTGTGTGGCTTTTC	TAGCTTTCAAGCACCCGAAG
CCR7	qPCR	AGAACCAAAAGCACAGCCTTC	ATGACAAGGAGAGGCCACAC
CCR10	qPCR	ACCCTTGTAGCCAGAGATGG	CGACTGAAAGCCTGGACATC
Cyclophilin B	qPCR	AGCCAGGCTGTCTGACTGT	GCACAGGAGGAAAGAGCATC
CXCL13	qPCR	GCTGCCCAAAACTGAAG	GCTTGGGGAGTTGAAGACAG
CXCR5	qPCR	CATGGGCTCCATCACATACA	CATGGGCTCCATCACATACA
eGFP	Klonierung	GGATCCATGGTAGCAAGGG	CAAATGTGGTATGGCTGATTATG
Luciferase	Klonierung	GGATCCTATGGAAGATGCCAAAAC	AAGCTTTACACGGCGATCTTC

Die Sequenz der Primer ist immer in 5` nach 3`- Orientierung angegeben.

2.2.2.5 Klonierung

Vektoren wurden auf Basis eines Empfängervektors, in den die Sequenz des Zielgens eingebracht wurde, konstruiert. Das Zielgen wurde durch PCR amplifiziert und mittels präparativer Agarosegel-elektrophorese (vgl. 2.2.2.3) isoliert. In Abhängigkeit von der gewählten Klonierungsstrategie wurden die Restriktionsschnittstellen durch verlängerte Primer eingefügt werden. Mit dem gereinigten PCR-Produkt (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up) wurde zum Generieren des Insertvektors eine TOPO TA-Klonierung (TOPO TA Cloning® Kit) durchgeführt. Nach Isolierung des Insertvektors aus einer transformierten Bakterienkultur des Stammes *E.coli* DH5 α (vgl. 2.2.2.6) wurden dieser und der Empfängervektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen restriktiert. Im Anschluss wurde das Insert mit der alkalischen Phosphatase CIP (*calf intestinal phosphatase*) dephosphoryliert und in einem molaren Verhältnis von 1:1 bzw. 3:1 mit dem Empfängervektor mittels T4 DNA Ligase ligiert.

2.2.2.6 Transformation

Zur Transformation wurden chemisch kompetente Bakterien des Klonierungsstamms *E.coli* DH5 α auf Eis aufgetaut. Nach Zusatz von 50-100 ng Plasmid-DNA zur Zellsuspension folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt auf Eis. Diesem schloss sich für 30 s ein Hitzeschock bei 42°C und ein Inkubationsschritt auf Eis für 2 min an. Vor der 12 bis 24-stündigen Inkubation bei 37°C auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker wurde der Ansatz für 75 min in SOC-Medium bei 37°C und 300 rpm in einem Heizblock inkubiert.

2.2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Vektoren und PCR-Produkte wurden den Firmenangaben entsprechend verdünnt und mit dem gewünschten Primer versetzt eingesandt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion aus Zellen wurden kultivierte Zellen abgenommen, pelletiert, in 200 µl RIPA-Puffer pro 10⁶ Zellen resuspendiert und auf Eis lysiert. RIPA-Puffer bestand aus 150 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7,9), 2 mM EDTA, 1 % Nonident P- 40 (v/v), 1% Dichloressigsäure (v/v), 0,1% SDS (w/v), wobei pro 200 µl Ansatz 8 µl 25x Protease Inhibitor Complex frisch zugestzt wurden. Final wurde bei 95°C für 5 min denaturiert. Das Zelllysat wurde bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde ein BCA (Bichinonsäure)-Assay durchgeführt. Dieser Assay beruhte auf der Biuret-Reaktion, bei der im Alkalischen Cu²⁺ in Anwesenheit von Protein zu Cu¹⁺ reduziert wurde. Einwertiges mit Bichinonsäure komplexiertes Kupfer verursachte dabei einen violetten Farbumschlag, dessen Intensität zur Proteinkonzentration über einen Bereich von 20 bis 1200 µg/ml linear proportional war. Die kolorimetrische Quantifizierung erfolgte über eine Eichgerade beim Absorptionsmaximum des Cu¹⁺-BCA-Komplexes (562 nm) [Smith *et al.*, 1985].

Zur Proteinbestimmung wurden im Doppelansatz pro Messung 10 µl Proteinstandardverdünnungen für die Eichgerade (HSA und gamma-globulins, 0 bis 2 mg/ml), unverdünntes Zelllysat, auf 1:100 verdünntes Serum bzw. auf 1:50 verdünnter Urin in der 96-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 200 µl 0,08% Cu(II)SO₄ (w/v) in Bichinonsäure versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Proben am ELISA-Reader vermessen und die Konzentrationen berechnet.

2.2.3.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) diente dem Auf trennen von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse. Die folgenden Angaben galten für ein PA-Gel bestehend aus Trenn- und Sammelgel. Die Prozentigkeit des Gels bezog sich auf seinen Acrylamidanteil (vgl. Tabelle 4) und hing vom gewünschten Trennbereich ab. Sollten die Proteine über einen Bereich von 1 bis 1000 kDa gleichmäßig getrennt werden, wurde ein Stufengradienten-PA-Gel verwendet. Dieses setzte sich aus einem 5 %-igem Sammelgel und je 1,4 ml Schichten bestehend aus 8, 12, 15 und 18 %-igem Trenngel zusammen.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Trenngele entsprechend ihres Acrylamidanteils, sowie des Sammelgels

	Trenngel				Sammelgel
Acrylamidanteil (gesamt)	8 %	12 %	15 %	18 %	5 %
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	1,25 ml				---
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	---				312,5 µl
20% SDS (w/v)	25 µl				6,25 µl
H ₂ O	2,34 ml	1,67	1,17 ml	0,67 ml	700 µl
30% Acrylamid (w/v)	1,33 ml	2 ml	2,5 ml	3 ml	212,5 µl
TEMED	2,5 µl				2,5 µl
10% APS (w/v)	50 µl				25 µl

Proben aus Zelllysaten wurden auf 20 bis 40 µg eingesetztem Gesamtprotein genormt, bei Urinen auf 1 µg. Je nach Probenvolumen wurde 2- bzw. 5-fach Laemmli-Puffer eingesetzt [Laemmli, 1970] und für 5 min bei 95°C erhitzt. Zur Elektrophorese wurden die Gele in die entsprechende Apparatur positioniert, welche mit 1x Tris/Glycin/SDS Buffer gefüllt wurde, und eine Spannung von 30 V angelegt.

2.2.3.4 Färben von SDS-Gelen

a) Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der Proteine nach der SDS-PAGE wurde SimplyBlue™ SafeStain. Die Protein-nachweisgrenze des darin enthaltenen Farbstoffs Coomassie G-250 lag bei 7 ng.

b) Silberfärbung

Die Protein-nachweisgrenze für Silber-gefärbte SDS-Gele liegt bei 0,1 ng, was die Detektion von sehr schwachen Proteinbanden, die mit der Coomassie-Färbung nicht nachweisbar sind, erlaubt [Blum *et al.*, 1987].

Inkubationsschritt	Dauer	Verwendete Substanzen
Fixieren	1h bis üN	50% (v/v) Methanol 12% (v/v) Eisessig 0,037% (v/v) Formaldehyd
Waschen	2-mal 10 min 1-mal 10 min	50% (v/v) Ethanol 30% (v/v) Ethanol
Sensitivieren	60 s	0,8 mM Natrium-Thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$)
Waschen	3-mal 20 s	ddH ₂ O
Imprägnieren	20 min	12 mM Silbernitrat (AgNO_3) 0,025 % (v/v) Formaldehyd
Waschen	3-mal 20 s	ddH ₂ O
Entwickeln	Bis gewünschtes Färberesultat erzielt ist	566 mM Natriumcarbonat (Na_2CO_3) 25 µM Natrium-Thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$) 0,037% (v/v) Formaldehyd
Waschen	2-mal 2 min	ddH ₂ O
Stoppen	15 min	50% (v/v) Eisessig
Waschen	3-mal 10min	H ₂ O

2.2.3.5 Western Blot (Nasstransfer-Methode) und immunchemische Detektion

Mit Hilfe eines Western Blots wurden Proteine nach einer SDS-PAGE vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Vor dem Transfer wurden das Gel und die Membran für 5 min im Transfer-Puffer (10% 10x Tris/Glycin Puffer, 20% Methanol) kubiert. Der Aufbau des Blots ist in Abb. 14 dargestellt [Towbin *et al.*, 1979]:

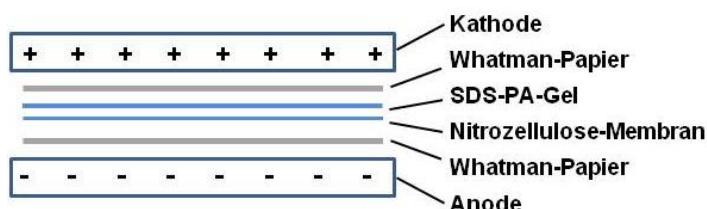


Abb. 14: Aufbau des Western Blots in der Blotting Apparatur.

Der Blot wurde bei 1 mA pro cm² Gel für 1 h durchgeführt, wobei sich der gesamte Aufbau stets im Transfer-Puffer befand. Für die nachfolgende Analyse wurde folgendes Protokoll verwendet:

Inkubationsschritt	Dauer	Verwendete Substanzen
Waschen	3-mal 2 min	TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6)
Ponceau-Färbung	2 min	0,66 mM Ponceau-S in 1% Essigsäure (v/v)
Waschen	2-mal 10 s, dann 3-mal 5 min	TBS/T (0,1% Tween-20 (v/v) in TBS)
Blockieren	90 min	5% Magermilchpulver in TBS/T
Waschen	2-mal 10 s, dann 3-mal 5 min	TBS/T
Primär-Antikörper	Über Nacht (4°C)	Antikörper in 1% Magermilchpulver in TBS/T
Waschen	2-mal 10 s, dann 3-mal 5 min	TBS/T
Sekundär-Antikörper	60 min	Antikörper in 1% Magermilchpulver in TBS/T
Waschen	2-mal 10 s, dann 3-mal 5 min 2-mal 5 min	TBS/T TBS
Entwickeln	1 bis 60 min	ECL Western Blotting Detection Reagent

2.2.3.6 Luciferase-Assay

Als Transfektions- und Translationskontrolle für Plasmide mit CCL21a-(Teil-)Sequenz dienten Vektoren, die für die *Firefly*-Luciferase [De Wet *et al.*, 1987] bzw. ein entsprechendes CCL21-Luciferase-Fusionsprotein kodierten (vgl. 2.2.2.5). Nach Transfektion der betreffenden Konstrukte, sowie Induktion und Zellernte (vgl. 2.2.6) wurde für den Luciferase-Assay die Gesamtzellzahl pro Ansatz auf 10.000 Zellen genormt. Die Zellen wurden in 50 µl Passiv Lysis Buffer aus dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System aufgenommen für 10 min inkubiert. Das Lysat wurde in einer 96-Well-Microtiterplatte vorgelegt und mit 100 µl rekonstituiertem Luciferase Assay Reagent II versetzt. Die Lumineszenz wurde sofort im Anschluss am Luminometer (Infinite® 200 PRO series) gemessen.

2.2.3.7 Kreatinin-Assay

Zur Bestimmung des Kreatinins in Urin und Serum wurde das Creatinin-Kit LT-Sys Creatinin PAP, flüssig verwendet. Das Prinzip der Messung beruht auf der enzymatischen Umsetzung von Kreatinin über mehrere Schritte und Zwischenprodukte zu H₂O₂, welches mit EHSPT (N-Ethyl-N-(2-Hydroxy-3-sulfopropyl)-m-Tolidin) und 4-Aminoantipyrin zu Chinonimin reagiert. Chinonimin als Polyyverbindungen hat sein Absorptionsmaximum bei 510 nm. Gemessen wurde die bathochrome Änderung der Absorption, welche proportional zum entstehenden Reaktionsprodukt stieg [Fossati *et al.*, 1983].

Es wurden 10 µl Urin in einer 1:25-Verdünnung bzw. 20 µl Serum in einer 1:3-Verdünnung, sowie entsprechende Volumina des Kreatinin-Standards für die Eichgerade (0 bis 2 mg/dl) in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 200 µl Reagent 1 versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min für Urin und 2 min für Serum bei je 37°C wurde die Absorption bei 546 nm am ELISA-Reader gemessen. Sofort im Anschluss wurden pro Probe 40 µl Reagent 2 hinzugefügt und wieder bei 37°C für 20 min (Urin) bzw. 2 min (Serum) inkubiert, bevor erneut die Absorption bei 546 nm bestimmt wurde.

2.2.3.8 Albumin-ELISA

Ein ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*) stellt ein Nachweisverfahren dar, um u. a. Proteine zu detektieren und ihre Konzentration zu bestimmen. Im Fall des Albumin-ELISAs erfolgte die Albuminbestimmung in Urin und Serum durch das Mouse Albumin ELISA Quantification Set. Die verwendeten Verdünnungen der mitgelieferten Antikörper waren 1:100 für den Affinity purified Mouse Albumin Coating Antibody und 1:40000 für den HRP Conjugated Mouse Albumin Detection Antibody. Urine wurden auf ein Fünfhundertstel ihrer Ausgangskonzentration verdünnt, Seren auf ein Fünftausendstel.

2.2.4 (Immun-) Histochemische Methoden

2.2.4.1 Vorbereitungen und Allgemeines

Die entnommenen Organe wurden nach der Entnahme für eine Woche in 4% PFA (para-Formaldehyd) in PBS (*phosphate buffered saline*), pH 7,4 fixiert (vgl. 2.2.7) und anschließend im Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Regensburg) nach Standardmethoden entwässert, imprägniert und in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden 1 µm (Sirius Rot und Silberfärbung) bzw. 3 µm (PAS und (Fluoreszenz-)immunhistochemische Färbungen) dicke Schnitte angefertigt, die auf Objektträger aufgezogen wurden und für 24 h bei 37°C trockneten. Vor jeder Färbung wurden die Schnitte folgendermaßen entparaffiniert und rehydriert:

Inkubationsschritt	Dauer	Verwendete Substanzen
Entparaffierung	2-mal 5 min	Roti®-Histol
Absteigende Alkoholreihe	2-mal 5 min 2-mal 3 min 1 min	100% Ethanol 95% (v/v) Ethanol 70% (v/v) Ethanol
Rehydrierung	5 min	ddH ₂ O

Um die Gewebestrukturen besser erkennbar zu machen, wurden die Schnitte nach den (immun-) histochemischen Färbungen gegengefärbt, gewaschen, dehydriert und schließlich unter Verwendung eines wasserfreien Einschlussmittels eingedeckt. Je nach gewünschter Gegenfärbung wurde eines der folgenden Protokolle durchgeführt. Im Fall einer Fluoreszenz-immunhistochemischen Färbung erfolgte das Eindecken unmittelbar nach dem letzten Waschschnitt mittels eines wasserlöslichen Einschlussmittel, welches zusätzlich den DNA-Marker 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Kernfärbung enthielt.

	Mayer's Hämalaun		Nuclear Fast Red		Fast Green	
Inkubations-schritt	Dauer	Verwendete Substanzen	Dauer	Verwendete Substanzen	Dauer	Verwendete Substanzen
Gegenfärbung	2 min	Mayer's Hämalaun	2 min	Nuclear Fast Red	3 min	0,25 mM Fast Green
Bläuen	10 min	Fließendes Leitungswasser	---	---	---	---
Waschen	1 min ddH ₂ O				3-mal 1 s	Aceton
Dehydrieren: absteigende Alkoholreihe	1 min 70% (v/v) Ethanol 2-mal 3 min 95% (v/v) Ethanol 2-mal 5 min 100% Ethanol				---	---
Dehydrieren: Aceton	---	---	---	---	2-mal 1 s	Aceton
Vollständig Dehydrieren	2-mal 5 min Roti®-Histol					
Eindecken	Roti®-Histokitt					

2.2.4.2 Perjodsäure-Schiff-Färbung

Die Perjodsäure-Schiff-Färbung (*periodic acid Schiff*, PAS) basiert auf der spezifischen Redox-Reaktion der Perjodsäure mit den 1,2-Hydroxylgruppen von Glykolen. Die dabei entstehenden Aldehydgruppen bewirken in Anwesenheit des Schiff-Reagenz eine Purpurfärbung. Als PAS-positiv gelten Kohlenhydrate als charakteristische Träger von 1,2- Hydroxylgruppen und die aus ihnen gebildeten Moleküle und Strukturen: Polysaccharide, Kollagen, Glykogen, sowie Muko- und Glykoproteine, genauso Glyko- und Phospholipide und Basalmembranen [McManus *et al.*, 1948].

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wurde die PAS-Färbung mit anschließender Hämatoxylin-Gegenfärbung nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Inkubationsschritt	Dauer	Verwendete Substanzen
Oxidation	10 min	44 mM Perjodsäure (H ₅ IO ₆)
Waschen	10 min 2-mal 2 min	Fließendes Leitungswasser ddH ₂ O
Färbereaktion	15 min	Schiff's Reagenz
Waschen	5-min 1 min	Lauwarmes Leitungswasser ddH ₂ O

2.2.4.3 Sirius-Rot-Färbung

Der histologische Nachweis von Kollagen erfolgte über den Farbstoff Sirius Rot, welcher über charakteristische Sulfonsäuregruppen verfügt, die im Sauren an die basischen Aminosäuren (Lysin, Hydroxylysin und Arginin) des Collagens binden [Junqueira *et al.*, 1979].

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebsschnitte wurde die Färbung durch eine einstündige Inkubation in 0,73 mM Direct Red 80, 0,25 mM Fast Green in 1,2% Pikrinsäure durchgeführt. Zum Waschen und Dehydrieren wurden die Schnitte je für 3-mal 1 s in Aceton überführt. Nach dem vollständigen Dehydrieren in 2-mal 5 min Roti®-Histol wurde mit Roti®-Histokitt eingedeckt.

2.2.4.4 Modifizierte Silberfärbung nach Jones

Bei der Silberfärbung nach Jones wurden argyophile Strukturen wie Basalmembranen silberimprägniert. Dabei wurden durch Vorbehandlung mit Perjodsäure 1,2-Hydroxylgruppen von Glykolen zu Aldehyden oxidiert, die ihrerseits das Ausfällen von metallischem Silber in Form eines bräunlichen Niederschlags bewirkten. Im Anschluss wurde die bräunliche Färbung durch Goldchlorid schwarz getönt und mit Natrium-Thiosulfat fixiert [Jones, 1957].

Vor der Silberfärbung wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert, nach der Silberfärbung wurde mit Fast Green gegengefärbt, dehydriert und eingedeckt.

Inkubationsschritt	Dauer	Verwendete Substanzen
Oxidation	5 min	44 mM Perjodsäure (H_5IO_6)
Waschen	5 min	ddH ₂ O
Sensitivieren	5 min	55 mM Thiosemicarbazid (CH_5N_3S)
Waschen: RT 60°C	5 min 5 min	ddH ₂ O ddH ₂ O
Imprägnieren bei 60°C	5 min	185 mM Methenamin (Hexamethylentetramin, $C_6H_{12}N_4$) 12,75 mM Silbernitrat ($AgNO_3$) 13 mM Natrium-Tetraborat ($Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$)
Waschen bei 60°C	3-mal 2 min	ddH ₂ O
Tönen	3 min	8,25 mM Goldchlorid ($AuCl_3$)
Waschen	5 min	ddH ₂ O
Stoppen	3 min	190 mM Natrium-Thiosulfat ($Na_2S_2O_3 \times 5 H_2O$)
Waschen	5 min	Fließendes Leitungswasser

2.2.4.5 Immunhistochemische und Fluoreszenz-immunhistochemische Färbungen

a) Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden indirekt durch die *labelled* Avidin-Biotin-Methode durchgeführt. Die Markierung der Proteine erfolgte dabei unter Verwendung eines unkonjugierten Primärantikörpers gegen das entsprechende Zielprotein, gefolgt von einem biotinylierten, gegen die Ursprungsspezies des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper, an dessen Biotinkonjugat ein Komplex aus (Strept-)Avidin, Biotin und Peroxidase (*horseradish peroxidase*) bzw. alkalischer Phosphatase band. Durch Verwendung des entsprechenden Substrats entstand ein sichtbarer Niederschlag. Im Fall der Peroxidase fungierte als Substrat eine Lösung aus 3,3`Diaminobenzidin in PBS (zur Signalverstärkung: 3,75 mM NiCl₂*6H₂O), im Fall der alkalischen Phosphatase eine Entwicklerlösung bestehend aus 550 µM NBT, 400 µM BCIP und 1 mM Levamisol in 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5.

In Abhängigkeit vom verwendeten Primärantikörper (vgl. Tabelle 5) war es z. T. nötig, die Epitope der Antigene mittels Tischautoklav zu demaskieren (*Antigen Retrieval*). Im Falle eines *Antigen Retrievals* unter sauren Bedingungen wurden die Präparate in Antigen Unmasking Solution für 30 s bei 125°C

behandelt. Die Antigendemaskierung unter alkalischen Bedingungen wurde in 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,05% Tween-20, pH 9,0 für 30 min bei 95°C durchgeführt.

Zur Minimierung des unspezifischen Hintergrundes wurde endogenes Biotin durch Zugabe von Avidin blockiert. Die auf diese Weise entstandenen Avidin-Bindestellen wurden durch Inkubation mit Biotin gesättigt. Um unspezifische Antikörperbindestellen zu blockieren wurde das Gewebe zusätzlich entweder mit Superblock® Blocking Buffer oder einem Puffer bestehend aus 10% *Normal Horse Serum* und 1% Albumin, IgG-frei (*Bovine Serum Albumin*, BSA), in PBS behandelt. In Abhängigkeit vom Enzym im (Strept-) Avidin-Biotin-Enzymkomplex wurden zudem die endogenen Peroxidasen (3% H₂O₂ in Methanol) bzw. Phosphatasen (Hitzeschritt und/oder 1 mM Levamisol in der Substratlösung) blockiert.

b) Fluoreszenz-immunhistochemische Färbungen

Das Prozedere der Fluoreszenz-immunhistochemischen Färbung entsprach hinsichtlich des Demaskierens der Epitope und der Reduktion der unspezifischen Hintergrundfärbung dem der immunhistochemischen Färbung. Zur Detektion des Zielproteins wurde ein Fluoreszenz-gekoppelter anti-Streptavidin-Antikörper verwendet, der an den biotinylierten Sekundärantikörper band (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die IHC-Färbungen mit Beschreibung des durchgeführten Antigen Retrievals, der verwendeten Blockierungslösung und dem zur Detektion verwendeten konjugierten Enzym bzw. Fluoreszenzfarbstoff

Färbung Gegen	Primär-Antikörper	Antigen Tetriaval	Blockierungs-lösung	(Strept-) Avidin-Biotin-Konjugat
CCL21	Mouse CL21/6Ckine Antibody	S	Superblock	AP
CCR7	CCR7 Antibody	A	NHS/BSA	AP
PDGFR-β	PDGF Receptor beta Antibody	S	NHS/BSA	HRP
Mac-2	Anti-Mouse/Human MAC-2	S	Superblock	HRP
IgA	Mouse IgA Antibody	A	NHS/BSA	Alexa 594
IgM	Mouse IgM Antibody	---	NHS/BSA	Alexa 594

A: Alkalisches antigen retrieval bei 95°C für 30 min; S: Saures Antigen Retrieval bei 125°C für 30s; NHS/BSA: 10% *Normal Horse Serum*, 1% *Bovine Serum Albumin* in PBS; HRP: Peroxidase (*horseradisch peroxidase*); AP: alkalische Phosphatase; Alexa 594: Fluoreszenzfarbstoff Alexa 594.

2.2.4.6 Morphometrische Analysen

Ziel der morphometrischen Analysen war es den genauen glomerulären Anteil an PAS-positivem Material, Kollagen bzw. der Silber-imprägnierten Flächen zu ermitteln. Dazu wurden nach der jeweiligen histo-chemischen Färbung der Nierenpräparate je 20 Glomerula pro Tier geblendet fotografiert. Die Dokumentation erfolgte dabei über das Mikroskop AxioStar plus und die Software AxioVision Release 4.8.1 bei 400-facher Vergrößerung im Tiff-Format. Alle Bilder einer Färbung wurden unter identischen Bedingungen hinsichtlich der Justierungen am Mikroskop einerseits und der Software-Parameter Kontrast, Helligkeit und Farbwert andererseits aufgenommen.

Die Quantifizierungen wurden mit der Software HistoQuest durchgeführt. Zunächst wurden die Glomerula manuell als *region of interest* (ROI) definiert, wodurch basierend auf den Daten für die Skalierung die glomeruläre Fläche bestimmt werden konnte. In die Auswertung flossen ausschließlich die Entitäten ein, die innerhalb der ROIs lagen, unabhängig davon, ob sich das zu untersuchende Objekt (Glomerulum) vollständig oder nur teilweise innerhalb des ROIs befand. Entsprechend der vorangegangenen Histochemie wurde(n) die Farbschattierung(en) des Markers mittels des Rot-Grün-Blau-Farbraums (RGB-Farbraum) determiniert. Zudem wurde durch den Parameter *Sigma* die Spannweite der Schattierungen, die im RGB-Farbraum an die Schattierung des Markers angrenzen, festgelegt. Mit der Segmentierungsmethode *total area measurements* konnte die Größe der Fläche identifiziert werden, die innerhalb eines ROIs die Farbschattierung(en) des Markers aufwies.

Die für PAS-, Sirius Rot- und Silberfärbung verwendeten Farbschattierungen mit dem entsprechenden *Sigma* sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Farbschattierungen, definiert durch die jeweiligen Rot-, Grün- und Blautöne, sowie dem entsprechenden *Sigma* zur morphometrischen Analyse der histochemischen Färbungen

PAS				
Farbschattierung	Rot	Grün	Blau	<i>Sigma</i>
1	124	0	56	75* bzw. 100**
2	148	25	91	75* bzw. 50**
3	161	53	117	75* bzw. 50**
Sirius Rot				
1	202	41	61	200
2	119	0	7	400
3	170	69	78	100
4	135	33	81	200
5	182	65	88	100
Silberfärbung				
1	23	1	35	500
2	66	29	71	50
3	102	41	91	50

* für 5, 10 und 15 Wochen-alten Tiere, ** für 20 und 30 Wochen-alte Tiere

2.2.4.7 Einzelzellanalyse

Mit der Einzelzellanalyse über die Software HistoQuest konnte innerhalb eines bestimmten Bereichs (*region of interest*) sowohl die Gesamtzahl der Zellen als auch den Anteil der Zellen ermittelt werden, die eine bestimmte Färbung aufwiesen. Voraussetzung dafür war eine immunhistochemische Markierung des Zielmoleküls mit anschließender Zellkern-Gegenfärbung. Danach wurden, wie in Punkt 2.4.6 beschrieben, zunächst pro Tier je 20 Glomerula geblendet dokumentiert, als ROI definiert und schließlich die Farbschattierungen für den Zellkernmarker Hämatoxylin bzw. für den Marker des Zielmoleküls festgelegt. Die genauen RGB-Werte, die die verwendeten Farbschattierungen definieren, sowie die dazugehörenden *Sigma*-Werte sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Der der Software zugrunde liegende Algorithmus ermöglichte es, Zellen über die Zellkern-Gegenfärbung von ihren Nachbarzellen abzugrenzen. Damit konnte die Anzahl der Zellen innerhalb eines ROIs bestimmt werden. Mittels der immunhistochemischen Markierung des Zielmoleküls konnten diejenigen Zellen identifiziert werden, die positiv für das Zielmolekül waren. In die Analysen einbezogen wurden alle Zellen, die ganz oder teilweise innerhalb eines ROIs lagen, bei der Segmentierungsmethode handelte es sich um *various shapes 2.0* [Ecker und Steiner, 2004]. Weitere Parameter zur genauen Festlegung der Einzelzellen waren die relative Zellkerngröße, Ausschlussgrößen für die Fläche und Färbungsintensität der Zellkerne und des Markers. Ferner wurden der innere und äußere Radius der Ringmaske (um den Zellkern) und die *identified cell mask* festgelegt.

Tabelle 7: Verwendete Farbschattierungen, definiert durch die jeweiligen Rot-, Grün- und Blautöne, sowie dem entsprechenden Sigma zur Einzelzellanalyse der IHC-Färbung gegen PDGFR- β

PDGFR- β -IHC bei 5 bis 15 Wochen-alten Tieren				
Farbschattierung	Rot	Grün	Blau	Sigma
1	104	59	106	250
2	153	117	155	250
3	185	147	177	250
PDGFR- β -IHC bei 20 und 30 Wochen-alten Tieren				
Farbschattierung	Rot	Grün	Blau	Sigma
1	122	43	47	120
2	126	72	80	120
3	160	102	98	12

2.2.5 Elektronenmikroskopie

Die Nieren von 20 und 30 Wochen-alten Mäusen wurden am Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Regensburg) elektronenmikroskopisch analysiert. Dazu wurden die Proben in Karnovsky-Lösung (2% PFA, 100 mM Dimethylarsinsäure Natrium-Trihydrat in 2,5 % Glutaraldehyd (v/v)) bei 4°C fixiert. Nach Standardmethoden des Labors wurden fixierte Gewebe osmirt, dehydriert und in das Epoxid-Kunstharz Epon 812 eingebettet. Die Untradünnnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert, bevor die Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop LEO912AB (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt wurden [Schröder *et al.*, 2005].

2.2.6 Zellkultur

2.2.6.1 Verwendete Zellen und allgemeine Kultivierungstechniken

Alle zellkulturspezifischen Arbeiten fanden unter der Sterilbank statt. Es wurden ausschließlich sterile Materialien und Substanzen verwendet. Bei den in den Zellkulturexperimenten verwendeten Zelllinien handelte es sich um *human embryonic kidney 293T cells* (HEK 293T) und *murine mesangial cells* (MMC), die beide bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert wurden. Die Zusammensetzung der verwendeten Kultur- und Kryomedien ist in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Inhaltsstoffe und Zusammensetzung der Kultur- und Kryomedien

Kulturmedien		Kryomedien
HEK 293T	MMC	HEK 293T und MMC
500 ml DMEM 41966	500 ml DMEM 21885	90 % FCS
50 ml FCS (<i>Fetal Calf Serum</i>)	12,5 ml FCS	10 % DMSO
5 ml Pen/Strep	5 ml Pen/Strep	(Dimethylsulfoxid)

Zum Subkultivieren der Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, mit PBS gewaschen und mit Trypsin behandelt. In Folge der Trypsinbehandlung lösten sich die Zell-Zellkontakte. Durch Zugabe des entsprechenden Kulturmediums konnte die Trypsinreaktion gestoppt und die Zellen konnten abgenommen werden. Zur Kryokonservierung wurden ca. 10^6 Zellen in 1 ml Kryomedium aufgenommen, über Nacht langsam auf -80°C abgekühlt und anschließend in flüssigem N₂ aufbewahrt. Je nach Fragestellung wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

2.2.6.2 Transfektion und Induktion der Genexpression

Zweck einer Transfektion ist das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen. Dies erfolgte hier mit Hilfe des Transfektionsreagens FuGene HighPerfect (Roche), welches zusammen mit der zu transfizierenden DNA einen kationischen DNA-Lipidkomplex ausbildete. Dieser Komplex kann über die Zellmembranen endozytiert werden. Somit gelangt die transfizierte DNA zunächst in das Zytosol und später in den Zellkern, wo die Transkription erfolgt.

Ausgangsvektoren für die Plasmide in den Transfektions- und Genexpressionsexperimenten waren der pTRE-tight- (Clontech) bzw. der pEGFP-N1-Vektor. Beide Vektoren verfügten über eine *multiple cloning site* (MCS), in die entsprechende Zielgene kloniert wurden. Da Zielgene im pEGFP-N1-Vektor unter der Kontrolle eines starken CMV-Promotors (Cytomegalievirus) stehen, werden sie nach der Transfektion konstitutiv exprimiert und bedürfen keiner weiteren Expressionsinduktion. Im Gegensatz dazu musste bei Transfektionen von Plasmiden, deren DNA-Sequenz auf dem Rückgrat des pTRE tight-Vektors (Clontech) basierte, simultan der Vektor pTet-On-Advanced cotransfiziert werden. Dieser kodiert für das rtTA-Element (*reverse tetracycline-controlled transcriptional activator*), ohne das die Doxycyclin-abhängige Expressionsinduktion des Zielgens nicht möglich ist. In diesem Fall wurde 24 Stunden nach der Co-Transfektion mit Doxycyclin induziert.

Bei der Transfektion selbst wurde der bzw. die Vektor/en in serumfreiem Medium mit FuGene HighPerfect gemischt und zur Ausbildung des Transfektionskomplexes für 30 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde anschließend tropfenweise auf die kultivierten, zu ca. 75 % konfluenten Zellen gegeben. Der Ansatz wurde nach vorsichtigem Schwenken über Nacht unter den genannten Bedingungen inkubiert. Am Folgetag wurde das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt. 24 Stunden nach der Transfektion wurde, wenn nötig, die Genexpression induziert. In Tabelle 9 und Tabelle 10 sind die verwendeten Mengen an DNA, serumfreiem Medium und FuGene für einen Ansatz im 6-Lochplattenformat aufgelistet. Plasmide, die auf dem pTRE-tight-Vektor-Rückgrat basieren, werden als pTRE-tight-

Abkömmlinge bezeichnet. Entsprechendes gilt für den pEGFP-N1-Vektor mit seinen pEGFP-N1-Abkömmlingen.

Tabelle 9: Transfektionsansatz für das Doxycyclin-abhängige System der Luciferase-Vektoren

Substanz	Menge
pTRE-tight-Abkömmling	1 µg
pTet-On-Advanced	1 µg
Serumfreies Medium	ad. 100 µl
FuGene HighPerfect	4 µl

Tabelle 10: Transfektionsansatz für das Doxycyclin-unabhängige System der GFP-Vektoren

Substanz	Menge
pEGFP-N1-Abkömmling	1 µg
Serumfreies Medium	ad. 100 µl
FuGene HighPerfect	3 µl

2.2.7 Mäuse

2.2.7.1 Mausmodell und Tierhaltung

Zur Untersuchung der CCR7-Defizienz wurden Mäuse des Stamms B6.129P2-Ccr7^{tm1Dgen}/J (CCR7^{-/-}) verwendet. Dieser funktionelle Knock-out wurde von Förster *et al.* [1999] generiert, indem das dritte Exon der CCR7-Sequenz in embryonalen Stammzellen der Mauslinie 129P2/OlaHsd teilweise durch eine Neomycinresistenz ersetzt wurde. Nach Injektion dieser Stammzellen in Blastozysten aus BALB/c-Mäusen wurden die entstandenen Knock-out Tiere über acht Generationen in den Maustamm C57BL/6J (WT) zurückgekreuzt. Je zwei Zuchtpaare mit dem Genotyp CCR7^{-/-} und WT, die als Kontrolltiere dienten, wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

Alle Tiere wurden in Standardkäfigen in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus gehalten, wobei sie freien Zugang zu Wasser und pelletiertem Standardfutter hatten. In jedem Käfig befanden sich 2 bis 5 Tiere. Um Nachwuchs zu generieren, wurden 2 bis 4 Weibchen mit einem Männchen in einem Käfig gehalten. Die Nachkommen wurden 21 Tage nach der Geburt von den Müttern separiert.

2.2.7.2 Gewinnung von Nieren aus Embryonen und postpartalen Mäusen

Um das Alter der Embryonen exakt bestimmen zu können, wurden zwei bis vier Weibchen zeitlich kontrolliert für 12 Stunden mit einem Männchen verpaart und schließlich wieder getrennt. Auf Basis des 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus und ihrer Nachtaktivität wurde angenommen, dass die Kopulation in der zweiten Nachthälfte erfolgte. Damit stellte der Tag nach der Verpaarung den Tag 0.5 der Embryonalentwicklung dar (E0.5). Bei erfolgter Befruchtung konnte durch Gewichtskontrolle der Mäuse ca. ab dem 10. Tag nach der Begattung eine Schwangerschaft eindeutig festgestellt werden [Hau und Skovgaard Jensen, 1987].

Für die Analysen wurden die Nieren aus Embryonen zwischen E14.5 und E18.5 gewonnen. Zur Isolierung der Embryonen wurden trächtige Weibchen am entsprechenden Tag mit Isofluran anästhesiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Nach Entnahme des Uterus wurden die Nieren aus den Embryonen heraus präpariert und je nach späterer Verwendung in 4% PFA/PBS fixiert bzw. in flüssigem N₂ schockgefroren und anschließend bei -80°C konserviert.

Für mRNA Expressionsanalysen wurden die neugeborenen Mäuse 1, 2, 3, 5, 7, 10 und 14 Tage *post-partum* (pp1, etc.) durch Dekapitation getötet. Nach Isolierung der Nieren wurden diese in flüssigem N₂ schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Die immunhistochemischen Untersuchen wurden an Nierengewebe von 2, 5 und 10 Tage-alten Mäusen durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse durch Injektion von 20 µl 4,3% Ketamin/0,3% Xylazin in 0,9% NaCl anästhesiert und intrakardial mit 5 U/ml Heparin in HBSS perfundiert. Die präparierten Nieren wurden in 4% PFA/PBS fixiert, nach Standardmethoden dehydriert und in Paraffin eingebettet.

2.2.7.3 Gewinnung von Sammelurin, Blut und Durchführung von Perfusion und Organentnahme bei adulten Tieren

Bevor von 5, 10, 15, 20 und 30 Wochen-alten männlichen CCR7^{-/-} und WT Mäusen die Organe explantiert wurden, wurden die Tiere einzeln für 24 Stunden in metabolischen Käfigen gehalten. Der gesammelte Urin wurde für 1 min bei rpm max. in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach Bestimmen des Urinvolumens wurde der Urin bei -20°C aufbewahrt.

Am Tag der Organentnahme wurden die betreffenden Tiere mit Isofluran anästhesiert und gewogen. Nach Eröffnen von Bauchdecke und Thorax wurde Blut über den rechten Ventrikel abgenommen. Anschließend wurde kardial mit 5 U/ml Heparin in HBSS bei einer Flussgeschwindigkeit von 16,65 ml/min perfundiert. Neben den Nieren wurden auch Herz, Milz, Leber und Lunge entnommen, wobei je Organ zwei Gewebsstücke für spätere mRNA und Proteinanalysen in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt und ein Gewebsstück in 4% PFA/PBS fixiert wurde.

Bei dem zuvor abgenommenen Blut handelte es sich um EDTA-Blut, das für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert wurde, wodurch das Serum im Überstand vom Blutkuchen separiert werden konnte. Beide wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.7.4 Blutdruckmessungen bei Mäusen

Die Blutdruckmessungen erfolgten mittels der *Tail Cuff*-Methode. Dabei wurden fixierten Mäusen Manschetten an den Schwanz angelegt, mit denen sowohl der systolische als auch diastolische Blutdruck in der Schwanzarterie gemessen und der sich daraus ergebende mittlere Blutdruck bestimmt wurde. Es folgten 20 aufeinander folgende Messungen, die an mehreren Tagen hintereinander immer zur selben Uhrzeit durchgeführt wurden.

2.2.8 Statistik und Darstellung der Ergebnisse

Zur statistischen Datenanalyse wurde die Software IBM SPSS Statistics Version 21 verwendet. Das Signifikanzniveau lag unabhängig vom verwendeten Testverfahren und sofern nicht anders beschrieben bei 0,05.

Zunächst wurde der Signifikanztest nach Shapiro und Wilk [1965] hinsichtlich der statistischen Normalverteilung der Stichproben (Messwerte) innerhalb der einzelnen Gruppen durchgeführt. Der Shapiro-Wilk-Test stellte den Test der Wahl dar, da er über eine hohe Teststärke auch bei kleinen Grup-

pengrößen verfügte. Entsprechend des Signifikanztests nach Levene [1960] wurden zudem die Varianzen innerhalb der Gruppen auf ihre Gleichheit hin untersucht.

Neben der Normalverteilung stellte die Unabhängigkeit der Stichproben die Voraussetzung für eine einfaktorielle ANOVA (*analysis of variance*, Varianzanalyse) dar. Homogenität bzw. Heterogenität der Varianzen sowie die gegebene Ungleichheit der Gruppengrößen und die Anzahl der zu vergleichenden Gruppen waren die Kriterien für die Wahl des Post-Hoc-Mehrfachvergleichs. Auf diesen Bedingungen basierend wurden die Mittelwerte der Gruppen im Falle der Homogenität der Varianzen mit dem Post-Hoc-Mehrfachvergleich Tukey-Kramer verglichen, im Falle der Heterogenität der Varianzen der Post-Hoc-Mehrfachvergleich nach Games-Howell. Normalverteilte Daten erlaubten eine Darstellung über die Berechnung des Mittelwerts (MW), die Varianz innerhalb einer Gruppe wurde durch die Standardabweichung (SD) charakterisiert. Zudem können normalverteilte Daten aber auch mittels Boxplot dargestellt werden. In diesem Fall musste die Statistik angepasst und die Daten wie nicht-normalverteilte Daten analysiert werden.

Zur statistischen Analyse von metrischen aber nicht-normalverteilten Daten bzw. von Daten, die eine Darstellung mittels Mediane erforderten, wurde eine einfaktorielle ANOVA nach Kruskal und Wallis [1952] für unabhängige Stichproben durchgeführt. Konnte die Nullhypothese, dass die Medianwerte in den Gruppen gleich sind, abgelehnt werden, wurden alle Mediane [Mann und Whitney, 1947] sukzessiv im nicht-parametrischen Test für zwei unabhängige Stichproben nach Mann-Whitney-U auf ihre statistische Ungleichheit hin untersucht. Diese Daten werden durch Boxplots repräsentiert, wobei sich der Median innerhalb der Box befindet und das 25 bzw. 75 %-Perzentil durch den unteren bzw. oberen Rand der Box dargestellt werden. Die untere und obere Antenne kennzeichnen das 5 bzw. 95 %-Perzentil. Werte außerhalb der 5 und 95 %-Perzentile („Ausreißer“) wurden nicht berücksichtigt. Alternativ wurden die Einzelwerte mit dem Gruppenmedian dargestellt.

Für ordinale Daten, wie sie im Fall einer Bewertung mittels Score generiert werden, wurden Kreuztabellen erstellt, mit deren Hilfe die Verteilung der Scores zwischen den Gruppen statistisch via Chi-Quadrat-Test verglichen werden konnte. Bei mehr als zwei Gruppen wurde die Verteilung der Scores zunächst über alle Gruppen analysiert. Konnte eine Ungleichverteilung festgestellt werden, wurden im Anschluss alle Gruppen paarweise mittels Chi-Quadrat-Test verglichen.

Ergebnisse

3 Ergebnisse

Ziel dieser Promotion war es, die Bedeutung von Chemokinen für die renale Entwicklung, Funktion und Morphologie – also unter nicht-inflammatorischen Bedingungen – zu untersuchen. Dazu wurde zunächst der Nachweis der renalen CCR7- und CCL21-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erbracht. Basierend auf diesen Daten stellte die Analyse des renalen Phänotyps von CCR7-defizienten Mäusen verschiedenen Alters den nächsten Schritt dar. Das Gegenexperiment zur Analyse CCR7-defizienter Tiere war das Generieren einer transgenen Maus, bei der lokal im Glomerulum eine CCL21-Überexpression induziert werden kann. Ferner wurden Zellkulturexperimente durchgeführt, um *in vitro* mögliche Regulationsmechanismen zu klären.

3.1 Nachweis der renalen CCR7- und CCL21-Expression auf mRNA- und Protein-ebene

Im Folgenden wurde zunächst die mRNA- dann die Proteinexpression von CCR7 und CCL21 in der Niere untersucht. In diesen Analysen wurde mRNA bzw. histologische Nierenpräparate von murinen Embryonen, sowie postpartalen und adulten Mäusen verwendet, um einen möglichst lückenlosen Zeitverlauf der jeweiligen Expression beschreiben zu können.

3.1.1 CCR7 und CCL21 mRNA-Expression in Embryonen, postpartalen und adulten Mäusen

Die Untersuchung der renalen CCR7 und CCL21 mRNA-Expression über den Zeitraum vom Embryonalstadium und postpartaler Entwicklungsphase bis zu 30 Wochen-alten adulten Tieren erfolgte mittels quantitativer PCR (qPCR). Die hierfür verwendete cDNA wurde durch reverse Transkription von RNA, die aus den entsprechenden Nierengeweben isoliert wurde, generiert. Die Expression des Chemokinrezeptors und seines Liganden wurde auf die Expression des *House Keeping Genes* Cyclophilin B (Peptidylprolyl-Isomerase B) kalibriert.

In Abb. 15 ist der Verlauf der renalen CCR7 bzw. CCL21 mRNA-Expression bei C57BL/6J-Mäusen (wildtyp-Mäuse, WT) an Tag 14.5 bis 18.5 der Embryonalentwicklung (E14.5, etc.) und an den Tagen 1, 2, 3, 5, 7, 10 und 14 *post partum* (pp1, etc.), sowie bei 5, 10, 15, 20 und 30 Wochen-alten adulten Tieren dargestellt. Sowohl Rezeptor als auch Ligand sind in allen Altersgruppen nachweisbar. Während die renale mRNA-Expression von CCR7 in der Embryogenese relativ unverändert ist, kommt es nach der Geburt zwischen dem ersten und 14. Tag *post partum* zu einem Anstieg der mRNA-Expression um den Faktor 6,5. Ab diesem Zeitpunkt bleibt die gemessene CCR7-mRNA erneut konstant. Die mRNA-Expression des CCR7-Liganden CCL21 steigt im Verlauf der embryonalen Nephrogenese zwischen E14.5 und E16.5 um den Faktor 5,4. Danach fällt das CCL21 mRNA-Expressionslevel in den letzten Tagen der Embryogenese und kurz nach der Geburt wieder auf das

Ausgangsniveau. Dieses Level bleibt bis pp14 konstant. In adulten Tieren kann erneut ein leichter Anstieg der CCL21-mRNA festgestellt werden.

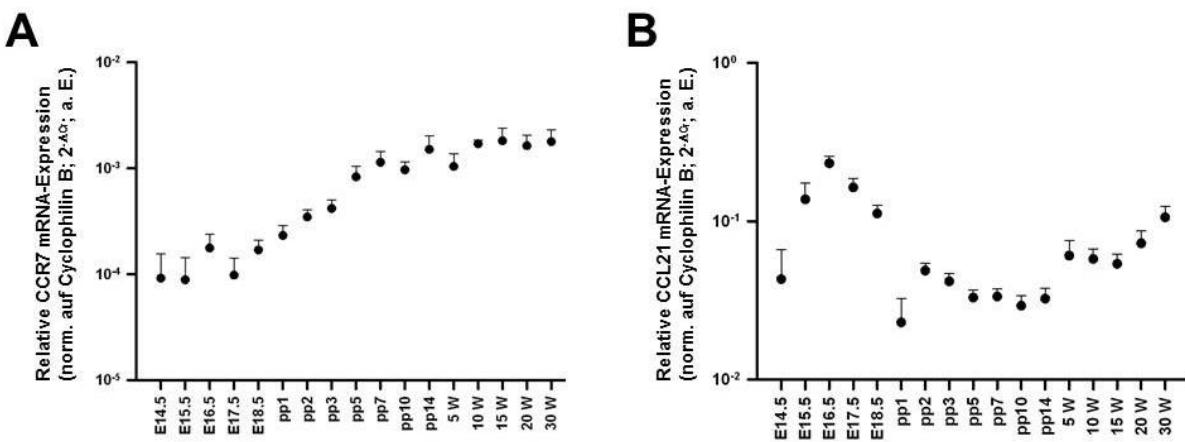


Abb. 15: Verlauf der CCR7 und CCL21 mRNA-Expression in Embryonen, sowie postpartalen und adulten Mäusen (alle WT). Abb. 15A zeigt die CCR7 mRNA-Expression, Abb. 15B die CCL21 mRNA-Expression. Die Expressionsquantität ist logarithmisch in arbiträren Einheiten (a. E.) durch den Mittelwert mit der Standardabweichung dargestellt. E14.5 bis E18.5: Embryonalstadium von Tag 14.5 bis 18.5; pp1 bis pp14: Tag 1 bis 14 post partum; 5 W bis 30 W: adulte Tiere im Alter von 5 bis 30 Wochen. Pro Altersgruppe wurden 5 bis 10 Tiere analysiert.

3.1.2 Immunhistochemische Lokalisation von CCR7 und CCL21

3.1.1.1 Immunhistochemischer Nachweis von CCR7

CCR7 wurde mittels Immunhistochemie auf Nierenpräparaten von murinen WT-Embryonen, sowie postnatalen und adulten WT-Mäusen lokalisiert. Die Verwendung von NBT und BCIP zur Detektion führte zu einer dunkelblauen Markierung aller CCR7-positiven renalen Strukturen. Zur roten Kerngegenfärbung wurde Nuclear Fast Red verwendet.

Das in Abb. 16 dargestellte Expressionsmuster von CCR7 verdeutlicht, dass der Chemokinrezeptor vor allem in der frühen Organogenese in distinkten renalen Strukturen exprimiert wird. Hier sind am Tag 14.5 der Embryonalentwicklung das metanephrogene Mesenchym und die Ureterknospe zu nennen. Im metanephrogenen Mesenchym wird CCR7 sowohl von mesenchymalen Stromazellen exprimiert als auch von den Zellen, die das kappenförmige Mesenchym formen und direkt an die Ureterknospe grenzen. Die Spitze der Ureterknospe stellt ebenfalls einen Expressionsort des Chemokinrezeptors dar. Ferner kann eine Polarität der CCR7-Expression hin zum Lumen der Ureterknospe festgestellt werden (vgl. Abb. 16A). Dieses ist auch an E17.5 deutlich CCR7-positiv, genauso wie die renalen Vesikel und die Komma-förmigen Körperchen. Wie im Fall der Ureterknospe kann auch beim renalen Vesikel eine luminale Expressionspolarität identifiziert werden (vgl. Abb. 16B). Auch nach der Geburt kann CCR7 in der sich noch weiter entwickelnden Niere lokalisiert werden. Dabei stellt besonders der Kortex einen Ort hoher Expressionsstärke dar, weil hier noch immer Nephrone neu gebildet werden. In den reifenden renalen Strukturen an pp2 zeigt sich insbesondere in der Einstülpung des S-förmigen Körperchens eine deutliche Expression des Chemokinrezeptors (vgl. Abb. 16C). In der Glomerulogenese folgt auf die Phase des S-förmigen Körperchens das Kapillarschlingenstadium.

Dabei lokalisiert CCR7 vor allem im entstehenden Mesangium, wie am Beispiel eines Nierenpräparates einer 5 Tage-alten Maus erkennbar ist (vgl. Abb. 16D).

Während der Chemokinrezeptor in der embryonalen und postpartalen Nephrogenese über ein distinktes Expressionsmuster verfügt, geht dieses in der weiteren Entwicklung in ein diffuses Muster über. Zwar kann CCR7 weiterhin mesangial nachgewiesen werden, allerdings ist die Expression nicht auf Mesangialzellen beschränkt (vgl. Abb. 16E-J).

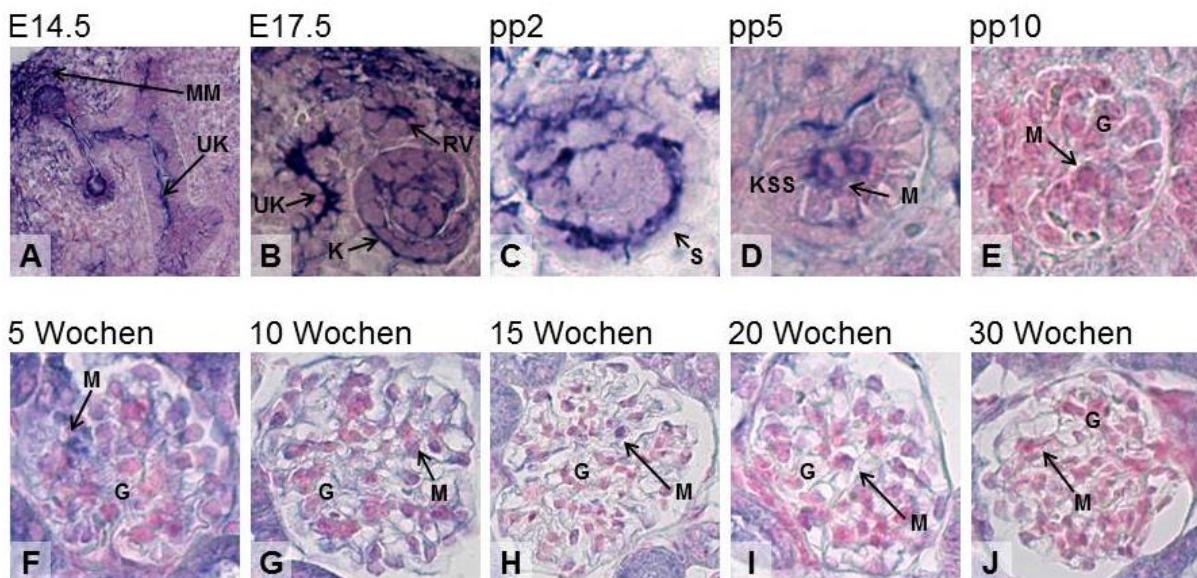


Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis von CCR7 im murinen Nierengewebe von der Embryonalentwicklung bis zum adulten Tier. CCR7-positive Strukturen sind blau, die Kerngegenfärbung ist rot, Pfeile weisen auf CCR7-Expressionsorte hin. Abb. 16A zeigt den Metanephros mit Ureterknospe (UK) und metanephrogenem Mesenchym (MM) an E14.5. Abb. 16B zeigt eine Ureterknospe, (U(K)), ein renales Vesikel (RV) und ein Komma-förmiges Körperchen (K) an Tag E17.5. In Abb. 16C ist S-förmiges Körperchen (S) an pp2 dargestellt. Abb. 16D zeigt an pp5 ein entstehendes Glomerulum im Kapillarschlingenstadium (KSS) mit mesangialer (M) CCR7-Expression. Abb. 16E repräsentiert ein junges Glomerulum (G) einer 10 Tage-alten Maus, wobei CCR7 mesangial exprimiert wird. Die Glomerula adulter Mäuse werden Abb. 16F-J gezeigt. In jedem untersuchten Alter von 5 bis 30 Wochen ist CCR7 glomerulär diffus verteilt exprimiert, aber auch mesangial (M) nachweisbar. Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung.

3.1.1.2 Immunhistochemischer Nachweis von CCL21

Die Lokalisation von CCL21 erfolgte analog zur Detektion von CCR7. Die verschiedenen CCL21-Expressionsmuster in den Entwicklungsstadien vor und nach der Geburt, sowie in adulten Tieren werden in Abb. 17 dargelegt. Hierbei zeigt sich, dass bereits an E14.5 der Ligand nachgewiesen werden kann. Als Expressionsorte sind die Ureterknospe und das metanephrogene Mesenchym zu nennen. Die Expressionsstärke stellt sich über die gesamte Ureterknospe einheitlich dar (vgl. Abb. 17A). Im Verlauf der Nephrogenese entstehen aus dem metanephrogenen Mesenchym sukzessiv die renalen Vesikel, sowie die Komma- und S-förmigen Körperchen. Diese sind sowohl in der embryonalen (vgl. Abb. 17B) als auch in der postpartalen (vgl. Abb. 17C) Nephrogenese positiv für CCL21. Dabei ist der Chemokinligand bereits in der Spalte des S-förmigen Körperchens erkennbar - dem Ort, an dem podozytäre Vorläuferzellen zu differenzieren beginnen. Wie beim CCL21-Rezeptor stellt auch hier der Cortex in der Phase um die Geburt den Ort der stärksten CCL21-Expression dar. Im Kapillarschlin-

genstadium ist der Ligand ebenfalls detektierbar. In diesem nimmt das Glomerulum langsam seine spätere Gestalt an, wobei CCL21 bereits auf den ersten differenzierten Podozyten nachgewiesen werden kann. Exemplarisch zeigt dies ein entstehendes Glomerulum im Kapillarschlingenstadium einer 5 Tage-alten Maus in Abb. 17D. Mit fortschreitender Entwicklung manifestiert sich ein spezifisch podozytäres Expressionsmuster, das an pp10 bereits klar erkennbar ist (vgl. Abb. 17E). CCL21 wird auf Podozyten konstitutiv exprimiert, da in allen Altersstufen von 5 bis 30 Wochen ein podozytäres Expressionsmuster nachgewiesen werden kann (vgl. Abb. 17F-J).

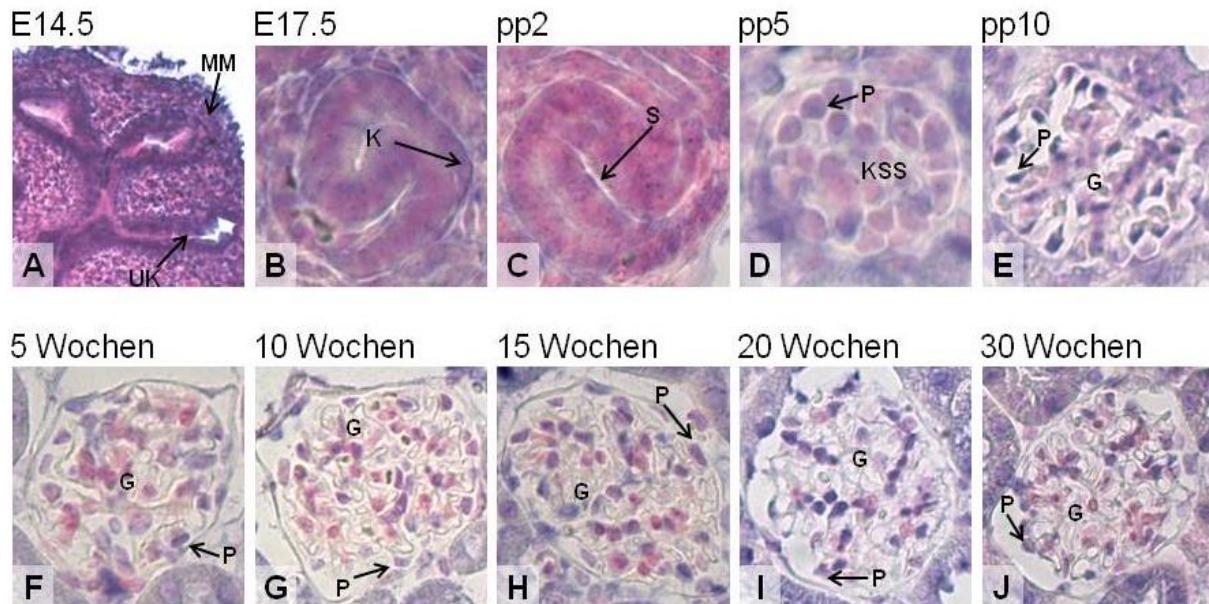


Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis von CCL21 im murinen Nierengewebe von der Embryonalentwicklung bis zum adulten Tier. CCL21-positive Strukturen sind blau, die Kerngegenfärbung ist rot, Pfeile weisen auf CCL21-Expressionsorte hin. Abb. 17A zeigt den Metanephros mit Ureterknospe (UK) und metanephrogenem Mesenchym (MM) an E14.5. Abb. 17B zeigt ein Komma-förmiges Körperchen (K) an Tag E17.5. In Abb. 17C ist ein S-förmiges Körperchen an pp2 dargestellt. Abb. 17D zeigt an pp5 ein entstehendes Glomerulum im Kapillarschlingenstadium (KSS) mit podozytärer (P) CCL21-Expression. Abb. 17E zeigt ein junges Glomerulum (G) einer 10 Tage-alten Maus, wobei CCL21 auf den Podozyten exprimiert wird. Die Glomerula adulter Mäuse werden durch Abb. 17F-J repräsentiert. In jedem untersuchten Alter von 5 bis 30 Wochen ist CCL21 podozytär nachweisbar (P). Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung.

3.2 Charakterisierung der CCR7^{-/-}-Maus

Aus der Tatsache, dass CCL21 wie auch sein Rezeptor CCR7 renal und insbesondere glomerulär sowohl in der embryonalen und postpartalen Entwicklung als auch in adulten Tieren exprimiert werden, ergab sich die Fragestellung nach der funktionellen bzw. morphologischen Bedeutung des Chemokinligand-/Rezeptorpaars für die Niere. Daher wurden 5, 10, 15, 20 und 30 Wochen-alten WT- und CCR7-defiziente (CCR7^{-/-} bzw. KO) Mäuse untersucht, um herauszufinden, welche Auswirkungen das Fehlen des Chemokinrezeptors auf renaler und vor allem glomerulärer Ebene nach sich zieht. Bei dieser Analyse wurde zunächst auf physiologische Parameter wie Gesamtkörpergewicht und Gewicht verschiedener Organe eingegangen. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung von Serum und Urin, sowie des Blutdrucks. Auf glomerulärer Ebene wurde die allgemeine glomeruläre Architektur, sowie die Bedeutung der CCR7-Defizienz speziell auf die mesangiale Zellularität analysiert. Weitere Arbeitspunkte waren die Veränderungen in den renalen mRNA-Expressionsmustern anderer Chemokine einerseits und die Beteiligung immunologischer Faktoren und Zellen am glomerulären Phänotyp andererseits.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte entsprechend der Art der erhobenen Daten mittels parametrischer oder nicht-parametrischer Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) oder mit Hilfe von Kreuztabellen und anschließenden Chi-Quadrat-Tests.

3.2.1 Physiologische Daten

Alle in diesem Punkt erhobenen Daten waren voneinander unabhängig und wurden in Form von Boxplots dargestellt, selbst wenn in allen Gruppen eine Normalverteilung vorlag. Daher wurde zur statistischen Analyse stets eine univariate nicht-parametrische ANOVA nach Kruskal-Wallis [1952] durchgeführt. Nach Feststellen der statistischen Ungleichheit der Gruppenmediane wurden alle Gruppen paarweise nach dem nicht-parametrischen Signifikanztest von Mann und Whitney [1947] analysiert.

3.2.1.1 Gesamtkörpergewicht und Gewichte der Organe in Relation zum Gesamtkörpergewicht

Von jeder WT- bzw. CCR7-defizienten Maus wurde das Gewicht von Körper und der entnommenen Organe erfasst. Um auszuschließen, dass aufgrund verschiedener Wachstumsgeschwindigkeiten ein Effekt der CCR7-Defizienz auf das Gewicht der verschiedenen Organe festgestellt wird, der nicht mit dem Fehlen von CCR7 sondern mit dem Gesamtkörpergewicht korreliert, wurde je Organ die Ratio des Gewichts des betreffenden Organs zum Gesamtkörpergewicht gebildet.

a) Körpermassen

Es konnte festgestellt werden, dass 5 Wochen-alte CCR7^{-/-}-Mäuse im Vergleich zum altersgleichen WT ein im Median um 33,8 % reduziertes Körpermassen aufwiesen. Während bei 10 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen der ebenfalls signifikante Unterschied zwischen den Genotypen noch 12,2 % beträgt,

gleicht sich das Körpergewicht bei 15 und 20 Wochen-alten Tieren an. Für 30 Wochen-alte Mäuse kann wieder eine signifikante Differenz zwischen WT- und $CCR7^{-/-}$ -Mäusen ermittelt werden. Verglichen mit 20 Wochen-alten Tieren desselben Genotyps bleibt bei $CCR7^{-/-}$ -Mäusen das Körpergewicht konstant, während der WT im Gruppenmedian 5,7 g zunimmt. Abb. 18 zeigt die Gewichte der einzelnen Tiere und den Gruppenmedian, Tabelle 11 das Ergebnis der statistischen Analyse.

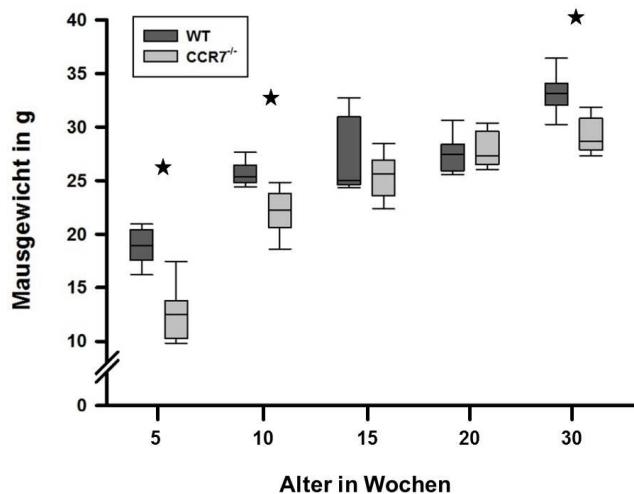


Abb. 18: Gesamtkörpergewicht bei 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und $CCR7^{-/-}$ - (hellgrau) Mäusen. Die Abbildung zeigt die einzelnen Gruppen mittels Boxplot mit 5, 25, 50, 75 und 95 % Perzentil. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet.

Tabelle 11: Statistische Analyse bzgl. des Körpergewichts von 5 bis 30 Wochen-alten WT- und $CCR7^{-/-}$ -Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO	**									
	WT	**	**								
10 W	KO	*	**	**							
	WT	**	**	n. s.	*						
15 W	KO	**	**	n. s.	*	n. s.					
	WT	**	***	*	***	n. s.	n. s.				
20 W	KO	**	***	*	***	n. s.	*	n. s.			
	WT	**	***	**	***	*	**	***	***		
30 W	KO	**	***	**	***	n. s.	**	n. s.	*	**	
	WT	**	***	**	***	n. s.	**	***	***		

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

b) Ratio von den Nierengewichten zum Gesamtkörpergewicht

Im Fall der Nieren wurde die Ratio vom Gewicht beider Nieren zum Gesamtkörpergewicht bestimmt. Wie in Abb. 19 dargestellt, liegt bei 5 Wochen-alten WT-Mäusen die Ratio im Median bei 16,4 mg/g. Während das Gewicht beider Nieren in Relation zum Gesamtkörpergewicht vorübergehen ansteigt und in der 10. Lebenswoche sein Maximum von 18,6 mg/g erreicht, sinkt es im Folgenden wieder auf zunächst 17,1 mg/g und schließlich auf 15,5 mg/g in der 20. Lebenswoche. Dieser Wert bleibt bei 30 Wochen-alten Tieren mit 15,7 mg/g nahezu unverändert. $CCR7^{-/-}$ -Mäuse im Alter von 5 bis 15 Wochen unterscheiden sich nicht signifikant vom WT (vgl. Tabelle 12). Hier wurden dem aufsteigenden Alter entsprechend Nieren-zu-Körper-Ratios von 17,0 sowie 19,2 bzw. 17,4 mg/g festgestellt. Im Gegensatz dazu verfügen 20 bzw. 30 Wochen-alte $CCR7^{-/-}$ -Mäuse mit 17,8 bzw. 19,7 mg/g über Ratios, die, verglichen mit dem altersgleichen WT, statistisch signifikant um 13 bzw. 20,4 % erhöht sind.

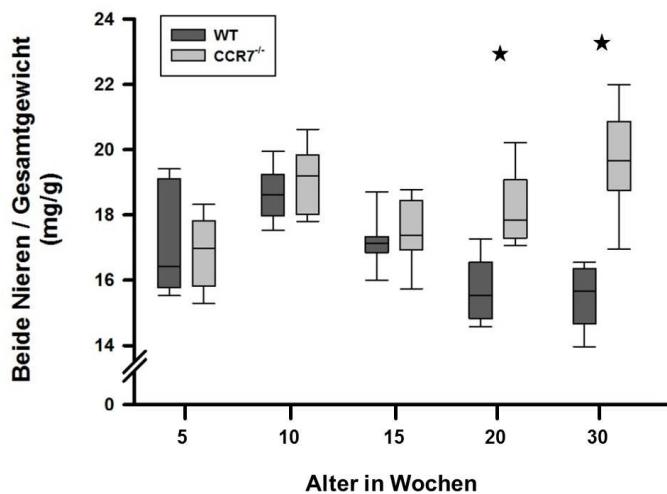


Abb. 19: Ratio vom Gewicht beider Nieren zum Gesamtkörpergewicht bei 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen. Die Abbildung zeigt die einzelnen Gruppen mittels Boxplot mit 5, 25, 50, 75 und 95 % Perzentil. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet

Tabelle 12: Statistische Analyse bzgl. der Ratio des Gewichts beider Nieren zum Gesamtkörpergewicht von 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO	n. s.									
	WT	n. s.	*								
10 W	KO	n. s.	**	n. s.							
	WT	n. s.	n. s.	*	**						
15 W	KO	n. s.	n. s.	*	*	n. s.					
	WT	n. s.	n. s.	**	**	*	**				
20 W	KO	n. s.	*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	**			
	WT	n. s.	*	**	***	**	**	n. s.	***		
30 W	KO	*	**	n. s.	n. s.	*	*	**	*	***	
	WT										

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

c) Ratio vom Milzgewicht zum Gesamtkörpergewicht

Die Gewichte der explantierten Milzen wurden ebenfalls in Relation zum entsprechenden Gesamtkörpergewicht gesetzt. Abb. 20 legt den Verlauf der Milz-zu-Körper-Ratio dar. Bei 5 Wochen-alten WT-Mäusen wurde im Median zunächst eine Ratio von 4,6 mg/g ermittelt. Danach fällt die Ratio sukzessiv bis zur 30. Lebenswoche von 3,3 über 3,0 mg/g auf 2,8 und schließlich 2,6 mg/g. Bei CCR7^{-/-}-Mäusen beschreibt die Ratio eine vergleichbare Kurve. Allerdings ist die Ratio im Alter von 5 Wochen mit 7,0 mg/g statistisch signifikant gegenüber der altersgleichen WT-Gruppe erhöht (vgl. Tabelle 13). Sie fällt im Median bis zur 10. Lebenswoche deutlicher als im WT auf zunächst 4,5 mg/g und in den folgenden Altersgruppen auf 4,1 bzw. 3,1 mg/g. Während die Milz-zu-Körper-Ratio bei WT-Mäusen zwischen der 20. und 30. Woche leicht sinkt, kann bei CCR7^{-/-}-Mäusen wieder ein Anstieg auf 3,6 mg/g verzeichnet werden. Der Unterschied zwischen den 30 Wochen-alten Genotypen ist signifikant.

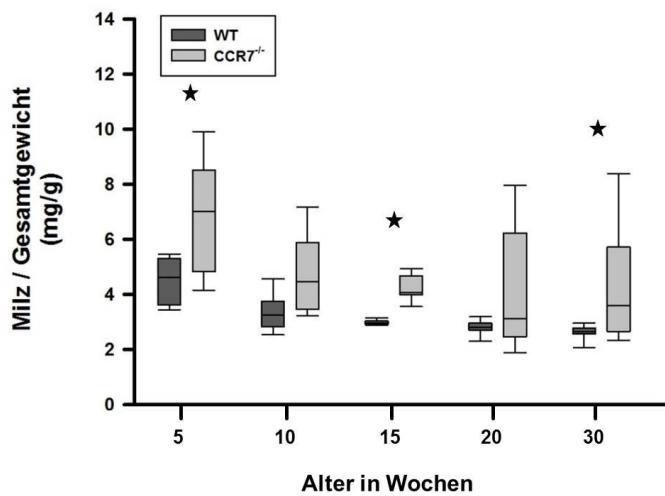


Abb. 20: Ratio von Milz- zu Gesamtkörpergewicht bei 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen. Die Abbildung zeigt die einzelnen Gruppen mittels Boxplot mit 5, 25, 50, 75 und 95 % Perzentil. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet.

Tabelle 13: Statistische Analyse bzgl. der Ratio des Milzgewichts zum Gesamtkörpergewicht von 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO		*								
	WT	n. s.	**								
10 W	KO	n. s.	n. s.	n. s.							
	WT	**	**	n. s.	**						
15 W	KO	n. s.	*	*	n. s.	**					
	WT	**	***	n. s.	**	n. s.	**				
20 W	KO	n. s.	*	n. s.							
	WT	**	***	*	***	**	**	n. s.	n. s.		
30 W	KO	n. s.	*	n. s.	*						
	WT										

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

Ratio vom Herzgewicht zum Gesamtkörpergewicht

Im Alter von 5 Wochen liegt die mediane Ratio vom Herz- zum Gesamtkörpergewicht bei WT-Mäusen bei 7,6 mg/g bzw. bei CCR7^{-/-}-Mäusen bei 7,4 mg/g. Danach fällt die Ratio im WT bis zur 10. Lebenswoche zwar zunächst deutlich auf 6,3 mg/g, variiert aber dann im Folgenden nur noch leicht zwischen 5,9 und 6,1 mg/g (vgl. Abb. 21). Im Gegensatz dazu bleibt bei CCR7^{-/-}-Mäusen die Herz-zu-Körper-Ratio über die Zeit nahezu unverändert. Die Mediane betragen dem aufsteigenden Alter entsprechend 7,1 dann 7,3 und schließlich 7,4 bzw. 7,7 mg/g. Abgesehen von der jüngsten Gruppe unterscheiden sich altersgleiche WT- und CCR7^{-/-}-Mäuse statistisch signifikant voneinander (vgl. Tabelle 14).

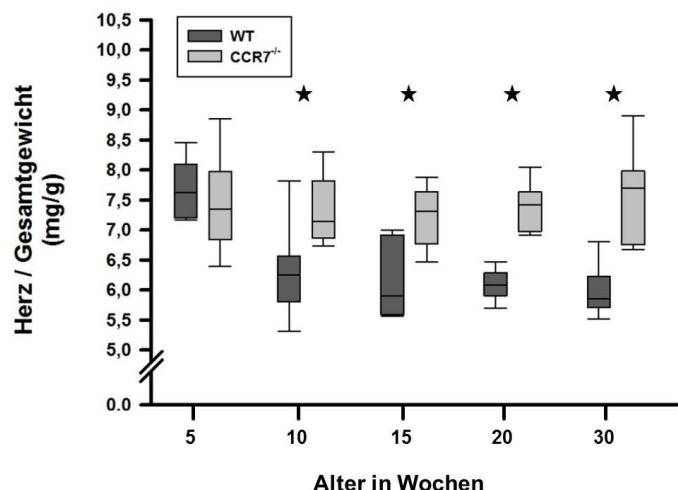


Abb. 21: Ratio von Herz- zu Gesamtkörpergewicht bei 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen. Die Abbildung zeigt die einzelnen Gruppen mittels Boxplot mit 5, 25, 50, 75 und 95 % Perzentil. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet.

Tabelle 14: Statistische Analyse bzgl. der Ratio des Herzgewichts zum Gesamtkörpergewicht in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO		n. s.								
	WT	*	*								
10 W	KO	n. s.	n. s.	*							
	WT	*	*	n. s.	*						
15 W	KO	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*					
	WT	**	**	n. s.	***	n. s.	**				
20 W	KO	n. s.	n. s.	*	n. s.	**	n. s.	***			
	WT	**	**	n. s.	**	n. s.	**	n. s.	***		
30 W	KO	n. s.	n. s.	*	n. s.	*	n. s.	***	n. s.	***	
	WT										

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

d) Ratio vom Lebergewicht zum Gesamtkörpergewicht

Im Fall der Ratio vom Lebergewicht zu Gesamtkörpergewicht wurde für WT-Mäuse zwischen der 5. und 30. Lebenswoche eine kontinuierliche Abnahme des Wertes von 60,4 auf 48,5 mg/g ermittelt. Im Median weisen CCR7^{-/-}-Mäuse über alle Altersstufen vergleichbare Werte auf, wobei es zwischen ihnen und den jeweils altersgleichen WT-Tieren keine signifikanten Unterschiede gibt (vgl. Tabelle 15). Bei CCR7-defizienten Mäusen sinkt die Ratio zwischen der 5. und 30. Lebenswoche von 57,0 auf 52,0 mg/g. Abb. 22 stellt die Auswertung graphisch dar.

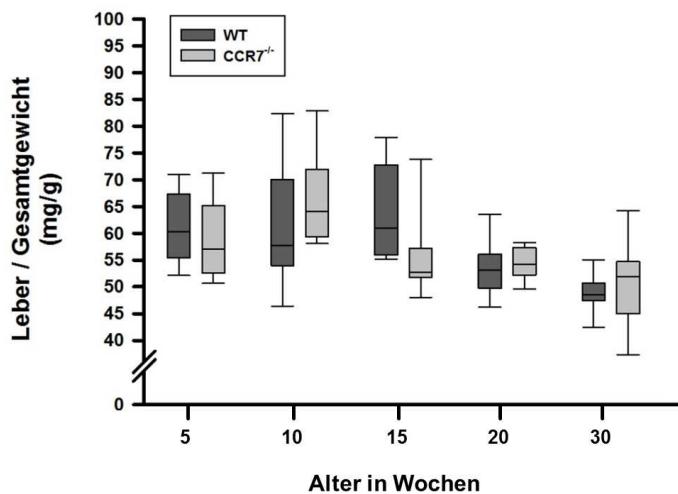


Abb. 22: Ratio von Leber- zu Gesamtkörpergewicht bei 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen. Die Abbildung zeigt die einzelnen Gruppen mittels Boxplot mit 5, 25, 50, 75 und 95 % Perzentil.

Tabelle 15: Statistische Analyse bzgl. der Ratio des Lebergewichts zum Gesamtkörpergewicht in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO	n. s.									
10 W	WT	n. s.	n. s.								
	KO	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.						
15 W	WT	n. s.									
	KO	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*	n. s.				
20 W	WT	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	**	*	n. s.			
	KO	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	**	*	n. s.	n. s.		
30 W	WT	**	**	*	***	**	n. s.	n. s.	n. s.	**	
	KO	*	n. s.	n. s.	**	*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

3.2.1.2 Serumanalysen

Zur Gewinnung der Seren wurde den Mäusen vor der Organexplantation Blut abgenommen. Nach der Gerinnung wurde dieses zentrifugiert, so dass das Serum abgenommen werden konnte. Serum und Blutkuchen wurden bei -20°C aufbewahrt.

a) Serum-Protein

Die Konzentration der Serum-Proteine wurde mittels BCA-Assay bestimmt. Wie in Abb. 23 dargestellt, erhöht sich in WT-Mäusen die Konzentration des Serum-Gesamtproteins zwischen der 5. und 30. Lebenswoche im Median leicht von 1,30 g/dl in 5 Wochen-alten Tieren über 1,39 und 1,41 g/dl in 10 bzw. 15 Wochen-alten Mäusen bis hin zu 1,61 und 1,76 g/dl in 20 und 30 Wochen-alten Mäusen. In CCR7^{-/-}-Tiere verhält sich die Serum-Proteinkonzentration analog. Hier wurden entsprechend dem aufsteigenden Alter folgende Werte bestimmt: 1,05 g/dl, 1,42 g/dl, 1,49 g/dl, 1,73 g/dl und 1,91 g/dl. Zwischen altersgleichen Gruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 16).

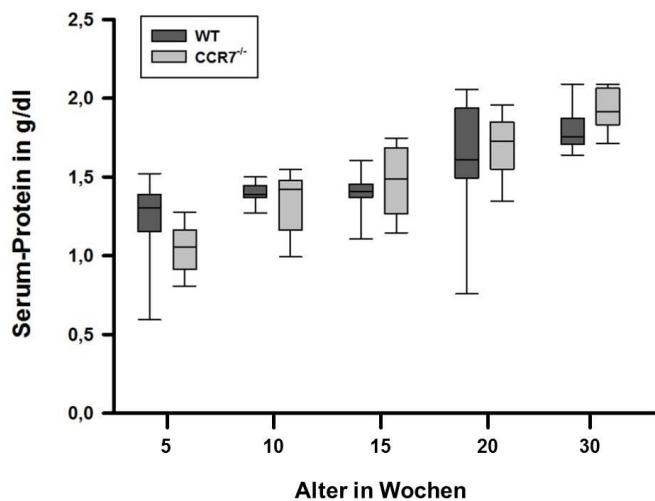


Abb. 23: Graphische Darstellung der Proteinkonzentration in den Seren von 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen. Die Abbildung zeigt die einzelnen Gruppen mittels Boxplot mit 5, 25, 50, 75 und 95 % Perzentil

Tabelle 16: Statistische Analyse bzgl. des Serum-Gesamtproteins in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO	n. s.									
	WT	n. s.	**								
10 W	KO	n. s.	*	n. s.							
	WT	n. s.	**	n. s.	n. s.						
15 W	KO	n. s.	**	n. s.	n. s.	n. s.					
	WT	n. s.	*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.				
20 W	KO	**	**	*	**	*	n. s.	n. s.			
	WT	**	***	**	***	**	*	n. s.	n. s.		
30 W	KO	**	**	**	**	*	**	n. s.	*	n. s.	
	WT										

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

b) Serum-Albumin

Das Serum-Albumin wurde in 20 und 30 Wochen-alten Mäusen untersucht. Die Albuminkonzentration wurde mit Hilfe eines ELISAs (*enzyme linked immunoabsorbent assay*) bestimmt. In 20 Wochen-alten Mäusen wurden im WT im Median 2,55 mg Albumin pro ml Serum festgestellt, im altersgleichen KO waren es 2,49 mg/ml. In den Seren von 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen wurde je eine mediane Albuminkonzentration von 2,50 mg/ml ermittelt (vgl. Abb. 24). Die statistische Analyse der Daten ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (vgl. Tabelle 17).

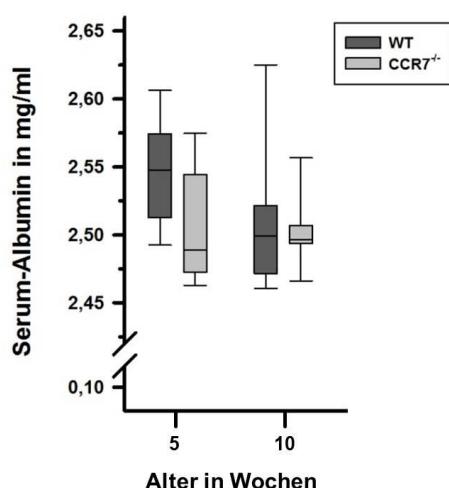


Abb. 24: Graphische Darstellung der Konzentration des Serum-Albumins von 20 und 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen. Die Abbildung zeigt die einzelnen Gruppen mittels Boxplot mit 5, 25, 50, 75 und 95 % Perzentil.

Tabelle 17: Statistische Analyse bzgl. des Serum-Albumins in 20 und 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	
20 W	KO	n. s.			
	WT	n. s.	n. s.		
30 W	KO	n. s.	n. s.	n. s.	
	WT				

n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 9 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

c) Serum-Kreatinin

Auch bei der Messung der Konzentration des Serum-Kreatinins wurden 20 und 30 Wochen-alte Mäuse untersucht. Die Kreatininkonzentration im Serum wurde mittels Kreatinin-Assay bestimmt.

Wie in Abb. 25 gezeigt, konnte mit 0,13 und 0,12 mg/dl im Median bei 20 bzw. 30 Wochen-alte WT-Mäusen eine höhere Serum-Kreatininkonzentration als in CCR7^{-/-}-Mäusen gemessen werden. Bei diesen lagen die Werte bei 0,09 in den jüngeren Tieren und 0,06 mg/dl in den älteren Tieren. Beim paarweisen statistischen Vergleich aller Gruppen konnte lediglich bei den 20 Wochen-alten WT-Mäusen gegenüber den altersgleichen bzw. 30 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Tieren ein signifikanter Unterschied ermittelt werden (vgl. Tabelle 18).

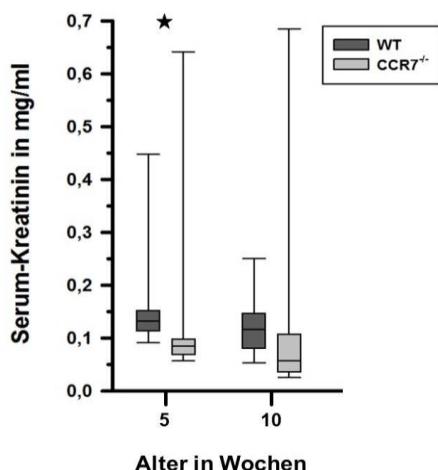


Abb. 25: Graphische Darstellung der Konzentration des Serum-Kreatinins von 20 und 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen. Die Abbildung zeigt die einzelnen Gruppen mittels Boxplot mit 5, 25, 50, 75 und 95 % Perzentil. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet.

Tabelle 18: Statistische Analyse bzgl. des Serum-Kreatinins in 20 und 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		20 W		30 W
		WT	KO	WT
20 W	WT	*		
	KO			
30 W	WT	n. s.	n. s.	
	KO	**	n. s.	n. s.

* p<0,05; ** p<0,01; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

3.2.1.3 Urinanalysen

Um Urin für nachfolgende Analysen zu gewinnen, wurden alle Mäuse einzeln für 24 Stunden in einem metabolischen Käfig gehalten. Nach dieser Zeitspanne wurde der Urin gesammelt und zentrifugiert, um eventuelle Futter- bzw. Kotrückstände zu entfernen. Bevor die Urinproben bei -20°C verwahrt wurden, wurde das Volumen des Urins bestimmt.

a) Bestimmung der Proteinmenge in 24 Stunden-Sammelurin

Die Konzentration der über den Urin ausgeschiedenen Proteine wurde über einen BCA-Assay bestimmt und anschließend mit dem Urinvolumen verrechnet, um die Gesamtmenge an ausgeschiedenem Protein zu ermitteln.

Während 5 Wochen-alte WT-Mäuse innerhalb von 24 Stunden im Median 3,0 mg Protein ausschieden und altersgleiche CCR7^{-/-}-Tiere 2,4 mg, stieg die Proteinmenge in den folgenden 5 Wochen deutlich an: 9,8 mg bei WT-Mäusen und 8,0 mg bei CCR7-defizienten Tieren. Bei 15, 20 und 30 Wochen-alten WT-Mäusen ändert sich der Wert nur noch leicht von 9,5 über 12,5 auf 12,6 mg. Wie im WT stieg

auch in $CCR7^{-/-}$ -Mäuse die Menge an Urinprotein. In den 3 älteren Gruppen konnten dem aufsteigenden Alter entsprechend 6,5 mg, 16,9 mg bzw. 16,5 mg Protein nachgewiesen werden. Von 30 Wochen-alten Tieren abgesehen, konnte hinsichtlich der Proteinexkretion kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen altersgleichen WT- und $CCR7^{-/-}$ -Mäusen festgestellt werden (vgl. Tabelle 19). Die graphische Aufarbeitung dieser Ergebnisse ist Abb. 26 zu entnehmen.

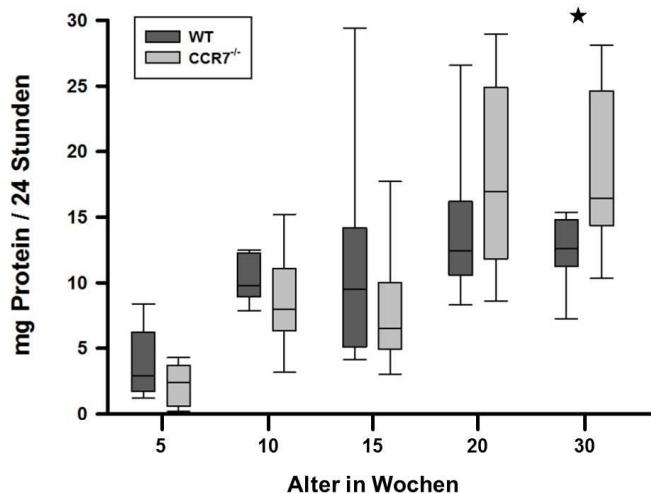


Abb. 26: Graphische Darstellung der Urinanalyse hinsichtlich des ausgeschiedenen Proteins von 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und $CCR7^{-/-}$ - (hellgrau) Mäusen. Die Abbildung zeigt die einzelnen Gruppen mittels Boxplot mit 5, 25, 50, 75 und 95 % Perzentil. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet.

Tabelle 19: Statistische Analyse bzgl. des Gesamtproteins in 24 Stunden-Sammelurin in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und $CCR7^{-/-}$ -Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO	n. s.									
	WT	**	**								
10 W	KO	n. s.	**	n. s.							
	WT	*	**	n. s.	n. s.						
15 W	KO	n. s.	**	n. s.	n. s.	n. s.					
	WT	**	**	n. s.	*	n. s.	*				
20 W	KO	**	**	*	n. s.	n. s.	**	n. s.			
	WT	**	**	n. s.	*	n. s.	*	n. s.	n. s.		
30 W	KO	**	**	*	**	n. s.	**	n. s.	n. s.	*	
	WT	**	**	n. s.	*	n. s.	*	n. s.	n. s.		

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

b) Bestimmung der Albuminausscheidung in 24 Stunden-Sammelurin

Mit Hilfe eines Albumin-ELISAs wurde die Konzentration des über den Urin ausgeschiedenen Albumins bestimmt und anschließend mit dem Urinvolumen verrechnet, um die Gesamtmenge an ausgeschiedenem Albumin zu ermitteln.

Mit 0,038 mg konnte bei 5 Wochen-alten $CCR7^{-/-}$ -Mäusen weniger Albumin im Urin nachgewiesen werden als bei altersgleichen WT-Tieren, die im Median 0,071 mg Albumin über den Urin ausschieden. Wie der Tabelle 20 zu entnehmen ist, stellt dies jedoch keine statistisch signifikante Differenz dar. In Abb. 27 ist graphisch die Menge des im Urin festgestellten Albumins gezeigt. Bei beiden Genotypen kann zwischen der 5. und 10. Lebenswoche ein Anstieg des ausgeschiedenen Albumins verzeichnet werden, wobei bei WT-Mäusen eine Albuminmenge von 0,102 mg und bei $CCR7^{-/-}$ -Mäusen von 0,091 mg festgestellt wurde. In dieser Größenordnung bewegen sich auch die ermittelten Albuminmengen der älteren Gruppen unabhängig vom Genotyp. 0,090 mg Albumin wurden in 15 Wochen-alten WT-Mäusen festgestellt, im $CCR7^{-/-}$ -Pendant waren es 0,082. In Alter von 30 Wochen schieden die WT-Tiere 0,093 mg Albumin aus, während bei $CCR7^{-/-}$ -Mäusen ein Wert von 0,079 mg ermittelt werden konnte. Lediglich die Messwerte zu den 20 Wochen-alten WT- sowie $CCR7^{-/-}$ -Mäuse lagen mit 0,150 mg bzw. 0,049 mg etwas über bzw. unter dem allgemeinen Durchschnitt.

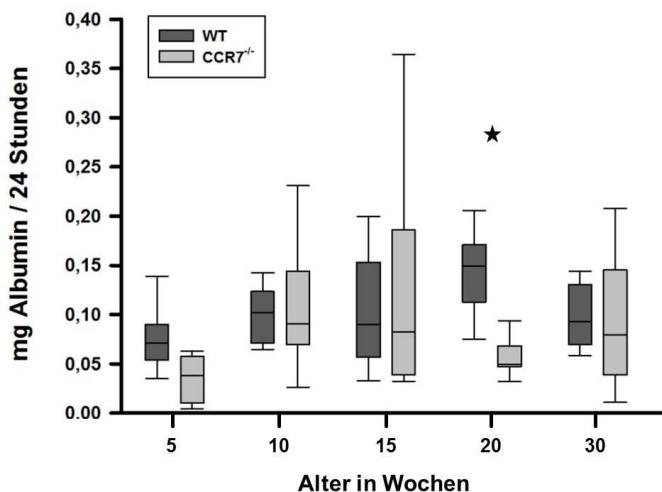


Abb. 27: Graphische Darstellung der Urinanalyse hinsichtlich des ausgeschiedenen Albumins von 5 bis 30 Wochen-WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen. Die Abbildung zeigt die einzelnen Gruppen mittels Boxplot mit 5, 25, 50, 75 und 95 % Perzentil. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet

Tabelle 20: Statistische Analyse bzgl. des Albumins in 24 Stunden-Sammelurin in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO	n. s.									
	WT	n. s.	**								
				n. s.	**	n. s.					
10 W	KO	n. s.	**	n. s.							
	WT	n. s.	*	n. s.	n. s.						
				n. s.	n. s.	n. s.	n. s.				
15 W	KO	n. s.									
	WT	*	**	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.				
				n. s.							
20 W	KO	n. s.	n. s.	**	*	n. s.	n. s.			**	
	WT	n. s.	**	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*	**		
				n. s.							
30 W	KO	n. s.									
	WT	n. s.	**	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*	**		

* p<0,05; ** p<0,01; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. A Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

c) Bestimmung der Kreatininkonzentration in 24 Stunden-Sammelurin

Die Kreatininkonzentration in 24 Stunden-Sammelurin wurde mit Hilfe eines Kreatinin-Assays bestimmt und wie bei Gesamteiweiß und Albumin in Relation zum Urinvolumen gesetzt.

Wie in Abb. 28 gezeigt, kommt es bei beiden Genotypen nach der 5. und 15. Lebenswoche zu einem deutlichen, meist signifikanten Anstieg des ausgeschiedenen Kreatinins (vgl. Tabelle 21). Im Fall der WT-Tiere erhöht sich die Menge an Kreatinin im Median zunächst von 0,043 auf 0,21 mg, dann von 0,266 auf 0,378 und schließlich 0,424 mg. Analog nahm auch bei CCR7^{-/-}-Mäusen die Menge an ausgeschiedenem Kreatinin zu. Von anfänglich 0,064 mg stieg die Kreatininmenge auf 0,167 mg, dann weiter von 0,203 auf 0,424 mg und schließlich auf 0,471 mg. Zwischen altersgleichen WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

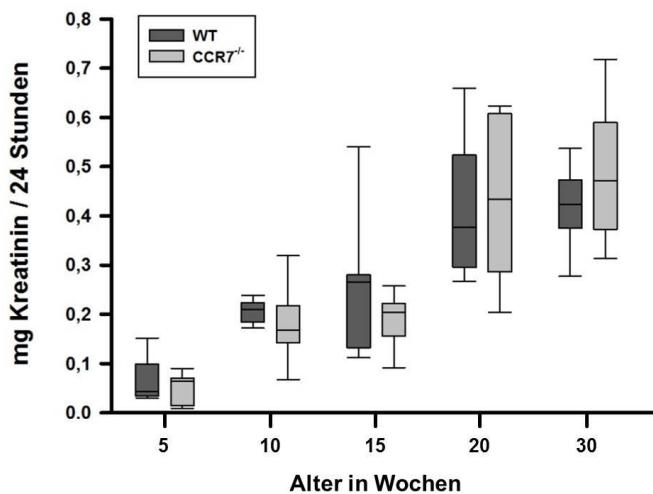


Abb. 28: Graphische Darstellung der Urinanalyse hinsichtlich des ausgeschiedenen Kreatinins von 5 bis 30 Wochen-WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen. Die Abbildung zeigt die einzelnen Gruppen mittels Boxplot mit 5, 25, 50, 75 und 95 % Perzentil.

Tabelle 21: Statistische Analyse bzgl. des Kreatinins in 24 Stunden-Sammelurin in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO	n. s.									
	WT	**	**								
10 W	KO	*	**	n. s.							
	WT	*	**	n. s.	n. s.						
15 W	KO	*	**	n. s.	n. s.	n. s.					
	WT	**	**	**	**	n. s.	**				
20 W	KO	**	**	**	**	n. s.	**	n. s.			
	WT	**	**	**	**	*	**	n. s.	n. s.		
30 W	KO	**	**	**	**	*	**	n. s.	n. s.	n. s.	
	WT	**	**	**	**	*	**	n. s.	n. s.	n. s.	

* p<0,05; ** p<0,01; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

d) Analyse des Urins mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um ein differenzierteres Bild hinsichtlich der Ergebnisse in 3.2.1.3 a) zu erhalten, wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie- und Silberfärbung durchgeführt. Ziel war es, die je nach Alter und Genotyp ausgeschiedenen 2,4 bis 16,9 mg Protein zu charakterisieren und eine eventuelle Proteinurie festzustellen.

Dazu wurde nach Bestimmen der Proteinkonzentration im Urin jede Probe auf 1 µg Protein genormt. Nach der Elektrophorese und Coomassie-Färbung (vgl. Abb. 29A) konnte für alle Tiere unabhängig von Alter und Genotyp nur eine einzige Bande identifiziert werden. Diese befindet sich entsprechend dem molekularen Größenstandard bei ca. 18 kDa.

Um Proteinmengen, die unterhalb der Nachweisgrenze des Coomassie-Farbstoffes lagen, zu detektieren, wurde daraufhin eine Silberfärbung durchgeführt. Wie bei der Coomassie-Färbung ist auch bei der Silberfärbung die Bande bei 18 kDa deutlich zu erkennen. Neben dieser sind hier, wie in Abb. 29B gezeigt, aber noch weitere Banden zu erkennen, wobei die Banden auf der Höhe von 15 bzw. 20 kDa am deutlichsten hervortreten. Zwischen 2 und 20 kDa sind Peptide und Proteine zu erwarten, die der Klasse *Major Urinary Proteins* (MUP) [Beynon und Hurst, 2003] angehören. Diese dienen der chemischen Kommunikation. Bei einigen Urinproben kann bei ca. 37 kDa eine weitere Proteinbande identifiziert werden. Ferner ist bei den meisten Urinen bei ca. 69 kDa eine weitere schwache Bande erkennbar. Dieses Molekulargewicht ist durch einen Pfeil gekennzeichnet und stellt die Höhe dar, bei der ausgeschiedenes Albumin zu erwarten ist. Banden von Proteinen mit einem höheren Molekulargewicht als das des Albumins sind nur noch vereinzelt erkennbar. In Abb. 29 sind repräsentativ nur die Gele der 15 Wochen-alten WT und CCR7^{-/-}-Mäusen gezeigt, da die übrigen Gruppen ein analoges Muster aufwiesen.

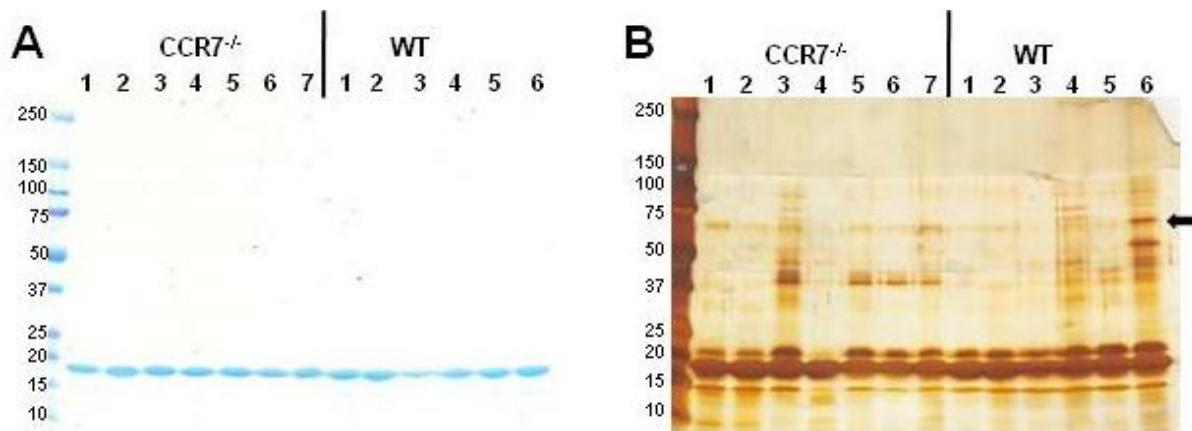


Abb. 29: Coomassie- und Silber-gefärbte SDS-Gele. Urinproben von 15 Wochen-alten $CCR7^{-/-}$ -Mäusen mit 7 Tieren und WT-Mäusen mit 6 Tieren nach SDS-PAGE und anschließender Coomassie- (Abb. 29A) bzw. Silberfärbung (Abb. 29B). Jeweils links befindet sich der molekulare Größenstandard, der Pfeil markiert die Höhe, bei der ausgeschiedenes Albumin zu erwarten ist.

3.2.1.4 Blutdruckmessungen

Unter den Punkten 3.2.2 und 3.2.4 wird gezeigt, dass hauptsächlich Mesangialzellen und die sie umgebende extrazelluläre Matrix von einer $CCR7$ -Defizienz betroffen sind. Da zudem Mesangialzellen, als spezialisierte glatte Gefäßmuskelzellen, kontraktile Fähigkeiten besitzen und somit auf den kapillären Blutfluss wirken, sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich der Blutdruck von WT- und $CCR7^{-/-}$ -Mäusen unterscheidet. Da dieser Test einen Vorversuch darstellte, wurden 25 Wochen-alte Mäuse mit je 4 Tieren pro Gruppe untersucht.

Der Blutdruck wurde mittels der *Tail-Cuff*-Methode bestimmt. Dabei wurden den fixierten Mäusen zwei Blutdruckmanschetten um den Schwanz angelegt. Pro Tier wurde sowohl der systolische als auch der diastolische und der daraus resultierende mittlere Blutdruck gemessen. Dies geschah immer zur selben Tageszeit in 20 aufeinander folgenden Messungen an drei aufeinander folgenden Tagen. Um einer Ergebnisverzerrung vorzubeugen, wurde mit den jeweiligen Medianen gerechnet.

Bei WT-Mäusen (vgl. Abb. 30) betrug der mittlere Blutdruck 127,5 mmHg mit einer Interquartilspanne (IQS) von 124,9 bis 132,1 mmHg. Bei den altersgleichen $CCR7^{-/-}$ -Mäusen nahm der mittlere Blutdruck mit 117 mm Hg (IQS: 113,1 bis 122,3 mmHg) etwas niedrigere Werte an. Dieser Unterschied ist nach statistischer Analyse nach Mann-Whitney [1947] nicht signifikant. Dies gilt auch für den systolischen und diastolischen Blutdruck, der sich zwar ebenfalls zwischen den Genotypen unterscheidet, aber nicht signifikant ist. Die systolischen Werte betrugen im Median bei WT-Mäusen 150 mmHg und bei $CCR7^{-/-}$ -Mäusen 138 mm Hg, für die Diastole wurden die Werte 116,4 bzw. 107 mmHg ermittelt.

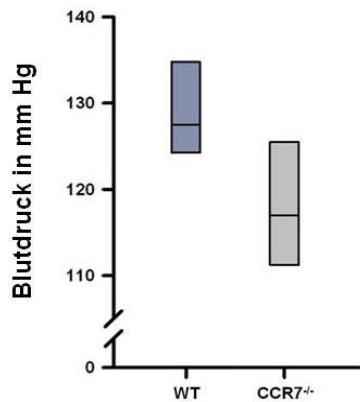


Abb. 30: Mittlerer Blutdruck von 25 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen. Aufgrund der kleinen Gruppengröße von je 4 Tieren werden bei der Darstellung mittels Boxplot nur die 25, 50 und 75 % Perzentile gezeigt.

3.2.2 Glomeruläre Zellularität und Architektur

Hinsichtlich der glomerulären Zellularität waren aufgrund der bereits im Vorfeld durchgeföhrter Versuche [Banas *et al.*, 2002 und 2004] speziell der glomeruläre Mesangialzellanteil über die Zeit von 5 bis 30 Wochen von Interesse. Außerdem wurden CCR7-abhängige Entwicklungsunterschiede zwischen jungen adulten Tieren untersucht sowie die Veränderung der glomerulären Morphologie.

3.2.2.1 Änderungen in der glomerulären Mesangialzellzahl

Die Untersuchung des Anteils glomerulärer Mesangialzellen an der glomerulären Gesamtzellzahl basierte auf der immunhistochemischen Färbung gegen den PDGF Rezeptor beta (*platelet-derived growth factor receptor beta*, PDGFR- β) und der anschließenden Einzelzellanalyse über die Software HistoQuest. PDGFR- β fungierte dabei als Mesangialzellmarker [Alpers *et al.*, 1993; Seifert *et al.*, 1998]. Voraussetzung für eine Einzelzellanalyse war die antikörperbasierte Detektion von PDGFR- β über die DAB-vermittelte Braunfärbung des Zielmoleküls, sowie die Zellkerngegenfärbung über Häma-alaun. Über die Zellkernfärbung war es möglich, jede einzelne Zelle zu definieren. Jede Zelle, für die zusätzlich eine Braunfärbung festgestellt werden konnte, wurde als Mesangialzelle gewertet. Nur Zellen, die Teil des glomerulären Schlingenkonvoluts waren, flossen in die Auswertung ein. Pro Tier wurden 20 Glomerula verblindet analysiert. Da der glomeruläre Mesangialzellgehalt sowohl für die Einzeltiere als auch für die Gruppen im Median bestimmt wurde, wurde zur statistischen Analyse der voneinander unabhängigen Daten eine univariate nicht-parametrische ANOVA nach Kruskal-Wallis [1952] durchgeführt. Nach Feststellen der statistischen Ungleichheit der Gruppenmediane wurden alle Gruppen paarweise nach dem nicht-parametrischen Signifikanztest von Mann und Whitney [1947] analysiert (vgl. Tabelle 22).

Zwar konnte PDGFR- β , wie in Abb. 31 dargestellt, in allen Glomerula unabhängig von Alter oder Genotyp nachgewiesen werden, hinsichtlich des Anteils der Mesangialzellen an der glomerulären Gesamtzellzahl aber unterscheiden sich die Genotypen deutlich (vgl. Abb. 31A). So haben 5 Wochen-

alte WT-Mäuse im Median einen glomerulären Mesangialzellanteil von 27,8 % (IQS: 23,1-32,5 %), welcher auf 21 % (IQS: 18,3-22,5 %) bei 10 Wochen-alten WT-Tieren sinkt. Damit verfügen die jüngeren WT-Tiere über signifikant mehr Mesangialzellen als die untersuchten 15 bis 30 Wochen-alten WT-Mäuse. Der Mesangialzellgehalt sinkt zwischen der 10. und 15. Lebenswoche noch einmal von 21 % auf 15,0 % (IQS: 11,7-15,5 %), variiert im Folgenden aber nur noch geringfügig. Dabei liegt der Anteil der Mesangialzellen an der glomerulären Gesamtzellzahl bei 20 und 30 Wochen-alten WT-Tieren bei 13,9 % (IQS: 12,6-17,0 %) bzw. 12,6 % (IQS: 11,6-13,7 %; vgl. Abb. 31B).

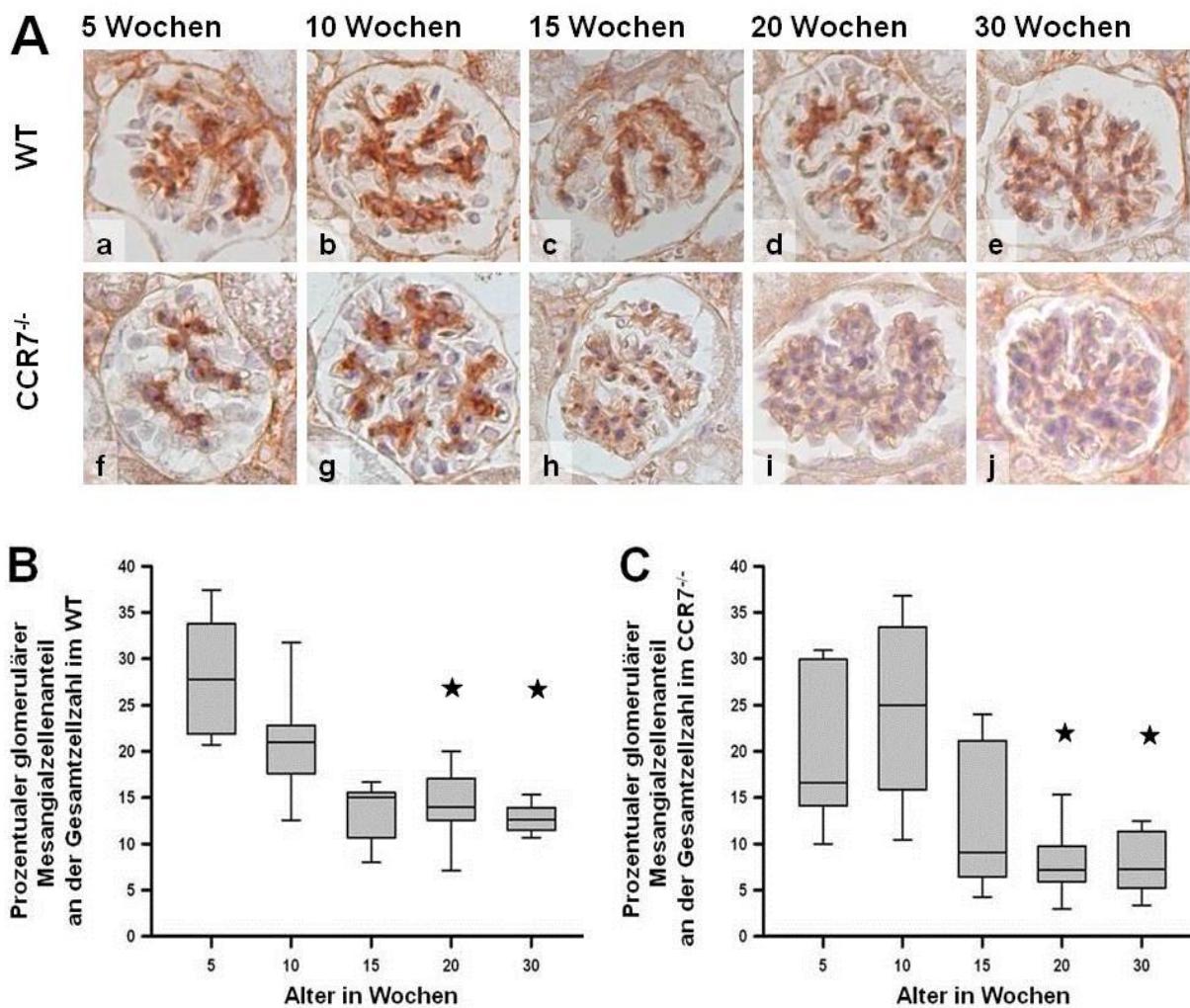


Abb. 31: Glomeruläre Mesangialzellzahl über den Zeitraum von 5 bis 30 Wochen in WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen. Abb. 31A zeigt Glomerula der verschiedenen Altersgruppen und Genotypen nach immunhistochemischer Markierung der PDGFR- β . Zu sehen ist wie folgt die beiden Genotypen mit dem WT in Abb. 31A a-e: WT und dem KO in Abb. 31A f-j. Die verschiedenen Altersgruppen in Abb. 31 A a und f: 5 Wochen; Abb. 31 A b und g: 10 Wochen; Abb. 31 A c und h: 15 Wochen; Abb. 31 A d und i: 20 Wochen; Abb. 31 A e und j: 30 Wochen. Abb. 31B stellt die prozentuale Veränderung des Mesangialzellanteils an der Gesamtzellzahl im Glomerulum in 5 bis 30 Wochen-alten WT-Tieren dar. Analog dazu zeigt Abb. 31C diesen in CCR7^{-/-} Tieren. Dargestellt sind Boxplots je mit 5, 25, 50, 75 und 95 % Perzentil. Werte außerhalb der 5- bzw. 95 %-Perzentile wurden nicht berücksichtigt. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet. Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung.

Tabelle 22: Statistische Analyse bzgl. des glomerulären Mesangialzellanteils an der glomerulären Gesamtzellzahl in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO	n. s.									
10 W	WT	n. s.	n. s.								
	KO	n. s.	n. s.	n. s.							
15 W	WT	**	n. s.	*	n. s.						
	KO	*	n. s.	n. s.	*	n. s.					
20 W	WT	**	n. s.								
	KO	**	**	**	**	*	n. s.	*			
30 W	WT	**	n. s.	**	*	n. s.	n. s.	n. s.	*		
	KO	**	**	**	**	*	n. s.	**	n. s.	**	

* p<0,05; ** p<0,01; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

Im Gegensatz zum WT haben CCR7^{-/-}-Mäuse im Alter von 5 Wochen mit 16,6 % (IQS: 14,6-26,7 %) einen deutlich niedrigeren Mesangialzellanteil als ihr WT-Pendant (vgl. Abb. 31B). Dieser Rückstand konnte jedoch in den folgenden Wochen aufgeholt werden, so dass bei 10 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäuse ein prozentualer Mesangialzellgehalt von 25 % (IQS: 17,5-31,9 %) festgestellt werden konnte. Während im WT der Mesangialzellanteil zwischen der 5. und 15. Lebenswochen kontinuierlich sank und sich ab dann nur noch geringfügig änderte, kam es bei CCR7^{-/-}-Tieren zwischen der 10. und 15. Lebenswoche zu einem rapiden Rückgang des glomerulären Mesangialzellanteils von 25 auf 9,1 % (IQS: 6,7-20,2 %). Während sich die Genotypen im Alter von 15 Wochen statistisch noch nicht unterscheiden, konnte hinsichtlich des glomerulären Mesangialzellanteils sowohl zwischen den 10 und 15 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden, als auch zwischen den Genotypen in den beiden ältesten Gruppen. In der 20. und 30. Lebenswoche sind nur noch 7,2 % (IQS: 6,7-10,2 %) bzw. 7,3 % (IQS: 5,5-11,0 %) der glomerulären Zellen Mesangialzellen. Damit enthalten die Mesangien von 20 und 30 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen weniger als 60 % der in altersgleichen WT-Mäusen festgestellten Mesangialzellzahl.

3.2.2.2 Verzögerte Entwicklung des glomerulären Schlingenkonvoluts

Neben der Einzelzellanalyse mittels immunhistochemischer Markierung von PDGFR- β wurde auch der augenscheinliche glomeruläre Entwicklungsstand der 5 und 10 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen bewertet. Dafür wurden die Bilder der Glomerula, die für die Einzelzellanalyse der PDGFR- β -Immunhistochemie aufgenommen wurden, geblendet mit Scores bewertet. Score 1 entsprach dabei einem Glomerulum, das noch über kein ausgebildetes Schlingenkonvolut verfügte. Glomerula dieser Kategorie befinden sich noch im Kapillarschlingenstadium, welches sich dadurch auszeichnet, dass nur eine Kapillarschlinge existiert, die ein noch unverzweigtes Mesangium umgibt. Glomerula, die mit Score 2 bewertet wurden, verfügten bereits über ein mäßig verzweigtes Mesangium, mit ca. 2 bis 4

sichtbaren Kapillarschlingen. Score 3 stand für Glomerula mit vielen sichtbaren Kapillarschlingen und einem vollständig ausgebildeten verzweigten Mesangium. In Abb. 32 sind Glomerula dargestellt, die entweder Score 1, 2 oder 3 entsprechen.

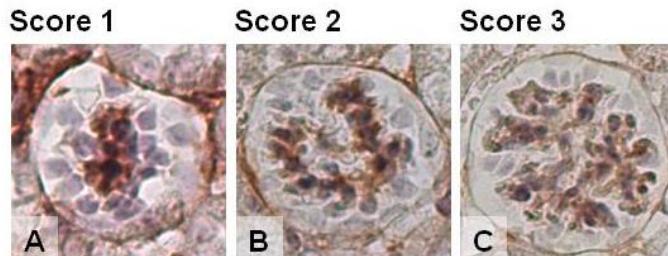


Abb. 32: Beispielbilder für die verschiedenen glomerulären Entwicklungsstadien. Abb. 32A zeigt ein Glomerulum im Kapillarschlingenstadium, das mit Score 1 bewertet wurde, Abb. 32B ein mäßig weit entwickeltes Glomerulum, das den Score-Wert 2 erhielt und Abb. 32C ein Glomerulum, das dem Entwicklungsstadium von Score 3 entspricht. Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung.

Im Alter von 5 Wochen wurden bei WT-Mäusen nur 4,2 % der untersuchten Glomerula mit dem Score-Wert 1 beurteilt, aber 16,6 % der Glomerula von altersgleichen $CCR7^{-/-}$ -Mäusen. Den Score 2 erhielten 32,5 % der Glomerula der WT-Mäuse, sowie 49,2 % der $CCR7^{-/-}$ -Mäuse. 63,3 % der untersuchten WT-Glomerula waren vollständig entwickelt, so dass der Score 3 vergeben werden konnte. Bei den Glomerula der $CCR7$ -defizienten Tiere traf dies nur in 34,2 % der Fälle zu. Bei 10 Wochen-alten Tieren ist die Verteilung der Scores zwischen den Genotypen nahezu identisch. Bei WT-Mäusen wurde der Score-Wert 1 nie vergeben, Score 2 bei 13,3 % der analysierten Glomerula und Score 3 bei 86,7 %. Dem aufsteigenden Score-Werten entsprechend, war der Anteil der vergebenen Scores für die Glomerula der $CCR7^{-/-}$ -Tiere, wie folgt: 0,6 %, 13,8 % und 85,6 %. Wie auch Abb. 33 zu entnehmen ist, sind bei den 5 Wochen-alten $CCR7^{-/-}$ -Mäusen die Scores zu den niedrigeren Werten verschoben. Bei den $CCR7^{-/-}$ -Tieren sind 66 % der Glomerula noch nicht vollständig entwickelt, während dies bei WT-Tieren nur in 37 % der untersuchten Glomerula der Fall ist. Um zu überprüfen, ob dieser Unterschied signifikant ist, wurden die Daten statistisch analysiert (vgl. Tabelle 23). Da es sich hier um ordinale, nicht-parametrischen Daten handelt, wurden zur statistischen Analyse Kreuztabellen erstellt und die statistische Signifikanz mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson bestimmt. Dabei wurden alle vier Gruppen hinsichtlich der Verteilung der Scores miteinander verglichen. Nach Feststellen der ungleichen Verteilung der Scores zwischen den Gruppen, wurde dann für die einzelnen Gruppen jeweils ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Hier zeigte sich, dass sich der Entwicklungsstand von 5 Wochen-alten WT-Mäusen signifikant von dem altersgleicher $CCR7^{-/-}$ -Mäuse unterschied. Tiere des selben Genotyps unterscheiden sich zwischen dem Alter von 5 und 10 Wochen. In der 10. Lebenswoche konnte zwischen WT und KO keine signifikante Differenz bestimmt werden.

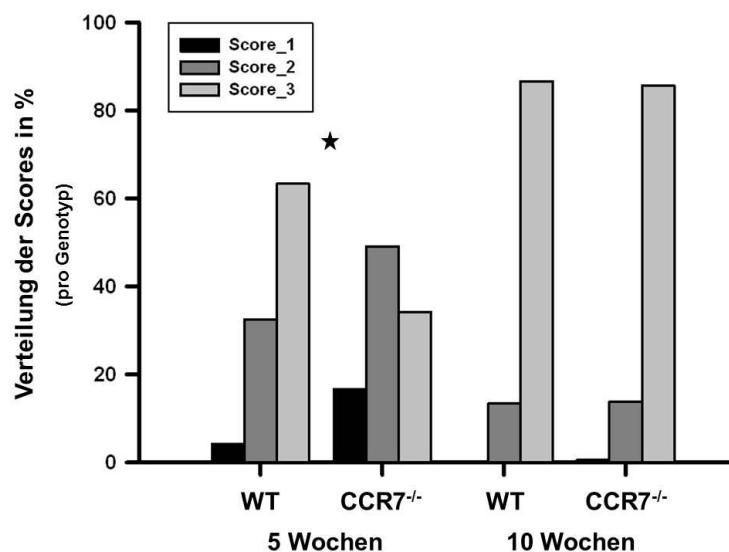


Abb. 33: Verteilung der vergebenen Scores in 5 und 10 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen. Schwarze Balken repräsentieren den Score 1, dunkelgraue den Score 2 und hellgraue den Score 3. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet.

Tabelle 23: Statistische Analyse bzgl. des glomerulären Entwicklungsstandes in 5 und 10 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		5 W		10 W
		WT	KO	WT
5 W	WT	***		
	KO	***	***	n. s.
10 W	WT	***	***	
	KO	***	***	n. s.

*** p<0,001; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 8 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

3.2.2.3 PAS-Färbung

Die PAS- (*periodic acid Schiff*) Reaktion auf histologischen Nierenpräparaten führte zur Bildung von purpurnen Farbpigmenten, die mit Verbindungen und Strukturen wie Polysacchariden, Glykogen, neutralen Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen, sowie Basalmembranen, Kollagen, Glyko- und Phospholipiden lokalisieren. Häufig können so Ablagerungen von Glykoproteinen identifiziert werden. Diese zusammenfassend als PAS-positives Material bezeichneten Moleküle und Gewebekomponenten wurden über die Software HistoQuest morphometrisch quantifiziert. Es wurden pro Tier 20 Glomerula von 5 bis 30 Wochen-alten WT und CCR7^{-/-}-Mäusen verblindet analysiert, wobei nur Flächen innerhalb des Gefäßkonvoluts zur Quantifizierung einbezogen wurden. Die hierbei erhobenen Daten waren voneinander unabhängig und normalverteilt. Ferner lag eine Varianzhomogenität vor. Zur statistischen Analyse wurde aufgrund der ungleichen Gruppengröße eine univariate ANOVA nach Tukey-Kramer durchgeführt. Das Ergebnis ist in Tabelle 24 gezeigt.

Wie in Abb. 34A a-j dargestellt, kann in allen Tieren unabhängig von Alter und Genotyp PAS-positives Material nachgewiesen werden, wobei dieses am intensivsten in den mesangialen Bereichen lokalisiert. Während die Färbungsintensität in sowohl allen WT-Altersgruppen (Abb. 34A a-e) als auch den 5, 10 und 15 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen (Abb. 34A f-h) annähernd identisch ist, kann bei 20 und 30 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen (Abb. 34A i, j) eine wesentlich kräftigere Purpurfärbung festgestellt werden. Der flächenmäßige Anteil des PAS-positiven Materials innerhalb des Schlingenkonvoluts liegt bei 5 und 10 Wochen-alten WT-Tieren bei 8,1 bzw. 8,0 % und steigt statistisch nicht-signifikant in 15 und 20 Wochen-alten WT-Mäusen auf 12,9 bzw. 12,7 % an. Nur bei 30 Wochen-alten WT-Tieren kann mit 17,1 % eine im Vergleich zu 5 und 10 Wochen-alten WT-Tieren statistisch signifikante Zunahme an PAS-positivem Material festgestellt werden. Bei 5, 10 und 15 Wochen-alten Mäusen kann kein

Unterschied zwischen den altersgleichen Genotypen ermittelt werden. Für $CCR7^{-/-}$ -Mäuse ergab die Quantifizierung den flächenmäßigen Anteil des PAS-positivem Materials von 10,3 bzw. 11,9 bzw. 8,7 %. Für die beiden älteren $CCR7^{-/-}$ -Gruppen kann die morphometrische Analyse den visuellen Eindruck von den PAS-gefärbten Nierenpräparaten bestätigen: mit 25,5 bzw. 29,7 % PAS-positivem Material verfügen 20 bzw. 30 Wochen-alte Mäuse über signifikant mehr glomeruläre Ablagerungen als das entsprechende WT-Pendant. Dabei kommt es bei $CCR7^{-/-}$ -Tieren zwischen der bei 15. und 20. Lebenswoche zu einem signifikanten Anstieg an PAS-positivem Material um den Faktor 3.

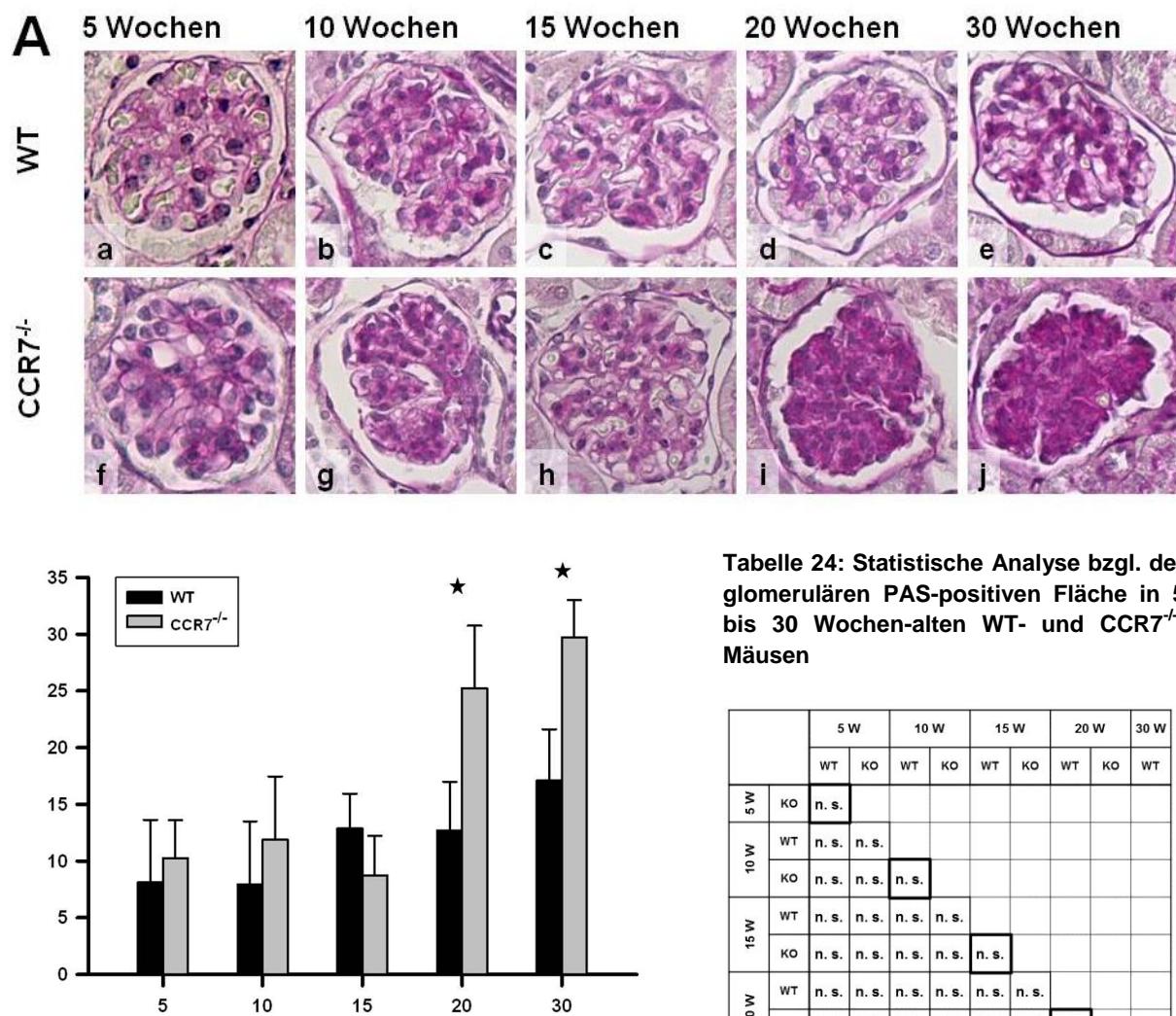


Abb. 34: Histochemischer Nachweis von PAS-positivem Material in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (schwarz) und $CCR7^{-/-}$ - (hellgrau) Mäusen mit morphometrischer Auswertung der PAS-positiven glomerulären Fläche. Abb. 34A a-j zeigt Gomeraula von 5 (Abb. 34A a und f), 10 (Abb. 34A b und g), 15 (Abb. 34A c und h), 20 (Abb. 34A d und i) und 30 (Abb. 34A e und j) Wochen-alten WT- (Abb. 34A a-e) und $CCR7^{-/-}$ (Abb. 34A f-j) Mäusen. In Abb. 34B ist mittels Balkendiagramm das Resultat der morphometrischen Quantifizierung des PAS-positiven Materials innerhalb des glomerulären Schlingenkonvoluts in Form von Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet. Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung.

Tabelle 24: Statistische Analyse bzgl. der glomerulären PAS-positiven Fläche in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und $CCR7^{-/-}$ -Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO	n. s.									
10 W	WT	n. s.	n. s.								
15 W	KO	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.						
20 W	WT	n. s.									
		***	***	***	***	***	***	***	***		
30 W	WT	**	n. s.	**	n. s.	n. s.	*	n. s.	**		
		***	***	***	***	***	***	***	***	n. s.	***

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

3.2.2.4 Sirius Rot-Färbung

Zur Bestimmung des Kollagenanteils an den glomerulären Flächen wurde eine Sirius Rot-Färbung durchgeführt. Durch diese wurde in den 5 bis 30 Wochen-alten WT und CCR $^{7/-}$ -Versuchsmäusen Kollagen, unabhängig von seinem molekularen Typ, rot markiert. Die Visualisierung des übrigen Gewebes geschah mit Fast Green (vgl. Abb. 35). Die Sirius Rot-positive Fläche innerhalb des glomerulären Schlingenkonvoluts wurde morphometrisch mit der Software HistoQuest quantifiziert. Zur statistischen Analyse der voneinander unabhängigen und normalverteilten Daten erfolgte aufgrund der Varianzheterogenität und der ungleichen Gruppengröße eine univariate ANOVA nach Games-Howell (vgl. Tabelle 25).

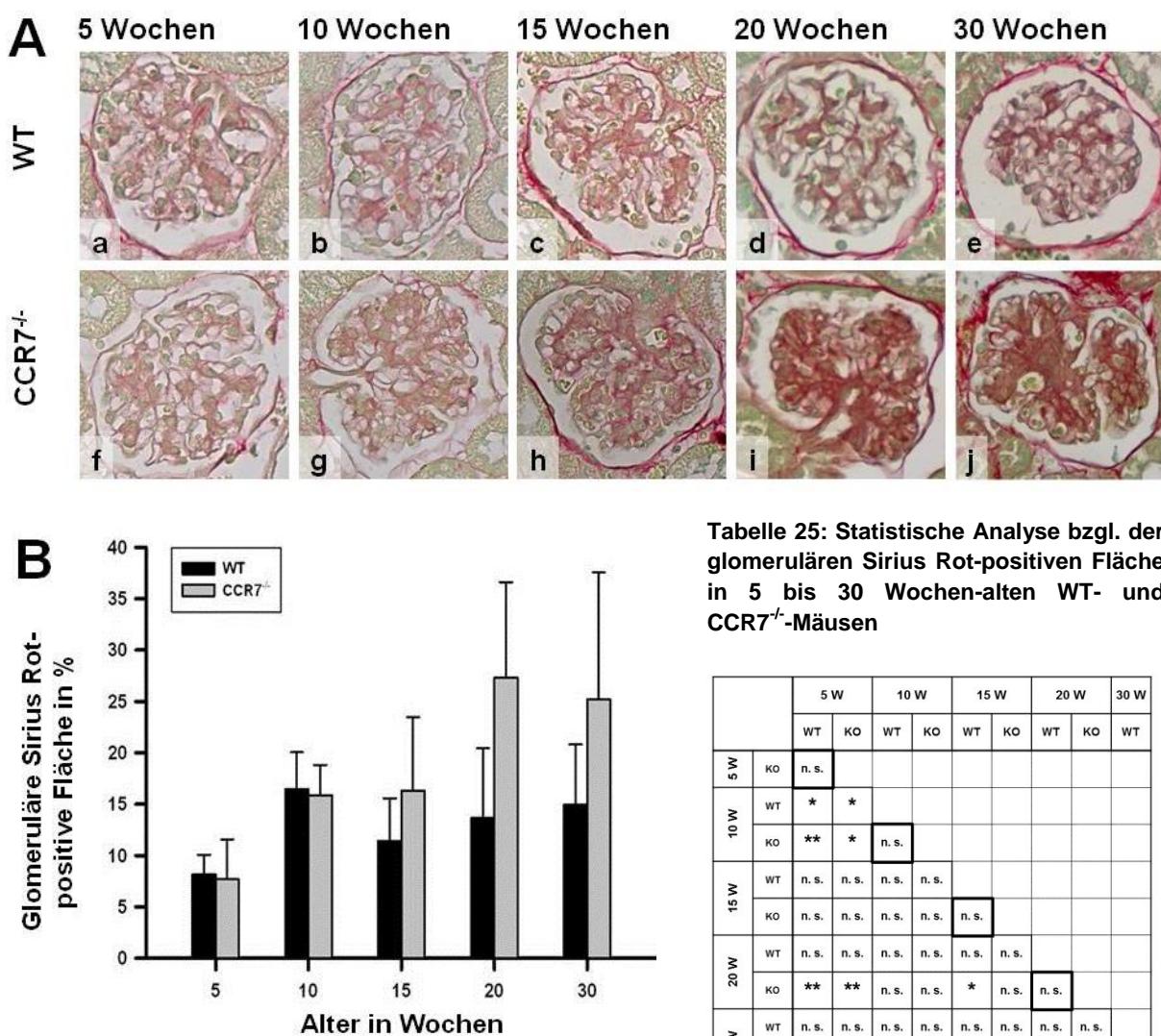


Abb. 35: Histochemischer Nachweis von Kollagen in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (schwarz) und CCR $^{7/-}$ - (hellgrau) Mäusen mit morphometrischer Auswertung der Sirius Rot-positiven glomerulären Fläche. Abb. 35A a-j zeigt Gomerula von 5 (Abb. 35A a und f), 10 (Abb. 35A b und g), 15 (Abb. 35A c und h), 20 (Abb. 35A d und i) und 30 (Abb. 35A e und j) Wochen-alten WT- (Abb. 35A a-e) und CCR $^{7/-}$ - (Abb. 35A f-j) Mäusen. Abb. 35B zeigt das Ergebnis der morphometrischen Quantifizierung des glomerulären Kollagens, dargestellt als Balkendiagramm in Form von Mittelwert + Standardabweichung. Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung.

Tabelle 25: Statistische Analyse bzgl. der glomerulären Sirius Rot-positiven Fläche in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR $^{7/-}$ -Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO	n. s.									
		*	*								
10 W	KO	**		*		n. s.					
		n. s.									
15 W	KO	n. s.									
		n. s.									
20 W	KO	**		**		n. s.		*		n. s.	
		n. s.									
30 W	KO	*	*	n. s.							
		n. s.									

* p<0,05; ** p<0,01; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

Wie in Abb. 35 gezeigt, kann in allen Altersgruppen und bei beiden Genotypen glomerulär Sirius Rot-positives Material nachgewiesen werden. Analog zur PAS-Färbung erscheint die Färbung in den mesangialen Bereichen am intensivsten. Ferner konnte auch hier festgestellt werden, dass in allen WT-Altersgruppen (Abb. 35A a-e) und bei den 5 bis 15 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen (Abb. 35A f-h) die Unterschiede hinsichtlich des glomerulären Kollagens gering sind. Erst im Alter von 20 bzw. 30 Wochen treten deutliche Differenzen zwischen WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen hervor. In Abb. 35B ist das Ergebnis der morphometrischen Quantifizierung dargestellt.

Bei den 5 Wochen-alten Tieren konnte im WT 8,1 und im KO 7,7 % glomeruläres Kollagen festgestellt werden. In den folgenden Altersstufen steigt das Kollagen im WT an, bleibt aber relativ konstant bei $14 \pm 2,5\%$. Dem aufsteigenden Alter entsprechend wurden folgende Werte ermittelt: 16,5; 11,4; 13,6 und 15,0 %. Mit 15,9 % Kollagen bei 10 und 16,3 % Kollagen bei 15 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen wurden im Mittel ähnlich große Sirius Rot-positive Flächen festgestellt. Für die beiden ältesten Gruppen konnte analog zur PAS-Färbung ein deutlicher Anstieg des glomerulären Kollagens verzeichnet werden. 20 bzw. 30 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen haben mit 27,3 bzw. 25,2 % ca. doppelt so viel Kollagen in ihren Glomerula.

3.2.2.5 Modifizierte Silberfärbung nach Jones

Die Silberfärbung nach Jones [1957] an histologischen Nierenpräparaten dient der Darstellung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix. Diese zählen zu den argyrophenen Strukturen. Wie im Fall der PAS- und Sirius Rot-Färbung wurde die Fläche der silberimprägnierten Bereiche des glomerulären Schlingenkonvoluts morphometrisch mit der Software HistoQuest quantifiziert.

Da die beiden vorangegangenen histochemischen Untersuchungen morphologische Veränderungen in den Glomerula von 20 und 30 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Tieren gegenüber altersgleichen WT- bzw. jüngeren CCR7^{-/-}-Mäusen offenlegten, wurde die Silberfärbung nur an den beiden älteren Tiergruppen durchgeführt. Dabei wurde zunächst die Morphologie der GBM untersucht. Weder in CCR7^{-/-}- noch in WT-Mäusen zeigten die GBM Anzeichen von Doppelkonturbildung. Mit Hilfe der morphometrischen Analyse konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen bzw. den beiden Altersgruppen festgestellt werden (vgl. Abb. 36). Im Alter von 20 Wochen beträgt in WT-Mäusen der Anteil der glomerulären Strukturen, die sich Silber-imprägnieren ließen, 10,9 %, für altersgleiche CCR7^{-/-}-Mäuse wurde ein Anteil von 15,5 % ermittelt. Bei 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Tieren ergab die Quantifizierung eine Silber-positive Fläche von 15,0 bzw. 13,2 %. Die erhobenen Daten waren voneinander unabhängig und normalverteilt. Ferner lag eine Varianzhomogenität vor. Zur statistischen Analyse wurde aufgrund der ungleichen Gruppengröße eine univariate ANOVA nach Tukey-Kramer durchgeführt. Das Ergebnis ist Tabelle 26 zu entnehmen.

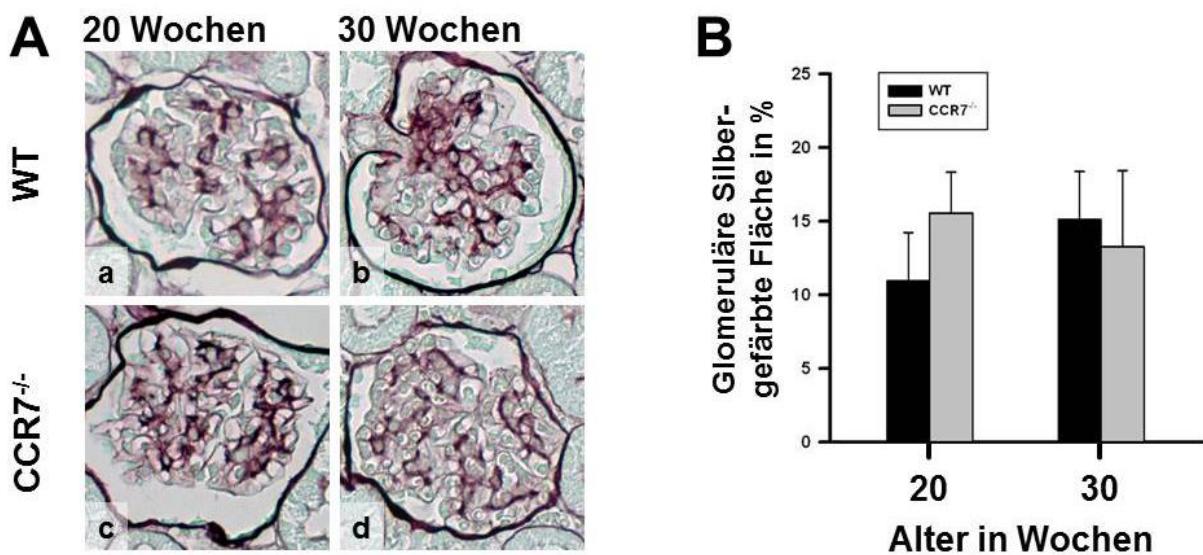


Abb. 36: Histochemischer Nachweise argyrophiler Strukturen in 20 und 30 Wochen-alten WT- (schwarz) und CCR7^{-/-}-Mäusen mit morphometrischer Auswertung der Silber-gefärbten glomerulären Fläche. Abb. 36 zeigt die Silber-imprägnierte Glomerula von 20 und 30 Wochen-alten WT-Mäusen (Abb. 36A a bzw. b), sowie von 20 und 30 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen (Abb. 36 A c bzw. d). In Abb. 36B ist mittels Balkendiagramm das Resultat der morphometrischen Quantifizierung hinsichtlich des Anteils der glomerulär Silber-gefärbten Fläche in Form von Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung.

Tabelle 26: Statistische Analyse bzgl. der glomerulären Silber-gefärbten Fläche in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäuse.

		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO
20 W	WT	n. s.			
	KO	WT	n. s.	n. s.	
30 W	WT	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
	KO	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 9 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

3.2.2.6 Elektronenmikroskopische Analysen

Zur detaillierteren Untersuchung der glomerulären Architektur wurden von den Nieren aus 20 und 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt. Diese wurden am Institut für Pathologie (Uniklinikum Regensburg) nach dem dort üblichen Protokoll unter Verwendung eines Transmissionselektronenmikroskops (LEO912AB) durchgeführt.

Nach der elektronenmikroskopischen Analyse des renalen Gewebes (vgl. Abb. 37 A-F) verfügen WT-Mäuse unabhängig vom Alter der Tiere über physiologisch normale und wohl organisierte glomeruläre Strukturen. Die Glomerula 20 Wochen-alter Mäuse zeichnen sich sowohl durch weitgestellte Kapillaren aus als auch durch eine physiologisch reguläre Zellularität mit einer erwartungsgemäßen Ausprägung der extrazellulären Mesangialzellmatrix. Für 30 Wochen-alte WT-Tiere gilt dies ebenfalls, wobei hier gelegentlich sowohl die Mesangialzellzahl als auch die Menge der mesangialen Matrix geringfügig erhöht ist. Ultrastrukturen wie die podozytären Fußfortsätze lassen keine pathologischen Veränderungen erkennen. Zudem wurden auch extraglomeruläre Strukturen wie die Tubuli analysiert,

die sich ebenfalls physiologisch normal präsentieren (vgl. Abb. 37A-F). Im Gegensatz dazu ist bei CCR7^{-/-}-Mäusen eine beträchtliche Expansion der mesangialen Matrix erkennbar. Mit dieser Matrixexpansion geht eine veränderte Matrixstruktur einher. Zudem wurden multifokale und elektronenmikroskopisch dunkle Ablagerungen mit amorpher Textur in den perimesangialen und subendothelialen Bereichen identifiziert. Sowohl das Maß der Matrixakkumulation als auch die Menge der perimesangialen und subendothelialen Ablagerungen ist in den älteren CCR7^{-/-}-Mäusen ausgeprägter als in den jüngeren Tieren. Außerdem lassen auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen auf eine verminderte mesangiale Zellularität bei CCR7^{-/-}-Mäusen gegenüber dem WT-Pendant schließen. Wie bei den WT-Tieren wurde auch hier die Ultrastruktur der Podozyten untersucht. Diese zeigen keinerlei physiologische Auffälligkeiten wie beispielsweise ein Verschmelzen der Fußfortsätze oder ein Lösen von den Kapillaren. Genauso lassen sich auch die Tubuli der CCR7^{-/-}-Mäusen als physiologisch normal charakterisieren (vgl. Abb. 37G-N).

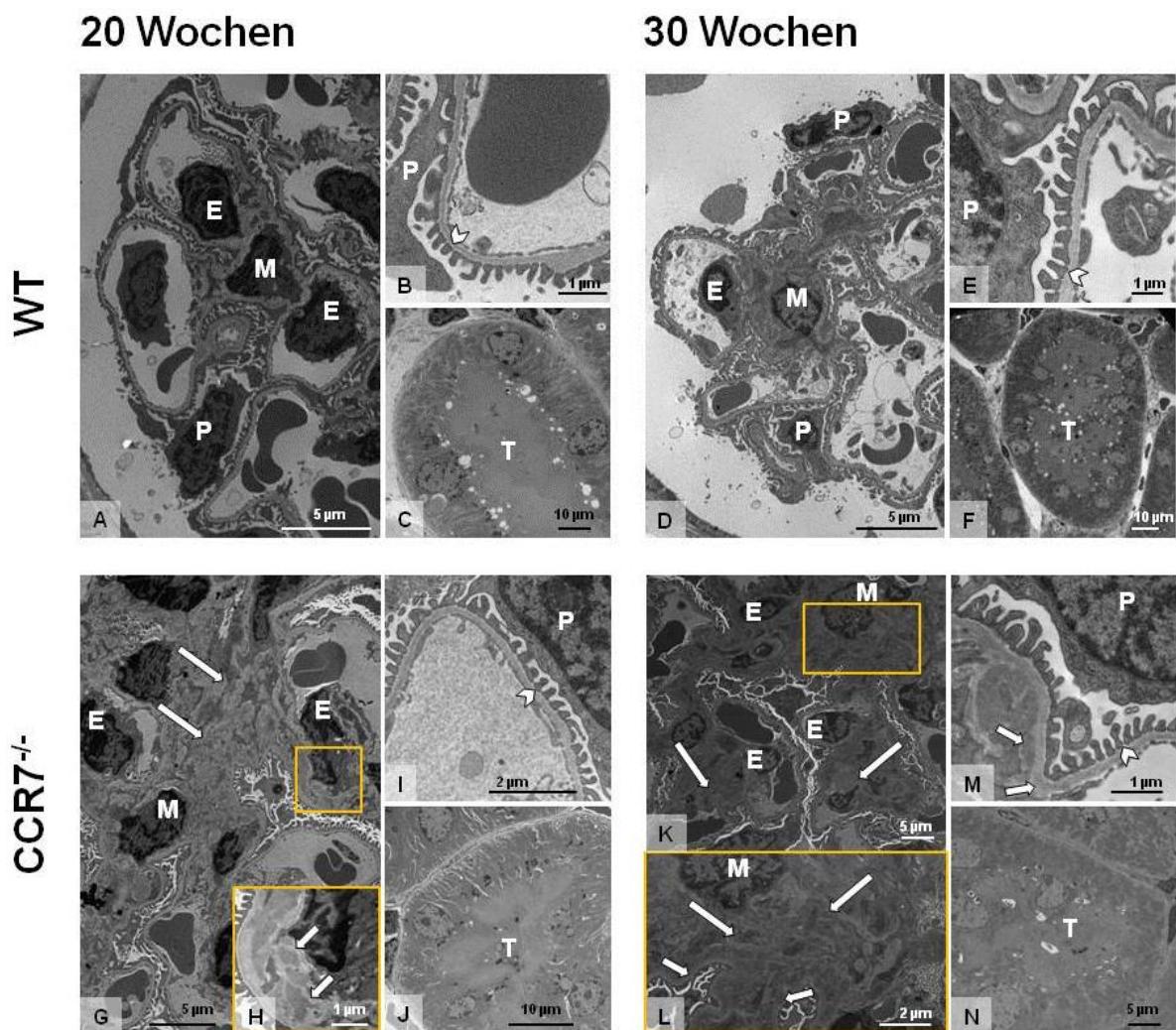


Abb. 37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nierenpräparaten aus 20 und 30 Wochen-alten WT und CCR7^{-/-}-Mäusen. Aufnahmen von WT-Tieren im Alter von 20 bzw. 30 Wochen sind in Abb. 37A-C bzw. Abb. 37D-F gezeigt, Aufnahmen von CCR7^{-/-}-Tieren im Alter von 20 bzw. 30 Wochen in Abb. 37G-J bzw. Abb. 37K-N. Die Abb. 37A, D, G und K stellen Übersichtsaufnahmen eines entsprechenden Glomerulums dar. Die Abb. 37H bzw. L sind die vergrößerten Ausschnitte der gelb umrandeten Bereiche in Abb. 37G bzw. K. In Abb. 37B, E, I und M ist je die Ultrastruktur einer Kapillare gezeigt. Tubuli sind in Abb. 37C, F, J und N dargestellt. E: Endothelzelle, M: Mesangialzelle, P: Podozyt, T: Tubulus. Pfeilspitzen verweisen auf podozytäre Fußfortsätze, kurze Pfeile auf subendothiale Ablagerung, lange Pfeile auf akkumulierte mesangiale Matrix. Der Größenmaßstab ist in den einzelnen Abbildung jeweils links unten angegeben.

3.2.3 Immunologische Aspekte der CCR7-Defizienz

3.2.3.1 Glomeruläre Ablagerungen der Immunglobuline Typ A und M

Um die in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Ablagerungen in der mesangialen Matrix der CCR7-defizienten Mäuse näher zu charakterisieren, wurden Fluoreszenz-immunhistochemische Färbungen gegen die Immunglobuline Typ A bzw. M (IgA bzw. IgM) durchgeführt. Bei dem verwendeten Fluorochrom handelte es sich um Alexa Fluor 594. Da die Matrixablagerungen in den beiden älteren Gruppen detektiert wurden, beschränkten sich die Färbungen auf die 20 und 30 Wochen-alten Mäuse. Nach den Färbungen wurden die Proben hinsichtlich des glomerulär festgestellten Alexa Fluor 594-Signals verblindet bewertet. Die vergebenen Scores rangierten von 0 bis 3, wobei Score 0 für keinerlei detektiertes Signal stand und Score 1 für wenig oder sehr wenig Signal. Score 2 bedeutete moderat bis mäßig viel Fluoreszenz und Score 3 viel bis sehr viel Fluoreszenz. Der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) diente der Visualisierung der Zellkerne. Da es sich hier um ordinale, nicht-parametrische Daten handelte, wurden zur statistischen Analyse Kreuztabellen erstellt und die statistische Signifikanz mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson bestimmt. Dabei wurden zunächst alle vier Gruppen hinsichtlich der Verteilung der Scores miteinander verglichen. Für den Fall, dass die Verteilung der Scores zwischen den Gruppen nicht gleich war, wurde für die einzelnen Gruppen je paarweise ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt.

a) IgA-Ablagerungen

Bei der Fluoreszenz-immunhistochemischen Färbung gegen IgA wurde sowohl bei den 20 als auch bei den 30 Wochen-alten WT-Mäusen je 8-mal der Score 0 und einmal der Score 1 vergeben. Dies bedeutet, dass in WT-Tieren unabhängig von ihrem Alter keine oder selten (sehr) geringe IgA-Ablagerungen in der glomerulären Matrix festgestellt wurden. Im Gegensatz dazu wurde bei CCR7^{-/-}-Mäusen der Score 0 kein einziges Mal vergeben. Stattdessen wurden bei 20 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen die Glomerula eines Nierenpräparats einmal mit dem Score 1 bewertet und 8-mal mit dem Score 2. Bei 30 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen geschah die Beurteilung der IgA-Ablagerungen wie folgt. Score 1: 3-mal, Score 2: 6-mal und Score 3: einmal. Für Alter und Genotyp sind entsprechend repräsentative Glomerula in Abb. 38A a-d gezeigt, die graphische Darstellung der Häufigkeit vergebenen Scores ist Abb. 38B zu entnehmen. Da sich die Verteilung der Scores in den 4 Gruppen signifikant von einander unterschied, wurde die Score-Verteilung zwischen den Gruppen paarweise analysiert. Während die Glomerula von Tieren des gleichen Genotyps zwischen der 20. und 30. Lebenswoche keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, wurde beim Vergleich der IgA-Ablagerungen in den Glomerula von WT-Mäusen gegenüber den Glomerula beider CCR7^{-/-}-Gruppen ein signifikanter Unterschied festgestellt (vgl. Tabelle 27).

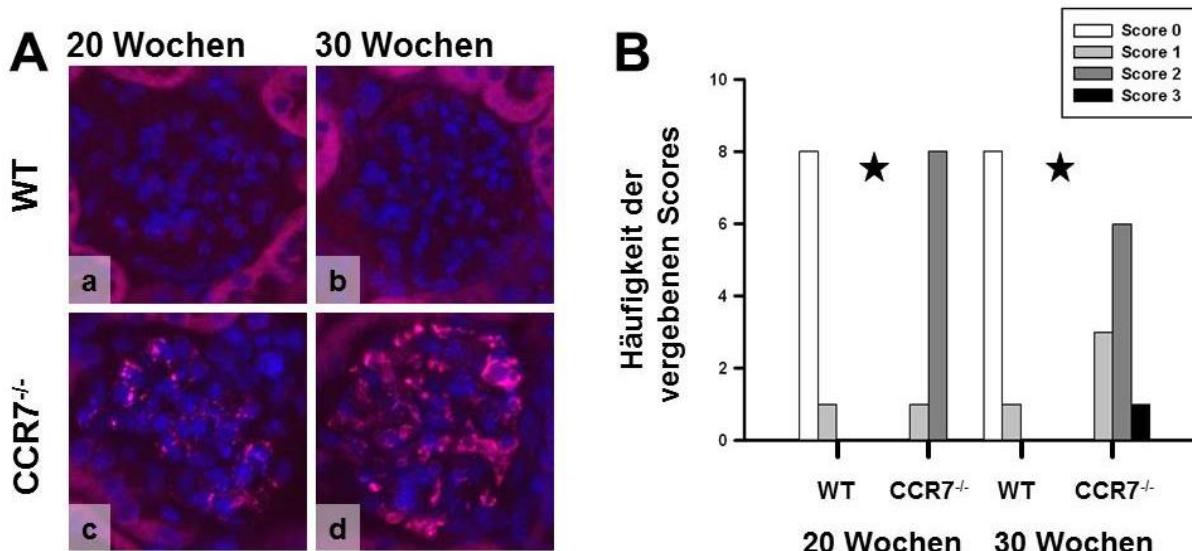


Abb. 38: Fluoreszenz-immunhistochemische Färbung gegen IgA. Abb. 38A zeigt Glomerula von 20 Wochen-alten WT- (Abb. 38A a) und CCR7^{-/-} (Abb. 38A c) Mäusen bzw. 30 Wochen-alten WT- (Abb. 38A b) und CCR7^{-/-} (Abb. 38A d) Mäusen. In Abb. 38B ist dargestellt wie häufig welcher Score je Alter und Genotyp vergeben wurde. Weiße Balken repräsentieren den Score 0, hellgrau den Score 1, dunkelgrau den Score 2 und schwarze den Score 3. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet. Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung.

Tabelle 27: Statistische Analyse bzgl. der IgA-Ablagerungen in 20 und 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	
20 W	KO	***			
	WT	n. s.	***		
30 W	KO	**	n. s.	***	
	WT				

** p<0,01; ** p<0,001; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 9 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

b) IgM-Ablagerungen

Ähnlich der IgA-Färbung wurden auch bei der Fluoreszenz-immunhistochemischen Markierung der IgM die Glomerula der WT-Mäuse in der Regel mit niedrigeren Scores bewertet. Bei 20 Wochen-alten WT-Tieren wurde 8-mal der Score 0 und einmal der Score 2 vergeben, bei den älteren WT-Mäusen 6-mal der Score 0 und 3-mal der Score 1. Bei den CCR7^{-/-}-Mäusen konnte nur einmal und zwar bei den 30 Wochen-alten Tieren der Score 0 vergeben werden. Bei den übrigen Tieren dieser Altersgruppe konnten bei je 2 Mäusen sehr wenige oder wenige (Score 1) bzw. moderate bis mäßig viele (Score 2) IgM-Ablagerungen festgestellt werden. Die Glomerula von 3 Tieren wiesen viele bis sehr viele (Score 3) IgM-Ablagerungen auf. Bei den jüngeren CCR7^{-/-}-Mäusen wurden folgende Scores vergeben. Zweimal Score 1, 5-mal Score 2 und 3-mal Score 3. In Abb. 39A a-d sind gemäß Alter und Genotyp repräsentative Glomerula gezeigt, in Abb. 39B ist die Häufigkeit der vergebenen Scores grafisch dargestellt. Da sich die Verteilung der Scores in den 4 Gruppen signifikant voneinander unterscheidet, wurde die Score-Verteilung zwischen den Gruppen paarweise analysiert (vgl. Tabelle 28).

Wie im Fall der IgA-Ablagerungen weisen die Glomerula von Tieren des gleichen Genotyps zwischen der 20. und 30. Lebenswoche keinen signifikanten Unterschied auf, während beim Vergleich der Glomerula von WT-Mäusen mit denen der $CCR7^{-/-}$ -Mäuse unabhängig vom Alter ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der IgM-Ablagerungen festgestellt wurde.

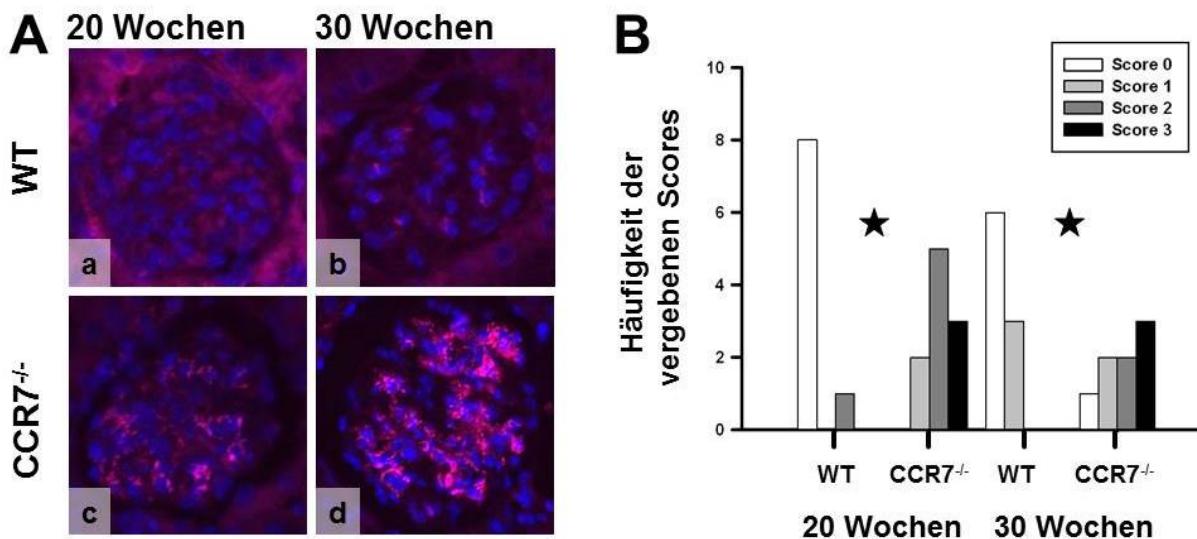


Abb. 39: Fluoreszenz-immunohistochemische Färbung gegen IgM. Abb. 39A zeigt Glomerula von 20 Wochen-alten WT- (Abb. 39A a) und $CCR7^{-/-}$ - (Abb. 39A c) Mäusen bzw. 30 Wochen-alten WT- (Abb. 39A b) und $CCR7^{-/-}$ - (Abb. 39A d) Mäusen. In Abb. 39B ist dargestellt wie häufig welcher Score je Alter und Genotyp vergeben wurde. Weiße Balken repräsentieren den Score 0, hellgraue den Score 1, dunkelgraue den Score 2 und schwarze den Score 3. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet. Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung.

Tabelle 28: Statistische Analyse bzgl. der IgM-Ablagerungen in 20 und 30 Wochen-alten WT- und $CCR7^{-/-}$ -Mäusen

		20 W		30 W
		WT	KO	WT
20 W	KO	***		
	WT	n. s.	**	
30 W	KO	**	n. s.	*
	WT			

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 9 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

3.2.3.2 Infiltrierende Makrophagen

Um zu überprüfen, ob eine $CCR7$ -Defizienz außer IgA- und IgM-Ablagerungen zu weiteren phänotypischen Veränderungen führt, die neben Komponenten auch Zellen des Immunsystems betreffen, wurde eine immunhistochemische Markierung des Makrophagen/Monozyten-spezifischen Oberflächenproteins Mac-2 (Galectin-3) durchgeführt. Pro Tier wurden verblindet je 20 Glomerula von 5 bis 30 Wo-

chen-alten Mäusen untersucht, indem die Zahl der infiltrierenden Makrophagen bestimmt wurde und in Relation zur Gesamtzahl der analysierten Glomerula je Maus gesetzt wurde. In Abb. 40 ist mittels Boxplot der Anteil an infiltrierenden Makrophagen pro Glomerulum dargestellt. Die hier erhobenen Daten sind voneinander unabhängig und nicht in allen Gruppen normalverteilt. Zur statistischen Analyse wurde eine univariante nicht-parametrische ANOVA nach Kruskal-Wallis [1952] durchgeführt. Nach Feststellen der statistischen Ungleichheit der Gruppenmediane wurden alle Gruppen paarweise nach dem nicht-parametrischen Signifikanztest von Mann und Whitney [1947] analysiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 29 gezeigt.

Im Median wurden bei 5 Wochen-alten WT-Mäusen 0,18 eingewanderte Makrophagen pro Glomerulum festgestellt. Dieser Wert erhöhte sich in den folgenden 5 Wochen zwar auf 0,33 Makrophagen pro Glomerulum, blieb aber dann mit 0,4 Makrophagen je Glomerulum in 15 Wochen-alten Mäusen und 0,3 bzw. 0,35 Makrophagen pro Glomerulum in 20 bzw. 30 Wochen-alten Tieren relativ konstant. Bei den jüngeren Tieren ergab die Analyse keinen signifikanten Unterschied zwischen altersgleichen Genotypen. Hier lag der anteilige Makrophageninflux bei $CCR7^{-/-}$ -Mäusen jeweils bei 0,25 bei 5 bzw. 10 Wochen-alten Tieren. Im Alter von 15 Wochen kam es mit 0,65 Makrophagen pro Glomerulum zu einem deutlichen, wenn auch nicht signifikanten Anstieg. Bei 20 und 30 Wochen-alten $CCR7^{-/-}$ -Mäusen ließen sich mit 0,6 bzw. 1,18 eingewanderter Makrophagen signifikant mehr der Immunzellen pro Glomerulum nachweisen als im WT-Pendant.

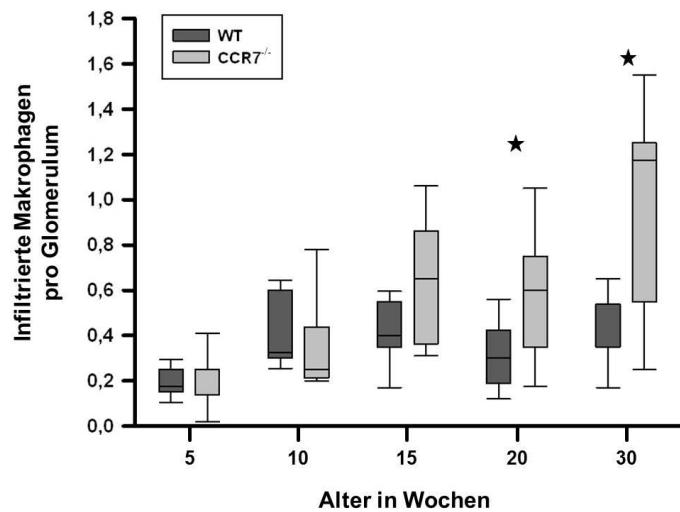


Abb. 40: Anteil der infiltrierenden Makrophagen pro Glomerulum in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und $CCR7^{-/-}$ - (hellgrau) Mäusen, dargestellt durch Boxplots mit 5, 25, 50, 75 und 95 %-Perzentil. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet.

Tabelle 29: Statistische Analyse bzgl. des glomerulären Makrophageninfiltrats in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und $CCR7^{-/-}$ -Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT
5 W	KO	n. s.								
	WT	*	*							
10 W	KO	n. s.	n. s.	n. s.						
	WT	*		n. s.	n. s.	n. s.				
15 W	KO	**	**	n. s.	*	n. s.				
	WT	*		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*		
20 W	KO	***	*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*		
	WT	***	**	***	***	***	***	***	***	
30 W	KO	**	**	n. s.	*	*	n. s.	**	n. s.	***
	WT									

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 10 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

3.2.4 Veränderte mRNA-Expression weiterer Chemokine

Eine mögliche Folge der CCR7-Defizienz stellt eine reaktive bzw. kompensatorische Veränderung der mRNA-Expression anderer Chemokine und Chemokinrezeptoren dar. Wie in Punkt 3.2.2 dargestellt, führt das Fehlen von CCR7 einerseits zu einem glomerulären Entwicklungsdefizit in jungen adulten Tieren sowie zu einem signifikanten Verlust glomerulärer Mesangialzellen in älteren adulten Tiere, andererseits kommt es gleichzeitig zu einer deutlichen Zunahme der extrazellulären Mesangialzellmatrix. Ein Bestandteil der akkumulierten Matrix sind Immundepots, wobei in dieser Arbeit (vgl. 3.2.3) nur der Nachweis für Immunglobulin des Typs A und M (IgA bzw. IgM) erbracht wurde. Basierend auf den in Abschnitt 3.2.2 und 3.2.3 dargelegten Ergebnissen wurden die mRNA-Expressionsmuster folgender Chemokine und Chemokinrezeptoren untersucht: CXCL13, CXCR5, CCL28 und CCR10.

Neben dem Chemokinligand-Rezeptor-Paar CCL21 und CCR7 spielen auch CXCL13 und CXCR5 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung lymphoider Organe. CCR7^{-/-}-Mäuse weisen eine veränderte Mikroarchitektur sekundärer lymphoider Organe auf [Förster *et al.*, 1999]. CXCR5^{-/-}-Mäusen hingegen fehlen neben verschiedener Typen peripherer Lymphknoten auch zu einem Großteil die Peyer'schen Plaques [Förster *et al.*, 1996; Ansel *et al.*, 2000]. Wie auf der Grundlage von Entwicklungsdefiziten lymphoider Organe bei CCR7^{-/-}, CXCR5^{-/-}- und CXCR5^{-/-}-CCR7^{-/-}-Mäusen beschrieben, scheinen CCR7 und CXCR5, sowie ihre Liganden bei der Entwicklung einiger lymphoider Organe zusammenzuwirken [Ohl *et al.*, 2003]. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei einer zugrundeliegenden CCR7-Defizienz CXCR5 hinsichtlich der Entwicklung peripherer Lymphknoten einen kompensatorischen Effekt hat. Um zu überprüfen, ob CXCL13 und CXCR5 auch in den Nieren von CCR7^{-/-}-Mäusen reguliert werden, wurden die renalen mRNA-Expressionsprofile in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Tieren erstellt.

Bezüglich der glomerulären IgA-Ablagerungen ist das Chemokinligand-/Rezeptorpaar CCL28 und CCR10 von Interesse. Morteau *et al.* [2008] konnten zeigen, dass die Akkumulation von IgA- bzw. IgM-Antikörper sezernierender Immunzellen in den Brustdrüsen laktierender Mäuse durch Ausschalten des Chemokinrezeptors CCR10 deutlich reduziert werden kann. Im Gegensatz zu CCL27, der einen weiteren CCR10-Liganden darstellt, zeichnet sich CCL28 durch seine hohe chemoattraktive Wirkung auf IgA- und IgM-sezernierende Plasmablasten aus Mucosagewebe und Lymphknoten aus [Kunkel *et al.*, 2003; Lazarus *et al.*, 2003; Sundström *et al.*, 2008]. Um zu testen, ob die glomerulären IgA- und IgM-Ablagerungen mit einer veränderten CCL27, CCL28 und CCR10 mRNA-Expression assoziiert sind, wurden auch für diese Moleküle die renalen mRNA-Expressionsmuster erstellt und zwischen den Genotypen verglichen.

Die hier erhobenen Daten in Form von $2^{-\Delta C_T}$ -Werten sind voneinander unabhängig und mit Ausnahme der zu CCR10 gehörenden $2^{-\Delta C_T}$ -Werte nicht normalverteilt. Der Einheitlichkeit halber wurden aber die Messwerte aller Gene wie nicht-normalverteilte Daten behandelt und mittels Boxplot dargestellt. Dem entsprechend erfolgten die dazugehörigen statistischen Analysen je über eine univariate nicht-parametrische ANOVA nach Kruskal-Wallis [1952], an die sich nach Feststellen der statistischen Ungleichheit der Gruppenmedianen für alle Gruppen ein paarweiser Vergleich mit Hilfe des nicht-parametrischen Signifikanztests von Mann und Whitney [1947] anschloss.

3.2.4.1 Das Chemokinligand-/Rezeptorpaar CXCL13 und CXCR5

Sowohl für CXCL13 also auch für seinen Rezeptor CXCR5 konnte in allen bzw. einigen Gruppen eine veränderte mRNA-Expression bei $CCR7^{-/-}$ -Mäusen gegenüber dem WT festgestellt werden. Von Interesse ist vor allem der Vergleich zwischen altersgleichen Gruppen, da sich auch beim selben Genotyp die Menge an exprimierter mRNA über die Zeit verändert.

a) CXCL13

Wie in Abb. 41 dargestellt, gibt es zwischen WT und $CCR7$ -defizienten Tieren bei allen Gruppen einen deutlichen CXCL13 mRNA-Expressionsunterschied zwischen den Genotypen. Die mediane x-fache Expressionsdifferenz beträgt den Faktor 2,9 bei 5 Wochen-alten Mäusen, steigt bei 10 Wochen-alten Mäusen auf 4,2 und erreicht bei 15 Wochen-alten Mäusen mit 5,6 ihr Maximum. Danach fällt sie auf 3,6 und 2,4 in 20 bzw. 30 Wochen-alten Tieren. Die medianen mRNA-Expressionsunterschiede zwischen altersgleichen Tieren sind stets statistisch signifikant (vgl. Tabelle 30). Diese Werte sowie die dazugehörigen Interquartilabstände sind in Tabelle 31 angegeben. Während sich über die Zeit die berechneten $2^{-\Delta CT}$ -Werte der $CCR7^{-/-}$ -Mäuse in einem vernachlässigbaren Rahmen ändern, sind es hauptsächlich die $2^{-\Delta CT}$ -Werte der WT-Mäuse, die zwischen der 5. und 15. Lebenswoche niedriger werden und in den älteren Tieren wieder steigen. Generell bewegen sich sowohl bei WT- als auch bei $CCR7^{-/-}$ -Mäusen die $2^{-\Delta CT}$ -Werte der 5 Gruppen im Median innerhalb in der gleichen Größenordnung. Nur zwischen der 20. und 30. Lebenswoche kann bei WT-Tieren ein signifikanter Anstieg der CXCL13 mRNA-Expression um einen Faktor von mehr als 2 festgestellt werden.

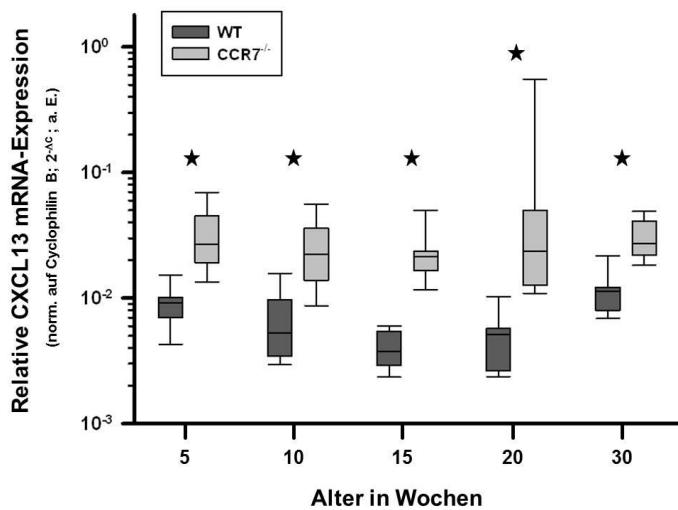


Abb. 41: Relative CXCL13 mRNA-Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und $CCR7^{-/-}$ - (hellgrau) Mäusen. Die Expressionsquantität ist logarithmisch in arbiträren Einheiten (a. E.) mittels Boxplots mit 5, 25, 50, 75 und 95 %-Perzentil dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet.

Tabelle 30: Statistische Analyse bzgl. der renalen CXCL13 mRNA-Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und $CCR7^{-/-}$ -Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO	**									
	WT	n. s.	**								
10 W	WT	*	n. s.	**							
	KO	n. s.	*	n. s.	**						
15 W	WT	*	**	n. s.	**						
	KO	**	n. s.	**	n. s.	**					
20 W	WT	*	**	n. s.	**	n. s.	**				
	KO	**	n. s.	**	n. s.	**	n. s.	**			
30 W	WT	n. s.	**	n. s.	*	**	*	**	*	**	
	KO	**	n. s.	**	n. s.	**	n. s.	***	n. s.	**	

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 9 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

Tabelle 31: Mediane x-fache Veränderung der CXCL13 mRNA-Expression

KO vs. WT	MFC (IQS)
5 Wochen	2,9 (2,3-4,6)
10 Wochen	4,2 (3,0-6,1)
15 Wochen	5,6 (4,7-6,1)
20 Wochen	3,6 (2,4-5,7)
30 Wochen	2,4 (2,0-3,5)

MFC: *Median x-fold change* (x-fache Veränderung im Median), IQS: Interquartilsspanne (25 bis 75 %-Perzentil)

b) CXCR5

Die Unterschiede in der CXCR5 mRNA-Expression zwischen WT und CCR7^{-/-}-Mäusen sind deutlich geringer ausgeprägt. Zwar kann bei CCR7^{-/-}-Mäusen zwischen der 5. und 10. sowie der 20. und 30. Lebenswoche gegenüber den WT-Tieren im Median eine erhöhte Expression der CXCR5-mRNA um den Faktor 1,8 bzw. 1,4 festgestellt werden (vgl. Tabelle 33). Wie in Tabelle 32 aufgeführt, ist dieser allerdings nicht statistisch signifikant. Wie in Abb. 42 gezeigt, haben altersgleiche Tiere ansonsten ein nahezu identisches Maß an renaler CXCR5-mRNA. Sowohl bei WT- als auch bei CCR7^{-/-}-Tieren kann über die Zeit von der 5. bis zur 30. Lebenswoche eine gesteigerte CXCR5 mRNA-Expression verzeichnet werden. Dabei beträgt der mediane Anstieg in WT-Mäusen 2,4 und in CCR7^{-/-}-Mäusen 4,2.

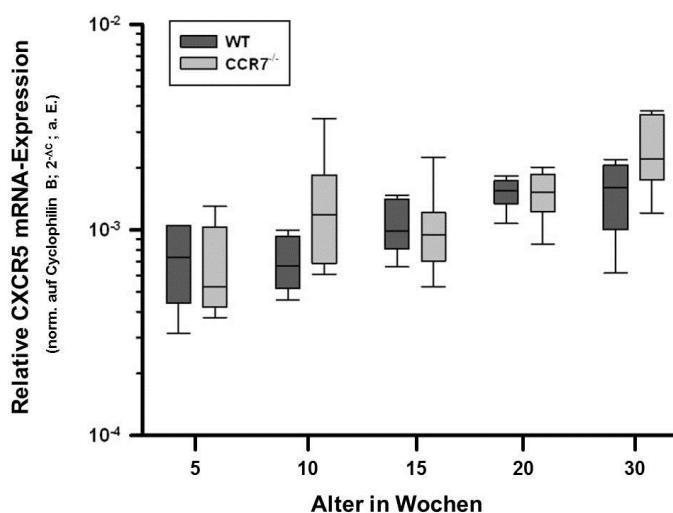


Abb. 42: Relative CXCR5 mRNA-Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen. Die Expressionsquantität ist logarithmisch in arbiträren Einheiten (a. E.) mittels Boxplots mit 5, 25, 50, 75 und 95 %-Perzentil dargestellt.

Tabelle 32: Statistische Analyse bzgl. der renalen CXCR5 mRNA-Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-} Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	
5 W	KO	n. s.									
10 W	WT	n. s.	n. s.								
	KO	n. s.	*	n. s.							
15 W	WT	n. s.									
	KO	n. s.									
20 W	WT	**	**	**	n. s.	*	*				
	KO	*	**	**	n. s.	*	n. s.	n. s.			
30 W	WT	*	**	*	n. s.						
	KO	**	**	**	n. s.	**	**	*	*	*	n. s.

* p<0,05; ** p<0,01; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 9 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

Tabelle 33: Mediane x-fache Veränderung der CXCR5 mRNA-Expression

KO vs. WT	MFC (IQS)
5 Wochen	0,7 (0,6-1,2)
10 Wochen	1,8 (1,0-2,6)
15 Wochen	1,0 (0,7-1,8)
20 Wochen	1,0 (0,9-1,2)
30 Wochen	1,4 (1,2-2,3)

MFC: *Median x-fold change* (x-fache Veränderung im Median), QS: Interquartilsspanne (25 bis 75 %-Perzentil)

3.2.4.2 Das Chemokinligand-/Rezeptorpaar CCL28 und CCR10

Bei CCL28 und CCR10 handelt es sich um das zweite Chemokinligand-Rezeptor-Paar, bei dem deutliche Differenzen bezüglich der mRNA-Expression von WT- und CCR7^{-/-}-Tieren beobachtet werden konnten. Neben CCL28 bindet auch CCL27 an CCR10. Bei der CCL27 mRNA-Expressionsanalyse wurden keine verschiedenen Expressionsmuster im Vergleich altersgleicher WT- und CCR7^{-/-}-Tieren festgestellt.

a) CCL28

Hinsichtlich der Expression der CCL28-mRNA unterscheiden sich, abgesehen von den jüngsten Tieren, alle CCR7^{-/-}-Gruppen signifikant von den altersgleichen WT-Tieren (vgl. Tabelle 34). Wie in Abb. 43 gezeigt, haben sowohl 5 Wochen-alte WT- als auch CCR7^{-/-}-Mäuse in Relation zu den übrigen Altersgruppen eine relativ niedrige CCL28 mRNA-Expressionsrate, die sich auch nur um den Faktor 0,7 im Median unterscheidet (vgl. Tabelle 35). Während jedoch das CCL28 mRNA-Expressionslevel im WT zwischen der 5. und 10. Lebenswoche nur um den Faktor 3,8 steigt, erhöht sich hier bei CCR7-defizienten Tieren die Menge an nachgewiesener CCL28-mRNA im Median um die Faktor 99,9. Die Ratio der beiden Mediane ergibt einen 17,2-fachen mRNA-Anstieg. Für die folgenden Altersgruppen bleibt die CCL28 mRNA-Expression bei CCR7^{-/-}-Tieren relativ konstant. In WT-Mäusen kann zwischen 10 und 15 bzw. 20 Wochen-alten Tieren zunächst eine Erhöhung der Expression um annähernd das Doppelte festgestellt werden. Zwischen 10. und 30. Lebenswoche erhöht sich die CCL28 mRNA-Expressionsrate im Median um den Faktor 3,4. Dem entsprechend sinkt der mediane x-fache Expressionsunterschied von WT- und CCR7^{-/-}-Tieren zwischen 10 und 15 Wochen-alten Tieren leicht auf 15,8. Bei 20 Wochen-alten Mäusen beträgt der Unterschied 10,7 und bei 30 Wochen-alten Mäusen 7,8.

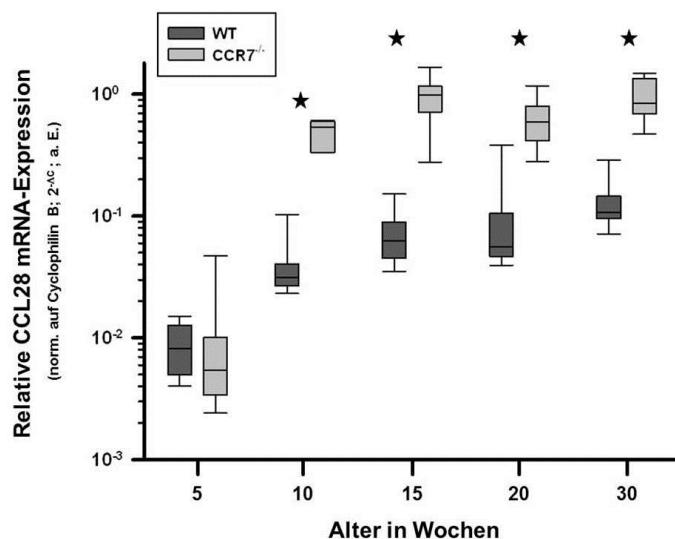


Abb. 43: Relative CCL28 mRNA-Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen. Die Expressionsquantität ist logarithmisch in arbiträren Einheiten (a. E.) mittels Boxplots mit 5, 25, 50, 75 und 95 %-Perzentil dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet.

Tabelle 34: Statistische Analyse bzgl. der renalen CCL28 mRNA Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT
5 W	KO	n. s.								
	WT	**	*							
10 W	KO	**	**	**						
	WT	**	**	n. s.	**					
15 W	KO	**	**	**	*	**				
	WT	**	**	*	**	n. s.	**			
20 W	KO	**	**	**	n. s.	**	n. s.	**		
	WT	**	**	*	**	*	**	n. s.	**	
30 W	KO	**	**	**	**	**	n. s.	***	n. s.	***
	WT	**	**	**	**	**	n. s.	***	n. s.	***

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 9 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

Tabelle 35: Mediane x-fache Veränderung der CCL28 mRNA-Expression

KO vs. WT	MFC (IQS)
5 Wochen	0,7 (0,4-1,2)
10 Wochen	17,2 (10,7-19,1)
15 Wochen	15,8 (11,6-18,1)
20 Wochen	10,7 (8,0-12,8)
30 Wochen	7,8 (6,6-13,0)

MFC: Median x-fold change (x-fache Veränderung im Median), IQS: Interquartilsspanne (25 bis 75 %-Perzentil)

b) CCR10

Wie bei seinem Liganden unterscheiden sich auch bei CCR10 WT und KO hinsichtlich der mRNA-Expressionsrate. Die medianen Gruppen- $2^{-\Delta CT}$ -Werte der WT-Mäuse zeigen keine Veränderung über den Zeitraum von 5 bis 20 Wochen. Lediglich der Expressionsunterschied zwischen der 20. und 30. Lebenswoche ist signifikant (vgl. Tabelle 36), hier beträgt der Anstieg der exprimierten CCR10-mRNA von der 20. zur 30. Lebenswoche im Median das 1,5-Fache. Mit einer 0,7-fachen medianen mRNA-Expressionsdifferenz bei 5 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Tieren exprimieren diese noch signifikant weniger CCR10-mRNA als das altersgleiche WT-Pendant (vgl. Tabelle 37). Danach steigt die CCR10 mRNA-Expressionsrate bis zur 20. Lebenswoche stetig an. Wie Abb. 44 zu entnehmen ist, gibt es bei 10 Wochen-alten Tieren noch keinen Unterschied zwischen den Genotypen. In

15. Lebenswoche beträgt der signifikante mRNA-Expressionsunterschied im Median den Faktor 1,9. Bei 20 und 30 Wochen-alten Mäusen liegt mit 4,7 bzw. 3,4 ebenfalls ein signifikanter mRNA-Expressionsunterschied vor.

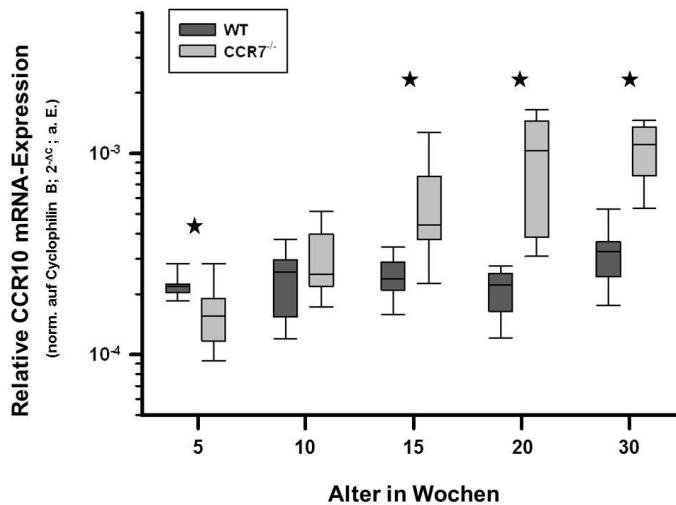


Abb. 44: Relative CCR10 mRNA-Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen. Die Expressionsquantität ist logarithmisch in arbiträren Einheiten (a. E.) mittels Boxplots mit 5, 25, 50, 75 und 95 %-Perzentil dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen sind unabhängig vom exakten p-Wert mit ★ gekennzeichnet.

Tabelle 36: Statistische Analyse bzgl. der renalen CCR10 mRNA Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-} Mäusen

		5 W		10 W		15 W		20 W		30 W
		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT
5 W	KO	*								
	WT	n. s.	n. s.							
10 W	KO	n. s.	*	n. s.						
	WT	n. s.	*	n. s.	n. s.					
15 W	KO	*	**	*	n. s.	*				
	WT	n. s.	**							
20 W	KO	**	**	**	**	**	n. s.	***		
	WT	n. s.	**	n. s.	n. s.	n. s.	*	*	**	
30 W	KO	***	**	**	**	**	n. s.	***	n. s.	***
	WT	n. s.								

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n. s. nicht signifikant. Pro Gruppe wurden 6 bis 9 Tiere analysiert. Altersgleiche Gruppen sind hervorgehoben.

Tabelle 37: Mediane x-fache Veränderung der CCR10 mRNA-Expression

KO vs. WT	MFC (IQS)
5 Wochen	0,7 (0,6-0,9)
10 Wochen	1,0 (0,9-1,5)
15 Wochen	1,9 (1,6-2,8)
20 Wochen	4,7 (2,1-6,4)
30 Wochen	3,4 (2,5-4,1)

MFC: Median x-fold change (x-fache Veränderung im Median), IQS: Interquartilsspanne (25 bis 75 %-Perzentil)

3.3 Erzeugung der Podocin-rtTA_CCL21a-Tet-On-Maus

Im zuvor beschriebenen Tiermodell wurde durch Ausschalten von CCR7 die CCL21-CCR7-Achse und damit die durch deren Interaktion eingeleitete Signaltransduktionskaskade blockiert. Um die Bedeutung von CCL21 und CCR7 weiter zu charakterisieren soll dieser Signalweg im Folgenden verstärkt aktiviert werden. Ziel ist es daher ein Mausmodell zu generieren, bei dem spezifisch im Podozyten einen CCL21-Überexpression induziert werden kann.

Dieses Mausmodell, die Podocin-rtTA_CCL21a-Tet-On-Maus, soll durch Verpaarung zweier Mauslinien entstehen. Bei der ersten Mauslinie handelt es sich um die Podocin-rtTA Maus, die von Prof. Dr. Marcus Möller aus Aachen bezogen werden soll. Diese Maus ist transgen für den Podozin-Promotor, der die nachfolgende Sequenz des rtTA-Elements (*reverse tetracycline-controlled transcriptional activator*) kontrolliert. Die CCL21a-Tet-On-Maus muss zunächst noch generiert werden. Hier soll über Pronukleusinjektion die murine CCL21a-Sequenz stabil in das Genom integriert werden. Die CCL21a-Sequenz steht dabei unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Cytomegalievirus), welcher zusätzlich über das tetO-Element verfügt. Durch Verpaarung der beiden Mauslinien soll die Podocin-rtTA_CCL21a-Tet-On-Maus entstehen, bei der spezifisch im Podozyten nach Gabe von Doxycyclin CCL21a überexprimiert wird. Dies ist dadurch möglich, dass aufgrund des Podozyten-spezifischen Podocin-Promotors nur in Podozyten das rtTA-Element konstitutiv exprimiert wird. Dieses kann allerdings nur in Anwesenheit von Doxycyclin an das tetO-Element des genannten CMV-Promotors binden und damit als Transkriptionsaktivator für die Transkription von CCL21a fungieren [Shigehara et al., 2003; Möller et al., 2005].

Die im Folgenden hergestellten Plasmide kodierten für die murine CCL21-Isoform CCL21a. Um die Funktionalität *in vitro* zu testen, wurde auf Basis des pTRE_tight-Vektors (Clontech) der pTRE_CCL21a-Vektor hergestellt. 24 Stunden nach Co-Transfektion mit pTet-On-Advanced (Clontech) in HEK 293T-Zellen (*human embryonic kidney*) wurde mit Doxycyclin induziert. Der Vektor pTet-On-Advanced kodiert für das rtTA-Element muss co-transfiziert werden, damit eine Induktion der Genexpression von CCL21a möglich ist. Je 4, 8, 12 und 24 Stunden nach der Induktion wurden die Zellen von den jeweiligen Kulturschalen abgenommen und zur Proteinextraktion lysiert. Zur Kontrolle blieben die HEK 293T-Zellen in einem Ansatz unbehandelt, wurden also weder transfiziert noch induziert. In einem weiteren Kontrollansatz wurden die Zellen zwar mit dem pTRE_CCL21a-Vektor transfiziert, jedoch nicht induziert. Die Zellen in den beiden Kontrollansätzen wurden ansonsten wie die Zellen der vier Probeansätze behandelt und zum gleichen Zeitpunkt wie der 24 Stunden-Ansatz abgenommen und lysiert. Nach Bestimmen der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay wurden pro Probe 20 µg Protein zur SDS-PAGE eingesetzt. Ferner wurde neben einem molekularen Größenstandard auch rekombinantes CCL21 als Positivkontrolle aufgetragen. Im darauffolgenden Western Blot wurde zunächst CCL21 und dann Aktin als Ladekontrolle detektiert.

Wie in Abb. 45 zu sehen ist, sind HEK 293T-Zellen mit dem pTRE_CCL21a-Vektor transfizierbar und induzierbar. Während 4 Stunden nach Induktion mit Doxycyclin eine CCL21-Bande erst nur schwach erkennbar ist, steigt die Menge an synthetisiertem Protein im Zeitverlauf über 8, 12 und 24 Stunden deutlich an. Im unbehandelten Kontrollansatz ist keine Bande zu erkennen, was bedeutet, dass endogenes CCL21 nicht nachgewiesen werden kann oder die Menge unter der Nachweisgrenze liegt. Im

transfizierten, aber nicht induzierten Kontrollansatz ist ebenfalls keine Bande sichtbar, womit gezeigt werden konnte, dass CCL21 nur nach Zugabe von Doxycyclin exprimiert wird. Die Positivkontrolle beweist die Spezifität des Antikörpers. Nach dem Western Blot gegen CCL21 wurde die Membran gereinigt und für einen weiteren Blot gegen Aktin verwendet. In allen Spuren, die Zelllysat enthielten, konnte in der Ladekontrolle dieselbe Menge an Aktin festgestellt werden.

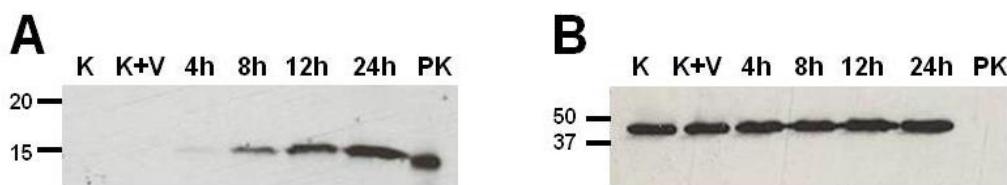


Abb. 45: Western Blot-Analyse zur Induzierbarkeit von pTRE_CCL21a in HEK 293T-Zellen. Abb. 45 A zeigt den Blot gegen CCL21, Abb. 45 den Blot gegen Aktin. Rechts der molekulare Größenstandard; K: nicht-transfizierte, nicht-induzierte Kontrollzellen; K+V: transfizierte, aber nicht-induzierte Kontrollzellen; 4h, 8h, 12 h und 24h: transfizierte und induzierte Zellen, die 4, 8, 12 bzw. 24 Stunden nach Induktion lysiert wurden; PK: Positiv-Kontrolle.

3.4 Potenzielle Regulationsmechanismen in Mesangialzellen

3.4.1 In vitro-Überexpression der Fusionsproteine CCL21a-Luciferase und CCL21a-GFP

Die in Punkt 3.3.1 beschriebene Transfektion wurde auch bei murinen Mesangialzellen (MMCs, *murine mesangial cells*) durchgeführt. Im Gegensatz zu HEK 293T-Zellen konnte hier keine CCL21a-Überexpression induziert werden. Um auszuschließen, dass MMCs *per se* nicht transfizierbar sind, wurden die Zellen je mit einem Vektor, der für die *Firefly*-Luciferase bzw. für GFP (*green fluorescent protein*) kodierte, transfiziert (pTRE_Luci bzw. pEGFP-N1). Ferner wurde je ein Konstrukt generiert, in dem der Luciferase- bzw. GFP-Sequenz die murine CCL21a-Sequenz vorgeschalten war, so dass im Falle einer Transkription entweder ein CCL21a-Luciferase- oder CCL21a-GFP-Fusionsprotein entstand. Die beiden Luciferase-Vektoren basierten auf dem Grundgerüst des pTRE_tight-Vektors, die GFP-Vektoren auf pEGFP-N1. Als Kontrolle für dieses Experiment dienten HEK 293T-Zellen.

3.4.1.1 Transfektion von HEK 2T93-Zellen und MMCs mit pTRE_Luci und pTRE_CCL21a_Luci

HEK 293T-Zellen und MMCs wurden in einer Co-Transfektion mit dem Vektor pTet-On-Advanced entweder mit pTRE_Luci oder pTRE_CCL21a_Luci transfiziert. Die Induktion mit Doxycyclin erfolgte 24 Stunden später. Die Zellen wurden 4, 8 bzw. 24 Stunden nach der Induktion von den Kulturschalen abgenommen. Zudem gab es einen Kontrollansatz, der weder transfiziert noch induziert wurde. Die Zellen in diesem Ansatz wurden ansonsten identisch behandelt und gleichzeitig mit dem 24 Stunden-Ansatz von den Kulturschalen abgenommen. Nach der Zellernte wurde die Zellzahl bestimmt und pro Ansatz 10^5 Zellen für einen Luciferase-Assay verwendet.

Wie in Abb. 46 dargestellt, lassen sich sowohl pTRE_Luci als auch pTRE_CCL21a_Luci in HEK 293T-Zellen transfizieren und anschließend mit Doxycyclin induzieren. Bei den durch die weißen Balken

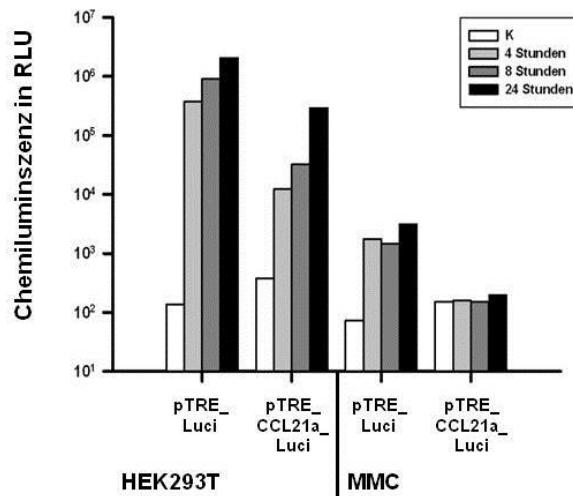


Abb. 46: Luciferase-Assay zu den mit pTRE_Luci bzw. pTRE_CCL21a_Luci transfizierten HEK 293T-Zellen bzw. MMCs.
Die Stärke der Chemilumineszenz ist in RLU (relative light units) in logarithmischer Form dargestellt. Weiße Balken repräsentieren den Kontrollansatz, alle übrigen die transfizierten und induzierten Ansätze, wobei die Zellen 4 Stunden (hellgraue Balken), 8 Stunden (dunkelgraue Balken) bzw. 24 Stunden (schwarze Balken) nach der Induktion abgenommen wurden.

repräsentierten Kontrollansätze liegt die Chemilumineszenz in HEK 293T-Zellen wie auch in MMCs bei einer Größenordnung von 100 RLUs (*relative light units*). Während bei den mit pTRE_Luci bzw. mit pTRE_CCL21a_Luci transfizierten HEK 293T-Zellen nach der Induktion die Chemilumineszenz um den Faktor 10^3 bis 10^4 bzw. 10^3 bis 10^4 ansteigt, beträgt die Chemilumineszenz bei MMCs, die mit pTRE_Luci transfiziert wurden, je nach Zeitpunkt nach Induktion zwischen 1467 und 3170 RLUs. Im Gegensatz dazu kann bei MMCs, die mit pTRE_CCL21a_Luci transfiziert wurden, keine Veränderung der Chemilumineszenz gegenüber dem basalen Level festgestellt werden.

3.4.1.2 Transfektion von HEK 293T-Zellen und MMCs mit pEGFP-N1 und p-CCL21a-EGFP-N1

Eine Möglichkeit, warum die in MMCs nach Transfektion mit pTRE_CCL21a_Luci gemessene Chemilumineszenz das Hintergrundlevel nicht überschreitet, stellt ein zwar synthetisiertes, aber inaktives CCL21a-Luciferase-Fusionsprotein dar. Um dies auszuschließen und das Ergebnis des Luciferase-Assays (vgl. 3.4.1.1) abzusichern, wurden HEK 293T-Zellen und MMCs zusätzlich mit pEGFP-N1 bzw. p-CCL21a-EGFP-N1 transfiziert.

Da die Sequenzen der Zielgene unter der Kontrolle eines CMV-Promotors stehen, ist weder eine Co-Transfektion mit pTet-On-Advanced noch eine Induktion mit Doxycyclin nötig. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mikroskopisch untersucht.

Analog zum Luciferase-Assay im vorangegangenen Unterpunkt kann bei HEK 293T-Zellen, die mit p-EGFP-N1 transfiziert wurden, am meisten GFP-Signal registriert werden. Dies bezieht sich zum einen auf die Anzahl der fluoreszierenden Zellen, zum anderen auf die Fluoreszenz-Intensität. Im Gegensatz dazu ist das GFP-Signal bei HEK 293T-Zellen nach Transfektion mit p-CCL21a-EGFP-N1 in weniger Zellen feststellbar und z. T. schwächer (vgl. Abb. 47).

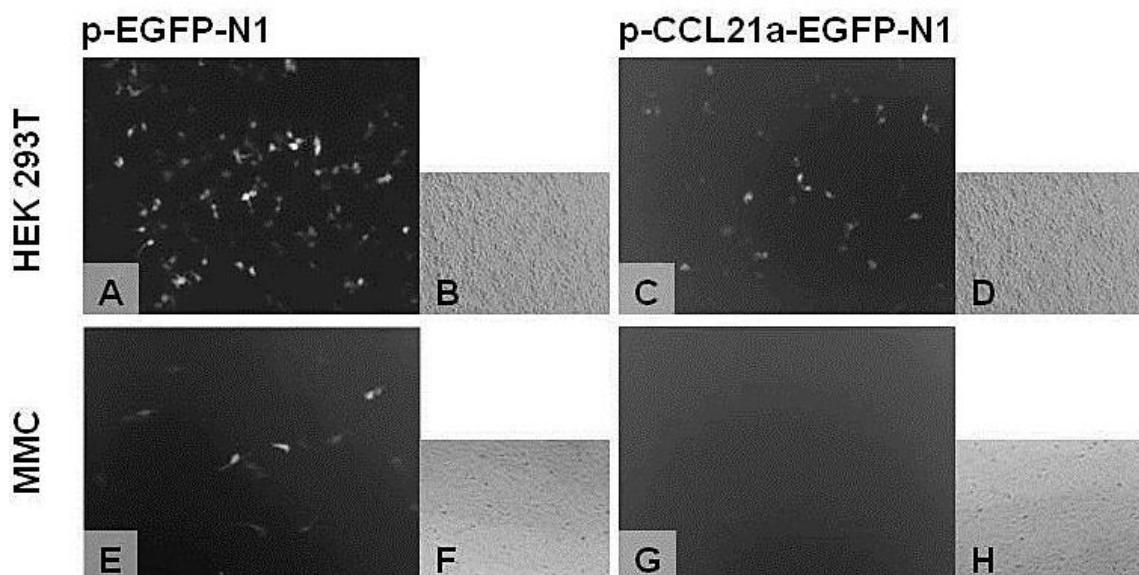


Abb. 47: Mikroskopie-Aufnahmen von kultivierten HEK 293T-Zellen und MMCs, 24 Stunden nach Transfektion mit p-EGFP-N1 bzw. p-CCL21a-EGFP-N1. Abb. 47A-D zeigt transfizierte HEK 293T-Zellen, Abb. 47E-H transfizierte MMCs. In Abb. 47A und E wurden die Zellen mit p-EGFP-N1 transfiziert, in Abb. 47C und G mit p-CCL21a-EGFP-N1. Abb. 47A, C, E und G zeigen Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, analog dazu in Abb. 47B, D, F bzw. H dieselben Zellen im Phasenkontrast.

Genauso verhält es sich bei MMCs, die mit pEGFP-N1 transfiziert wurden. Einerseits ist die Anzahl der Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben gegenüber der Anzahl der transfizierten HEK 293T-Zellen reduziert, andererseits verfügt das Fluoreszenzsignal meist über eine deutliche niedrigere Intensität. Bei MMCs, die mit p-CCL21a-EGFP-N1 transfiziert wurden, konnte zu keinem Zeitpunkt eine Fluoreszenz festgestellt werden.

Wie im Luciferase-Assay konnte auch mittels Transfektion von pEGFP-N1 in MMCs gezeigt werden, dass MMCs *per se* transfizierbar sind, wenn gleich das erhaltene Signal deutlich geringer war als in HEK 293T-Zellen. Allerdings war es auch im Fall des zweiten Fusionsproteins, des CCL21a-GFP-Fusionsproteins, nicht möglich, in MMCs ein Fluoreszenz-Signal zu detektieren.

3.4.2 Transfektionsexperimente mit CCL21a-Teilsequenz-Konstrukten

Die vorangegangenen Experimente in Punkt 3.4.1 erlauben die mögliche Schlussfolgerung, dass eventuell ein Regulationsmechanismus existiert, der verhindert, dass CCL21a in kultivierten Mesangialzellen exprimiert wird. Basierend auf den Beobachtungen, dass MMCs einerseits in der Lage sind, funktionell aktive Formen von Luciferase bzw. GFP zu synthetisieren, andererseits die beiden davon abgeleiteten CCL21a-Fusionsproteine nicht, – obwohl die prinzipielle Funktionalität des CCL21a-Luciferase- bzw. CCL21a-GFP-Fusionsproteins in HEK 293T-Zellen gezeigt werden konnte –, soll im Folgenden näher untersucht werden, ob eine potentielle Regulation auf mRNA-Ebene stattfindet. Dazu wurden analog zu den Klonierungen im vorangegangenen Punkt CCL21a-Luciferase-Fusionsproteine generiert, die an Stelle der gesamten CCL21a-Sequenz nur über eine CCL21a-Teilsequenz verfügten. Ziel war es, regulative Elemente, mit der CCL21a-CDS (*coding DNA sequence; Kodierende DNA-Sequenz*) interagieren ausfindig zu machen bzw. den genauen Ort der Element-CDS-Wechselwirkung auf einen kürzeren Abschnitt einzuschränken.

Insgesamt wurden vier Konstrukte basierend auf den Vektor pTRE_Luci hergestellt. Da die CDS von CCL21a über 398 Nukleotiden verfügt, hatten die Teilsequenzen eine Länge von ca. 100 bis 130 Basen. Um zu verhindern, dass mögliche mRNA-Bindestellen an den Enden der Teilsequenzen nicht mehr als solche fungieren können, überlappten die Teilsequenzen an ihren Enden. Zudem sollte der Vergleichbarkeit wegen in allen Fällen Fusionsproteine entstehen und eine mögliche Verschiebung des Leserasters verhindert werden. Daher wurde, abgesehen von der ersten Teilsequenz, vor jede CCL21a-Teilsequenz die Startkodon-Nukleotidsequenz ATG eingebracht. Die letzte Teilsequenz wurde zudem ohne Stopkodon vor die Luciferasesequenz kloniert. In Tabelle 38 sind die Namen der Konstrukte, der Abschnitt in der CDS und ob ein Startkodon vor der CDS neu eingefügt werde, aufgeführt.

Tabelle 38: Namen und Charakteristika der CCL21a-Teilsequenz-Luciferase-Konstrukte

Name	Nr. der Nukleotide In der CDS	ATG vor CCL21a- CDS eingefügt
pTRE_CCL21a(1-116)_Luci(2)	1 bis 116	Nein
pTRE_CCL21a(91-209)+ATG_Luci(2)	91 bis 209	Ja
pTRE_CCL21a(190-326)+ATG_Luci(2)	190 bis 326	Ja
pTRE_CCL21a(304-398)+ATG_Luci(2)	304 bis 398	Ja

Die Transfektion und Induktion der CCL21a-Teilsequenz-Luciferase-Konstrukte, sowie von pTRE_CCL21a_Luci in HEK 293T-Zellen und MMCs verlief analog zu den vorangegangenen Experimenten. Als Kontrollen diente pro Vektor ein Ansatz, der mit dem jeweiligen Konstrukt transfiziert, aber nicht induziert wurde. Ferner gab es einen Kontrollansatz zur Hintergrundlumineszenz, bei dem die Zellen weder transfiziert noch induziert wurden. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Induktion bzw. zeitgleich im Fall der Kontrollansätze von den Kulturschalen abgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden pro Ansatz 10^5 Zellen für den Luciferase-Assay eingesetzt.

Abb. 48 zeigt das Ergebnis des Assays. Der Übersicht halber wurde auf die Darstellung der jeweiligen transfizierten jedoch nicht-induzierten Kontrollansätze verzichtet. Die gemessene Chemilumineszenz dieser verblieb in allen Experimenten auf dem Niveau der nicht-transfizierten und nicht-induzierten Kontrollzellen. Die RLU-Werte der letztgenannten Kontrolle flossen in Abb. 48 ein.

Sowohl bei HEK 293T-Zellen als auch MMCs ist die gemessene Lumineszenz der nicht-transfizierten und nicht-induzierten Kontrollzellen zu vernachlässigen. In den transfizierten HEK 293T-Zellen konnte unabhängig vom Vektor eine deutliche Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings weist die Luciferase in den Ansätzen, in denen dem Protein nur eine CCL21a-Teilsequenz vorgeschalten ist, eine 8,4 bis 15,5-fach erhöhte Aktivität gegenüber dem Ansatz auf, der mit pTRE_CCL21a_Luci transfiziert wurde. Bei den transfizierten MMCs verhält es sich analog. Hier konnte hinsichtlich der gemessenen Chemilumineszenz in den Ansätzen, die mit dem Fusionsprotein transfiziert wurden, das die vollständige CCL21a-Sequenz enthält, eine Erhöhung um den Faktor 7,8 bis 12,2 festgestellt werden.

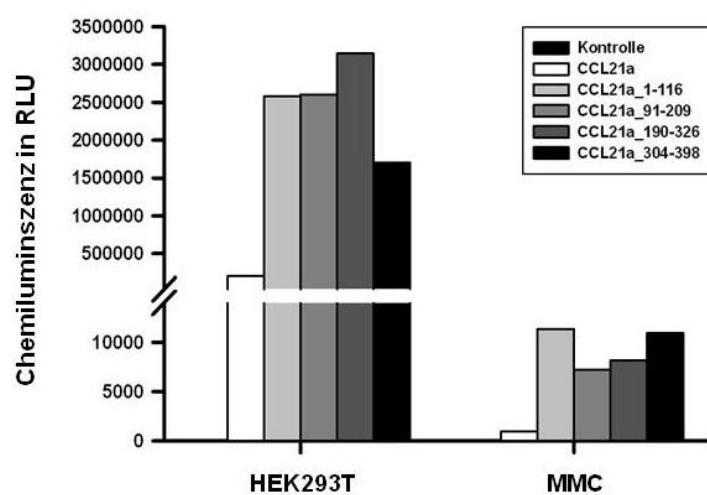


Abb. 48: Luciferase-Assay zu den pTRE CCL21a Lici und CCL21a-Teilsequenz-Luciferase-Konstrukten transfizieren HEK 293T-Zellen bzw. MMCs. Die Stärke der Chemilumineszenz ist in RLU (relative light units) angegeben. Die Skalierung der y-Achse ist linear, wobei die Skalierung unterhalb der Aussparung in 5000-er Intervallen erfolgt, über der Aussparung hingegen in 500.000-er Intervallen. Der pro Gruppe linke schwarze Balken repräsentiert die nicht-transfizierten, nicht-induzierten Kontrollansätze (Kontrolle), weiße Balken Zellen nach Transfektion mit pTRE CCL21a Lici (CCL21a), hellgraue Balken Zellen nach Transfektion mit pTRE_CCL21a(1 116)_Luci(2) (CCL21a_1-116), mittelgraue Balken Zellen nach Transfektion mit pTRE_CCL21a(91 209)+ATG_Luci(2) (CCL21a_91-209), dunkelgraue Balken Zellen nach Transfektion mit pTRE_CCL21a(190 326)+ATG_Luci(2) (CCL21a_190-326) und der pro Gruppe rechte schwarze Balken Zellen nach Transfektion mit pTRE_CCL21a(304-398)+ATG_Luci(2) (CCL21a_304-398).

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die hier dargelegten Ergebnisse zeigen die Bedeutung des Chemokinligand-Rezeptor-Paares CCL21 und CCR7 für die renale Entwicklung und Morphologie unter physiologischen, nicht-inflammatorischen Bedingungen. Sowohl CCR7 als auch sein Ligand CCL21 konnten bereits in der frühen Nephrogenese auf mRNA-Ebene wie auch immunhistochemisch nachgewiesen werden. Für beide wurde während der Embryonalentwicklung ein distinktes Expressionsmuster festgestellt, welches im Fall von CCL21 in adulten Mäusen spezifisch auf Podozyten lokalisiert.

Im Tiermodell wurde durch Ausschalten von CCR7 die CCL21-CCR7-Signalkaskade blockiert. Hierbei zeigte sich, dass beim Vergleich der Gewichtsverhältnisse verschiedener Organe zum Gesamtkörpergewicht neben den Nieren auch Milz und Herz betroffen sind. Im Gegensatz dazu scheint das Fehlen von CCR7 keinen Einfluss auf die Entwicklung der Leber zu haben. Zudem konnte weder bezüglich des Blutdrucks noch bei den Serumanalysen hinsichtlich der Parameter Gesamtprotein, Kreatinin und Albumin zwischen WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen ein Unterschied festgestellt werden. Zwar ergab die Urinanalyse bezüglich der ausgeschiedenen Proteine im Vergleich zum Menschen hohe Werte, die Menge an ausgeschiedenem Albumin blieb jedoch relativ niedrig. Die Untersuchung der Urine mittels SDS-PAGE konnte aufzeigen, dass es sich bei einem Großteil der Proteine im Urin, um *major urinary proteins* handelte, die der chemischen Kommunikation dienen. Proteine mit höherem Molekulargewicht konnten nur in minimalen Mengen nachgewiesen werden, was nahelegt, dass der glomeruläre Filter, bestehend aus der Basalmembran, dem fenestrierten Endothel und den Podozyten, von der CCR7-Defizienz nicht betroffen ist. Dieser Befund wird durch elektronenmikroskopische Aufnahmen untermauert. Basierend auf den hier erhobenen Daten erwiesen sich innerhalb der Niere spezifisch nur die Glomerula und in diesen hauptsächlich Mesangialzellen einschließlich der sie umgebenden extrazellulären Matrix als von der CCR7-Defizienz betroffen. Nach der Glomerulogenese zeigte sich bei 5 Wochen-alten Tieren noch immer ein Entwicklungsdefizit hinsichtlich der Ausbildung des Schlingenkonvoluts, das aber bis zum Alter von 10 Wochen kompensiert war. Danach allerdings kam es zu einem rapiden Verlust der glomerulären Mesangialzellen. Bei 30 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen ist der Mesangialzellanteil gegenüber dem WT auf 58% gesunken. Mit Verlust der Mesangialzellen ging eine massive Expansion der extrazellulären Matrix einher. Dies konnte einerseits mittels Histochemie (PAS- und Sirius Rot-Färbung) andererseits durch Elektronenmikroskopie dokumentiert werden. Der genaueren Charakterisierung der Ablagerungen diente die Silberfärbung der Nierenpräparate wie auch der Fluoreszenz-immunhistochemische Nachweis von der Immunglobuline Typ A und M. Simultan zum Verlust der Mesangialzellen wurde ein signifikanter Makrophageinflux festgestellt. Zudem konnte bei CCR7^{-/-}-Mäusen eine veränderte mRNA-Expression anderer Chemokine und Chemokinrezeptoren nachgewiesen werden. So konnte bei den Liganden CCL28 und CXCL13, sowie ihren Rezeptoren CCR10 und zum Teil CXCR5 in einigen oder allen Altersgruppen ein deutlicher Anstieg der Gesamtnieren-mRNA bestimmt werden.

Neben den genannten Analysen wurden Zellkulturexperimente durchgeführt, um eventuelle Regulationsmechanismen des Chemokinligand-Rezeptor-Paares auf mRNA-Ebene aufzudecken. Es ist anzunehmen, dass beide einer genauen Kontrolle unterliegen, da CCR7 und CCL21 auch in anderen Organen wie beispielsweise den Lymphknoten eine wichtige Rolle in Entwicklung und Funktion spielen.

Diskussion

4 Diskussion

Nach Entdeckung ihrer chemoattraktiven Wirkung auf Leukozyten wurde zunächst angenommen, dass Chemokine und ihre Rezeptoren hauptsächlich in immunologischen Prozessen eine Rolle spielen. Allerdings zeigte sich bald, dass das Wirkspektrum dieser Moleküle auch zahlreiche weitere Funktionen umfasst (vgl. 1.2.2). Mit den hier dargelegten Ergebnissen kann dieses nochmals erweitert werden. In dieser Arbeit konnte erstmals im Mausmodell sowohl die Expression des Chemokinligand-/Rezeptorpaars CCL21/CCR7 auf renalen Nicht-Immunzellen nachgewiesen als auch die Folgen einer CCR7-Defizienz beschrieben werden.

Dabei lieferten die Arbeiten von Banas *et al.* [1999; 2002; 2004] und Wörnle *et al.* [2004] entscheidende Hinweise für eine funktionelle Bedeutung von CCL21 und CCR7 für glomeruläre Mesangialzellen. Die Stimulation dieser Zellen mit CCL21 führt u. a. zu einer gesteigerten Proliferations- und Migrationsfähigkeit, sowie einer reduzierten Suszeptibilität gegenüber induzierter Apoptose.

4.1 CCR7 und CCL21 werden renal von frühester Entwicklung an exprimiert

4.1.1 Bekannte Chemokin-Protein und CCL21/CCR7 mRNA-Expression in der Nephrogenese

Die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3, CXCR4 und CX₃CR1 sowie ihrer Liganden CXCL10, CXCL12 bzw. CX₃CL1 in der humanen Nephrogenese wurde erstmals von Gröne *et al.* [2002] beschrieben. Diese konnten in unterschiedlichen sich entwickelnden renalen Strukturen und zu verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Neben dieser Arbeit konnte auch im Tiermodell eine embryonale Chemokinexpression in der entstehenden Niere gezeigt werden. CXCR1 und CXCR2 mit seinen Liganden CXCL1, 2, 5 und 7 sind in embryonalen Rattennieren detektierbar [Levashova *et al.*, 2007]. Die Bedeutung dieser Moleküle steht allerdings hauptsächlich in Zusammenhang mit den proangiogenetischen Eigenschaften, über die CXC-Chemokine häufig verfügen [Strieter *et al.*, 1995 (b); Levashova *et al.*, 2007].

Unter den CXC-Chemokinen stechen vor allem CXCL12 und sein Rezeptor CXCR4 hervor. Tiere, denen entweder Ligand oder Rezeptor fehlen, sterben perinatal aufgrund von massiven Entwicklungsstörungen. Von diesen ist jedoch auch die Niere betroffen, da beide bereits in der frühen Nephrogenese exprimiert werden und essentielle Faktoren für die renale Gefäßentwicklung darstellen [Takabatake *et al.*, 2009; Ueland *et al.*, 2009].

Basierend auf Expressionsanalysen an humanem Nierengewebe von gesunden erwachsenen Spendern konnte mit CCL21 und seinem Rezeptor CCR7 erstmals ein CC-Chemokinligand-/Rezeptorpaar identifiziert werden, das unter physiologischen Bedingungen konstitutiv exprimiert wird. CCL21 lokaliisiert dabei auf Podozyten, CCR7 auf Mesangialzellen [Banas *et al.*, 2002]. Mit Hilfe weiterführender Untersuchungen an humanen fetalen Nieren (nicht publiziert) konnte der Nachweis erbracht werden,

dass CCL21 und CCR7 ebenfalls bereits in der humanen Nephrogenese exprimiert werden. Zudem erwies sich in Vorarbeiten zur Etablierung des entsprechenden Tiermodells die renale CCL21 und CCR7 mRNA-Expression gegenüber anderen Chemokinen als eine der stärksten.

Den ersten Abschnitt dieser Arbeit stellte damit die Analyse der murinen renalen CCL21 und CCR7 mRNA-Expression dar. Die Expressionsanalysen deckten einen Zeitraum von Tag 14.5 der Embryonalentwicklung bis zum Alter von 30 Wochen ab und umfassten Gruppengrößen von 5 bis 10 WT-Tieren. Sowohl CCR7 als auch sein Ligand CCL21 waren auf mRNA-Ebene über die gesamte Zeitspanne kontinuierlich detektierbar (vgl. Abb. 15). Dabei unterschieden sich die Expressionsmuster von Rezeptor und Ligand voneinander. Während die CCR7-Expression vor der Geburt am niedrigsten war und dann in älteren adulten ihr Maximum erreicht, stieg die Menge der CCL21-mRNA von E14.5 bis 16.5 auf ihr Maximum und fiel danach wieder ab, um in adulten Tieren wieder anzusteigen. Damit konnte erstmals unter nicht-pathologischen Bedingungen eine konstitutive mRNA-Expression eines CC-Chemokinligand-/Rezeptorpaars in der Niere festgestellt werden. Die folgende Immunhistochemie sollte einerseits die CCL21-/CCR7-Expression auf Proteinebene bestätigen und andererseits eine genauere Lokalisation der beiden Moleküle erlauben.

4.1.2 CCR7 Proteinexpression

Auf Proteinebene verhielt sich der Verlauf der CCR7-Proteinexpression entgegengesetzt zur mRNA-Expression (vgl. Abb. 16). Die hinsichtlich ihrer Intensität und auf die renale Struktur bezogene Spezifität deutlichste CCR7-Expression wurde hier an den analysierten Embryonaltagen 14.5 und 17.5 und an Tag 2 und 5 nach der Geburt festgestellt. Als CCR7-positiv konnten das metanephrogene Mesenchym, sowohl im Bereich des kappenförmigen Mesenchyms als auch im mesenchymalen Stroma, und die luminale Seite der Ureterknospe identifiziert werden. Im Lauf der Entwicklung stellten auch die renalen Vesikel und Komma-förmigen Körperchen einen Expressionsort des Chemokinrezeptors dar. In der postpartalen Nephrogenese lokalisierte das Molekül insbesondere auf Zellen in der Spalte des S-förmigen Körperchens und auf den Mesangialzellen im Zentrum des sich entwickelnden Glomerulums im frühen Kapillarschlingenstadium. Danach verlor die Proteinexpression sowohl an Intensität als auch an Spezifität bis sie in adulten Tieren im Glomerulum nur noch schwach und diffus erkennbar war. Basierend auf der immunhistochemischen Analyse der renalen Chemokinrezeptor-Expression liegt damit bei adulten Mäusen, im Gegensatz zu gesunden erwachsenen Menschen [Banas *et al.*, 2002], keine konstitutive oder - in Anbetracht der höheren CCR7 mRNA-Expression in älteren als in jüngeren Tieren - eventuell nur eine sehr schwache mesangiale CCR7-Proteinexpression vor.

Die CCR7-Expression in der embryonalen und frühen postpartalen Nierenentwicklung korreliert mit der verschiedener Mesangialzellmarker wie PDGFR- β [Alpers *et al.*, 1993], Thy-1 [Ricono *et al.*, 2003] und α -SMA [Nehls und Drenckhahn, 1991]. Diese Moleküle werden in adulten Tieren konstitutiv von Mesangialzellen exprimiert. Mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie konnten Arar *et al.* [2000] PDGFR- β in Nieren aus 16 und 17 Tage-alten Rattenembryonen lokalisieren. Analog zu CCR7 konnte PDGFR- β in Mausembryonen im metanephrogenen Mesenchym und in der Ureterknospe zum Lumen hin detektiert werden. Zudem werden beide Rezeptoren in den renalen Vesikel, sowie den Komma- und S-förmigen Körperchen exprimiert. Beim immunhistochemischen Nachweis von

Thy-1 und α -SMA bei Rattennieren stellten sich u. a. folgende Zelltypen als positiv für die beiden Proteine dar: Zellen des metanephrogenen Mesenchyms, Zellen, die in die proximale Einstülpung des S-förmigen Körperchens einwandern, und Mesangialzellen im noch nicht vollständig entwickelten Glomerulum [Yuasa et al., 2010]. Da jedoch weder PDGFR- β noch Thy-1 oder α -SMA ausschließlich von Mesangialzellen synthetisiert werden, kann nicht zwangsläufig gefolgert werden, dass es sich bei jeder Zelle, die sowohl CCR7 als auch einen der drei Marker exprimiert, um eine Mesangialzelle oder eine mesangiale Vorläuferzelle handelt.

Im Tierexperiment konnten Hyink et al. [1996] demonstrieren, dass der Ursprung für Mesangial- und Endothelzellen in den Zellen aus dem metanephrogenen Mesenchym liegt. Diese stellen die Vorstufe zu den zwei wesentlichen Vorläuferzellen dar: den Hämangioblasten einerseits und den FoxD1-positiven Vorläuferzellen andererseits. Während Hämangioblasten zu Endothelzellen bzw. hämogenen Endothelzellen differenzieren, leiten sich von FoxD1-positiven Zellen Fibroblasten, vaskuläre glatte Muskelzellen, Renin-produzierende Zellen und Mesangialzellen ab [Sequeira Lopez und Gomez, 2011]. Der auch als BF-2 (*brain factor-2*) bekannte Transkriptionsfaktor *fork head box D1* (FxD1) wurde in der sich entwickelnden Niere ausschließlich in mesenchymalen Stromazellen, nicht aber im kappenförmigen Mesenchym oder der Ureterknospe, nachgewiesen [Hatini et al., 1996; Zhang et al., 2003]. In Versuchen mit dem entsprechenden Mausmodell gelang den Forschern um B. D. Humphreys der Nachweis, dass es sich bei FoxD1-positiven Zellen um die Vorläufer von Perizyten, perivaskulären Fibroblasten, vaskuläre glatte Muskelzellen und Mesangialzellen handelt [Humphreys et al., 2010]. In verschiedenen Studien und Analysen, teils *in vitro*, teils *in vivo*, konnte gezeigt werden, dass diese Zellen (oder ihre direkten Vorläufer) in der Lage sind, CCR7 zu exprimieren [Banas et al., 2002; Sakai et al., 2006; Halvorsen et al., 2014]. Basierend auf diesen Tatsachen kann geschlossen werden, dass es sich bei den CCR7-positiven mesenchymalen Stromazellen zum Teil um die Vorläufer der späteren glomerulären Mesangialzellen handelt.

Wie zuvor beschrieben, gehen sowohl Mesangial- als auch Endothelzellen aus metanephrogenen Mesenchymzellen hervor. Allerdings erscheint es unwahrscheinlich, dass die CCR7-positiven Zellen im Mesenchym auch zu Endothelzellen differenzieren. Zunächst wurde eine CCR7-Expression bei Endothelzellen bislang noch nie beschrieben. Ferner legen auch Vergleiche zur Expression von Endothzellmarkern, die bereits früh in der murinen Nephrogenese detektierbar sind, den Schluss nahe, dass es sich bei den CCR7-positiven metanephrogenen Mesenchymzellen kaum um zukünftige Endothelzellen handeln kann. Untersuchungen zur renalen Expression des VEGF-Rezeptors Flk1 (vgl. 1.1.2.2), dem frühesten Marker für Endothellvorläufer, zeigen, dass Flk1 im Gegensatz zu CCR7 nicht im Mesenchym selbst lokalisiert sondern im angrenzenden Gewebe. Auch in der Ureterknospe ist Flk1 nicht nachweisbar. Stattdessen wurde der VEGF-Rezeptor in entstehenden Gefäßen in unmittelbarer Nähe zur Ureterknospe bzw. zum metanephrogenen Mesenchym oder den sich entwickelnden Glomerula nachgewiesen [Robert et al., 1998].

Neben Mesangial- und Endothelzellen existieren im Glomerulum die als spezialisierte Epithelzellen charakterisierten Podozyten. Diese gehen in der Nephrogenese nach der mesenchymal-epithelialen Transition aus den renalen Vesikelzellen hervor (vgl. 1.1.2.1). Ein Vergleich der Expressionsorte von CCR7 und WT-1 (vgl. 4.1.3), einem Podozytenmarker, [Georgas et al. 2008] ergab zu keinem Zeitpunkt der Nierenentwicklung eine Übereinstimmung hinsichtlich der renalen Lokalisation.

In der Zeit kurz vor und nach der Geburt nehmen die Nephronen zunehmend ihre spätere Gestalt an. Im proximalen Abschnitt des Nephrons sind die vorherrschenden renalen Strukturen die S-förmigen Körperchen und Glomera vom frühesten Kapillarschlingenstadium bis zum (teilweise) ausgeformten Schlingenkonvolut. CCR7 lokalisiert deutlich auf den Zellen, die sich in der Spalte des S-förmigen Körperchens befinden. Basierend auf den zuvor beschriebenen Expressionsmustern der verschiedenen Zelltypen in der renalen Entwicklung ist anzunehmen, dass es sich bei diesen Zellen um mesangiale Vorläuferzellen handelt, die in das entstehende Glomerulum immigrieren. Im darauffolgenden Kapillarschlingenstadium konnte CCR7 im noch unstrukturierten Mesangium detektiert werden, ab pp10, verliert die Expression des Chemokinrezeptors deutlich an Intensität und Spezifität.

Die zeitgleiche renale Expression mit seinem Rezeptor lässt auf einen förderlichen Effekt von CCL21 (vgl. 4.1.3) auf den Flux mesangialer Vorläuferzellen schließen. In der Tat löst das Chemokin nicht nur bei Leukozyten eine Migrationsreaktion aus (vgl. 1.2.1.2), sondern steigert auch bei kultivierten Mesangialzellen, als renale Nicht-Immunzellen, deren Migrationsfähigkeit [Banas *et al.*, 2002]. Nachdem sie aber die Einstülpung des S-förmigen Körperchens erreicht [Lindahl *et al.*, 1997; Seifert *et al.*, 1998; Hellström *et al.*, 1999] und den mesangialen Kern im Zentrum der ersten Kapillarschlinge organisiert haben [Lindahl *et al.*, 1998; Kikkawa *et al.*, 2003; Vaughan und Quaggin, 2008], wird die CCR7-Expression deutlich reduziert. Dies ist möglicherweise Konsequenz des Differenzierungsprozesses von mesangialen Vorläuferzellen zu Mesangialzellen.

Ein Vergleich mit der Migration und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (*mesenchymal stem cells*; MSCs) deutet auf einen analogen Ablauf hin. MSCs verfügen über ein den Lymphozyten ähnliches Migrationsverhalten [Rüster *et al.*, 2006; Ponte *et al.*, 2007] und exprimieren zahlreiche Chemoattractante [Molloy *et al.*, 2009] und Chemokinrezeptoren [Sordi *et al.*, 2007; Ringe *et al.*, 2007]. Mit Hilfe primärer MSCs konnten Honczarenko *et al.* [2007] den Nachweis erbringen, dass bereits nach dem zweiten Passagieren der Zellen diese zunehmend differenzieren, was mit einem deutlich Rückgang der Chemokinrezeptor-Expression einherging. Dies legt nahe, dass auch die mesenchymalen Vorläufer der Mesangialzellen nach der CCR7-Aktivierung in die Spalte des S-förmigen Körperchens migrieren und dort im Zuge von Proliferation und voranschreitender Differenzierung ihre Reagibilität gegenüber CCL21 verlieren.

Der Chemokinrezeptor lokalisiert in der renalen Entwicklung jedoch nicht nur auf Zellen und Strukturen, die später das Glomerulum formen. Mit der luminal CCR7-positiven Ureterknospe konnten auch Bereiche im Nierengewebe identifiziert werden, die das zukünftige Sammelrohrsystem bilden. Dass auch hier das Chemokinkandidat-/Rezeptorpaar CCL21/CCR7 eine Rolle spielen könnte, ist durch die simultane CCL21-Expression in der Ureterknospe (vgl. 4.1.3) wahrscheinlich. Allerdings beschränkten sich die Analysen auf das Glomerulum.

Basierend auf den immunhistochemischen Färbungen gegen CCR7 in der Nephrogenese einerseits und ihrer Co-Lokalisation mit verschiedenen Markern für Mesangiazellen bzw. deren Vorläuferzellen andererseits kann mit der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass bereits Mesangialzellvorläufer im mesenchymalen Stroma CCR7 exprimieren. Als CCR7-positiv erwiesen sich zudem mesangiale Vorläuferzellen, die in die Einstülpung des S-förmigen Körperchens wandern, um dort den Mesangialzellkern zu formen, der von der ersten Kapillarschlinge umgeben ist. Ferner exprimieren diese ersten differenzierten Mesangialzellen ebenfalls den Chemokinrezeptor, auch wenn die Expression mit zu-

nehmendem Entwicklungsgrad des glomerulären Schlingenkonvoluts abnimmt. Im Gegensatz dazu konnte keine Korrelation der CCR7-Expression mit Endothelzellen, Podozyten (vgl. 4.1.3) oder deren Vorläufern festgestellt werden.

Auf der Grundlage der Arbeiten anderer Forschergruppen einerseits und dieser Arbeit andererseits konnte erstmals gezeigt werden, dass mittels CCR7-Aktivierung auf mesangialen Vorläuferzellen der Rekrutierungsprozess dieser in die Einstülpung des S-förmigen Körperchens gefördert wird.

4.1.3 CCL21 Proteinexpression

Die immunhistochemische Analyse der CCL21-Expression ergab eine deutliche Korrelation mit der mRNA-Expression (vgl. Abb. 15; Abb. 17). Während die Färbeintensität der Nierenpräparate aus den Mausembryonen und adulten Tieren am stärksten war, erreichte sie um die Zeit kurz nach der Geburt ihr Minimum. Wie sein Rezeptor war CCL21 an E14.5 in weiten Teilen der sich entwickelnden Niere nachweisbar, dennoch verfügte der Chemokinligand über ein weniger distinktes Expressionsmuster. Zwar lokalisierte CCL21 ebenfalls in den Zellen des metanephrogenen Mesenchyms und der Ureterknospe, allerdings konnten innerhalb der beiden Strukturen keine präferierten Bereiche der CCL21-Expression festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten podozytäre Vorläuferzellen in der Spalte des S-förmigen Körperchens 2 Tage nach der Geburt bereits eine schwache aber spezifische CCL21-Expression. Diese wurde mit zunehmendem Grad der glomerulären Differenziertheit immer deutlicher bis in adulten Mäusen eine konstitutive CCL21-Expression auf Podozyten detektiert werden konnte.

Ein Vergleich zu den Analysen zur Proteinexpression des Podozytenmarkers WT-1 von Georgas *et al.* [2008] verdeutlicht, dass nicht nur differenzierte Podozyten CCL21 exprimieren, sondern auch deren Vorläufer im Komma- und S-förmigen Körperchen. Auch in der frühesten Nephrogenese verfügen das Chemokin und WT-1 über teilweise identische Expressionsorte: das kappenförmige Mesenchym und die mesenchymalen Stomazellen im Bereich des Kortex. Das Mesenchym hingegen, das sich nicht am äußersten Rand des Kortex befindet oder direkt an die Spitze der Ureterknospe grenzt, sowie die Ureterknospe selbst sind gänzlich negativ für WT-1. Analog zur CCR7-Expression, die ebenfalls nicht ausschließlich auf Mesangialzellen und deren Vorläufern nachgewiesen wurde, konnte auch hier dargelegt werden, dass mehr Zellen bzw. deren Vorläufer CCL21 synthetisieren als Podozyten bzw. deren Vorläufer.

Als die wesentlichen CCL21-Expressionsorte außerhalb der Niere gelten Stromazellen in der T-Zellzone [Nagira *et al.*, 1998; Willimann *et al.*, 1998; Luther *et al.*, 2000] und Endothelzellen in HEVs [Gunn *et al.*, 1998 (b)] und lymphatischen Gefäßen [Tal *et al.*, 2011]. Auf der Grundlage der hier dargelegten Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung gegen CCL21 konnten erstmals zwei epitheliale Expressionsorte des Chemokinliganden nachgewiesen werden, die nicht im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase stehen. Stattdessen legt die renale CCL21-Expression nahe, dass diese zur koordinierten Entwicklung der Niere als nicht-lymphatisches Organ beiträgt. Zudem ist anzunehmen, dass durch die konstitutive CCL21-Expression der Podozyten lokal im Glomerum ein Raum geschaffen wird, der sich insbesondere auf die Physiologie und Funktionalität des Mesangiums positiv auswirkt. Neben der Chemokinexpression podozytärer Vorläuferzellen und Podozyten wurde CCL21 auch in der Ureterknospe und in weiten Teilen des metanephrogenen

Mesenchyms festgestellt. Die Zellen der Ureterknospe konnten als Epithelzellen charakterisiert werden und entwickeln sich im Lauf der Nephrogenese zum Sammelrohrsystem [Grobstein, 1955; Saxén und Sariola, 1987; Neiss, 1982]. Möglicherweise spielt auch hier die Interaktion von CCL21 mit seinem Rezeptor eine wichtige Rolle, indem das Chemokin die Proliferations- und Migrationsfähigkeit der Ureterknospenzellen während der Nephrogenese positiv beeinflusst. Dies ist wahrscheinlich, da die Zellen an der Spitze der Ureterknospe zahlreiche dichtome Teilungen durchlaufen, während die Zellen im Bereich des Ampullenhalses ein massives Längenwachstum vollziehen (vgl. 1.1.2.1)

Im ausgereiften Glomerulum wird CCL21 konstitutiv von Epithelzellen exprimiert. Damit stellen Podozyten unter nicht-pathologischen Bedingungen die ersten nicht-lymphatischen Epithelzellen dar, die über eine konstitutive CCL21-Expression verfügen. Die einzigen bis *dato* beschriebenen Epithelzellen, die die beiden CCR7-Liganden exprimieren, befinden sich der Medulla des Thymus [Bleul und Böhm, 2000]. Dabei stellt der Thymus aufgrund seines ontogenetischen Ursprungs eine Besonderheit dar, weil sich dieser im Gegensatz zu allen anderen lymphatischen Organen, die ausnahmslos aus dem Mesoderm hervorgehen, aus dem Ento-, Meso- und Ektoderm entwickelt.

Die mit dieser Arbeit erstmals nachgewiesene räumliche und zeitliche Co-Expression von CCL21 und CCR7 während der Nephrogenese verdeutlicht die entwicklungsphysiologische Bedeutung der beiden Moleküle für die Niere. Damit konnte mit der hier vorliegenden Promotion *in vivo* eine neue Rolle des Chemokinligand-/Rezeptorpaars außerhalb des Kontexts der Immunhomöostase beschrieben werden.

Banas *et al.* [2002] konnten in den Glomerula gesunder erwachsener Menschen sowohl eine konstitutive podozytäre CCL21-Expression als auch eine konstitutive mesangiale CCR7-Expression feststellen. In adulten Mäusen wird CCL21 ebenfalls konstitutiv von Podozyten synthetisiert. Im Gegensatz dazu präsentiert sich in adulten Tieren die Expression des Chemokinrezeptors als diffus und nur schwach erkennbar. Möglicherweise genügt hier jedoch eine basale mesangiale Expression des Rezeptors, um bei differenzierten Mesangialzellen einen hinreichenden CCL21-vermittelten Effekt bezüglich Proliferation, Flexibilität der zytoskelettalen Organisation und reduzierten Zelltod zu erzielen.

Basierend auf den bekannten *in vitro*-Daten zum CCL21-induzierten Umbau des mesangialen Zytoskeletts, der gesteigerten Proliferation und reduzierten Suszeptibilität gegenüber induzierter Apoptose [Banas *et al.*, 1999; 2002; 2004; Wörnle *et al.* 2004] untermauert die in dieser Arbeit untersuchte renale CCL21- und CCR7-Expression, dass das Chemokinligand-/Rezeptorpaar auch in adulten Mäusen eine Rolle für die mesangiale Physiologie spielt. Es kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der konstitutiven CCL21-Expression durch die benachbarten Podozyten lokal im Glomerulum ein Milieu entsteht, in dem die Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionalität der Mesangialzellen begünstigt wird. Um das Zusammenwirken von CCL21 und CCR7 in adulten Tieren genauer zu untersuchen, wurden CCR7^{-/-} Mäuse analysiert. Die Konsequenzen der CCR7-Defizienz werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.2 Folgen der CCR7-Defizienz

Das Tiermodell der CCR7-defizienten Maus existiert seit etwa 15 Jahren [Förster *et al.*, 1999]. Gegenstand der Fragestellungen, die mit Hilfe der CCR7^{-/-}-Mäuse bearbeitet wurden, war jedoch meist die verzögerte Immunantwort dieser Tiere. Diese beruhte auf beeinträchtigten Migrationseigenschaften verschiedener Immunzellen sowie einer veränderten Mikroarchitektur in den lymphatischen Organen. Ein renaler Phänotyp wurde bislang noch nicht beschrieben. In der hier vorliegenden Arbeit wurden WT- und CCR7^{-/-}-Mäuse jeweils im Alter von 5, 10, 15, 20 und 30 Wochen und in Gruppen von 6 bis 10 Tieren analysiert.

4.2.1 CCR7 und seine Bedeutung für die Entwicklung und den Erhalt des Mesangium

In Anbetracht der frühen renalen Expression des Chemokinligand-/Rezeptorpaars während der Embryogenese und der konstitutiven CCL21-Expression von Podozyten einerseits sowie der *in vitro*-Daten zur Wirkung des Chemokins auf Mesangialzellen andererseits [Banas *et al.* 1999; 2002; 2004; Wörnle *et al.* 2004] stellte sich die Frage, ob und wie das Fehlen von CCR7 die Physiologie der glomerulären Mesangialzellen beeinflusst.

Da kultivierte Mesangialzellen auf die Zugabe von CCL21 mit einer gesteigerten Proliferationsrate reagierten, wurde zunächst analysiert, ob die CCR7-Defizienz in Mäusen einen Einfluss auf die Zahl glomerulärer Mesangialzellen hat. Basierend auf der immunhistochemischen Färbung gegen den Mesangialzellmarker PDGFR-β [Alpers *et al.*, 1993; Seifert *et al.*, 1998] und mit Hilfe einer Einzelzellanalyse [Ecker und Steiner, 2004] konnte der Anteil glomerulärer Mesangialzellen an der glomerulären Gesamtzellzahl bestimmt werden (vgl. Abb. 31). Bei WT-Mäusen sank der Mesangialzellgehalt zwischen der 5. und 10. Lebenswoche von 27,8 % im Median auf 21 % und lag ab einem Alter von 15 Wochen konstant bei 14 %. Im Gegensatz dazu verfügten 5 Wochen-alte CCR7^{-/-}-Mäuse im Median lediglich über 16,6 % glomeruläre Mesangialzellen. Dieses Defizit konnte zwar innerhalb der nächsten 5 Wochen kompensiert werden; bis dahin stieg der Anteil glomerulärer Mesangialzellen auf 25 %. Allerdings fiel dieser in den folgenden 5 Wochen auch wieder rapide ab, so dass bei 15 Wochen-alten CCR7^{-/-}-Mäusen nur noch ein Mesangialzellanteil von 9,1 % festgestellt werden konnte. In den beiden ältesten Gruppen lag er bei 7,2 bzw. 7,3 %, womit er sich signifikant von den altersgleichen WT-Tieren unterscheidet.

In jüngeren Tieren konnte aufgrund der großen Interquartilsspannen kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Dennoch legt der Verlauf der Mesangialzellzahl nahe, dass sich die CCR7-Defizienz bereits in jungen Tieren auf das Mesangium auswirkt. Damit wäre die deutliche Differenz im Anteil glomerulärer Mesangialzellein in 20 und 30 Wochen-alten Tieren nicht nur ein Langzeiteffekt des fehlenden CCL21-Stimulus, sondern auch Folge einer von Anfang an beeinträchtigten Entwicklung.

Vergleiche des Entwicklungsgrades des glomerulären Schlingenkonvoluts zeigten tatsächlich Unterschiede zwischen 5 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen. Wie in Abschnitt 3.2.2.2 dargestellt, verfügten WT-Tiere in dieser Altersgruppe größtenteils über Glomerula, deren Schlingenkonvolut ganz

oder zumindest teilweise ausgebildet war. Weniger als 5 % der analysierten Glomerula befanden sich noch im Kapillarschlingenstadium. Im Gegensatz dazu wiesen nur 34,2 % der CCR7^{-/-}-Glomerula ein vollständig ausgebildetes Kapillarschlingenkonvolut auf. Beim überwiegenden Rest der Glomerula befand sich der Prozess der Aufspaltung der ersten Kapillarschlinge noch am Anfang oder hatte in 16,6 % der Fälle noch gar nicht begonnen (vgl. Abb. 32; Abb. 33). Während sich die Unterschiede zwischen den Genotypen in der jüngsten Altersgruppe als signifikant erwiesen, hatten 10 Wochen-alte CCR7^{-/-}-Mäuse hinsichtlich der Ausformung des glomerulären Schlingenkonvoluts und der damit verbundenen Bildung eines strukturierten verzweigten Mesangiums den gleichen Entwicklungsstand erreicht wie ihr altersgleiches WT-Pendant.

Wie bereits in Abschnitt 4.1.2 und 4.1.3 diskutiert, wirkt CCL21 förderlich auf die Migration mesangialer Vorläuferzellen in die Einstülpung des S-förmigen Körperchens. Allerdings ist das Chemokin alleine nicht hinreichend, da auch in CCR7^{-/-}-Mäusen die Bildung des Kapillarschlingenkonvoluts erfolgt. Das maßgebliche Kriterium für die Mesangialzell-Wanderung hingegen stellt eine funktionierende Signaltransduktion via PDGFR-β dar. Ein Fehlen dieser führt zur Abwesenheit des Mesangiums mit einer ballonartig aufgeblähten und unverzweigten Kapillare, die das Glomerulum ausfüllt [Levéen *et al.*, 1994; Soriano, 1994; Lindahl *et al.*, 1998]. Dass die Wechselwirkung von Chemokinligand und Rezeptor diesen Prozess jedoch unterstützt, legen Analysen von Kamiyama *et al.* [2003] nahe. In Experimenten an vaskulären glatten Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass der von PDGF-B-aktivierte Signalweg über das Signalmolekül RhoA (*Ras homologue A*), eine GTPase, läuft. Bei der Familie der Rho-GTPasen handelt es sich um molekulare Schalter, die eine Signaltransduktion von einem aktvierten Rezeptor zu den jeweiligen Effektormolekülen weiterleiten [Tybulewicz und Henderson, 2009]. Neben dem PDGF-B-aktivierten Signalweg fungiert RhoA auch in der CCL21-induzierten Signalkaskade als Botenmolekül. Die Inhibierung von RhoA bzw. der Rho Kinase führt zu einer deutlichen Reduktion der PDGF-B-vermittelten Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen. Möglicherweise impliziert die fehlende CCR7-Aktivierung eine niedrige RhoA-Aktivität in CCR7^{-/-}-Mäusen und damit eine geringere Effizienz der Signaltransduktion via PDGFR-β [Kamiyama *et al.*, 2003].

Eine weitere Voraussetzung zur Bildung des Kapillarschlingenkonvoluts stellt die Differenzierung FoxD1-positiver Vorläuferzellen zu Mesangialzellen dar. Bei FoxD1^{RBPJ^{-/-}}-Mäusen kann spezifisch in FoxD1-positiven Zellen der Transkriptionsfaktor RBP-J (*recombination signal binding protein-J*) deletiert werden, was die Weiterentwicklung dieser Zellen zu Renin-produzierende Zellen, Mesangialzellen, etc. [Sequeira Lopez und Gomez, 2011] verhindert. Obwohl diese Tiere über keine zusätzliche Deletionen verfügen, entwickeln sie denselben Phänotyp wie PDGF-B oder PDGFR-β-defiziente Tiere [Lin *et al.*, 2014].

FoxD1-positive Mesenchymzellen müssen vor dem Beginn der Migration also zunächst soweit reifen, dass sie auf PDGF-B reagieren. Auch dieser Vorgang könnte durch die Rezeptoraktivierung über CCL21 positiv beeinflusst werden und erklären, warum die Entwicklung des glomerulären Schlingenkonvoluts bei jungen CCR7^{-/-}-Mäusen verzögert erfolgt. So konnte mit Hilfe von *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass durch Zugabe von CCL21 mehr aktivierte CD4-positive T-Zellen zu Typ-1-T-Helferzellen differenzieren als es durch den verwendeten Zellkulturüberstand allein der Fall war [Flanagan *et al.*, 2004]. Mit Zellkulturexperimenten an den Vorläuferzellen von Oligodendrozyten konnten Göttle *et al.* [2010] belegen, dass auch bei Nicht-Immunketten der Reifungsprozess mit Hilfe

von Chemokinen beschleunigt wird. Im Gegensatz zu unbehandelten Zellen verfügten nach Stimulation mit CXCL12 wesentlich mehr Zellen sowohl über die Morphologie eines differenzierten Oligodendrozyten als auch über das entsprechende Expressionsmuster.

Damit konnte mit der hier vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Rezeptorbindung von CCL21 *in vivo* die Migration und die Differenzierung mesangialer Vorläuferzellen positiv beeinflusst, indem die CCR7-Signaltransduktionskaskade an beiden Prozessen beteiligt ist.

Obwohl der Mesangialzell-Influx auch in Abwesenheit von CCR7 geschieht, erhöht die Stimulation durch CCL21 im WT die Migrationseffizienz. Diese basiert insbesondere auf der Tatsache, dass durch Bindung von CCL21 an seinen Rezeptor die Fähigkeit zur Umstrukturierung des Zytoskeletts gefördert wird [Banas *et al.* 2004]. Diese ist allerdings nicht nur während des Migrationsprozesses von Vorteil. Auch die Adhäsion der Mesangialzellen an die G-Domäne der Laminin- $\alpha 5$ -Kette in der GBM [Kikkawa *et al.*, 2003] und die daraus folgende Aufspaltung der ersten Kapillarschlinge wird dadurch wahrscheinlich begünstigt. Dass die verzögerte Ausformung des glomerulären Schlingenkonvoluts tatsächlich Konsequenz der unterbrochenen Signaltransduktion des Chemokinligand-/Rezeptorpaars ist, verdeutlichen *in vivo*- und *in vitro*-Analysen von Rho GDI-defizienten (Rho GDI $^{/-}$) Mäusen bzw. Mesangialzellen. Wie bereits beschrieben, zählen Rho-GTPasen zu den zahlreichen molekularen Schaltern, die an den Chemokin-abhängigen Signalkaskaden beteiligt sind [New und Wong, 2003]. Für die Funktionsfähigkeit von Rho ist ein Nukleotidaustausch von GDP (Guanosindiphosphat) zu GTP (Guanosintriphosphat) die Voraussetzung. Rho GDIs (*Guanine nucleotide dissociation inhibitors*) fungieren als Inhibitoren GDP-GTP-Konvertierung und blockieren so die Rho-vermittelte Signaltransduktion [Tybulewicz und Henderson, 2009].

Bielek *et al.* [2009] isolierten Mesangialzellen aus WT- und Rho GDI $^{/-}$ -Mäusen. Hinsichtlich ihrer Adhäsionseigenschaften zeigen Rho GDI $^{/-}$ -Zellen eine deutlich reduzierte Fähigkeit Fußfortsätze auszubilden, sich flächig auszubreiten und Kontakt zu benachbarten Zellen aufzunehmen. Ferner wurde eine verminderte Überlebensfähigkeit festgestellt. Dieses Ergebnis war zunächst insofern überraschend, da aufgrund des fehlenden Inhibitors mit einer gesteigerten Aktivität der von GDI-regulierten Rho-GTPasen gerechnet wurde. Zwar konnte diese auch festgestellt werden, allerdings war auch die Menge der zellulär exprimierten GTPase deutlich reduziert. Die Konsequenzen einer gestörten Signalkaskade in Hinblick auf die renale Morphologie wurden zuvor bereits von Togawa *et al.* [1999] im Tiermodell der Rho GDI $^{/-}$ -Maus untersucht. Neben weiteren Defekten wiesen die GDI $^{/-}$ -Glomerula eine reduzierte Mesangialzellzahl, sklerotische Veränderungen und eine strukturelle Fehlorganisation des glomerulären Schlingenkonvoluts auf.

Auf der Grundlage der CCL21-vermittelten gesteigerten Fähigkeit zur Reorganisation des Zytoskelets [Banas *et al.* 2004] und den Arbeiten zu den Rho GDI $^{/-}$ -Mäusen [Togawa *et al.*, 1999; Bielek *et al.*, 2009] auf der einen Seite und den eigenen Ergebnissen zur verzögerten Ausbildung des Kapillarschlingenkonvoluts auf der anderen Seite konnte mit der hier vorliegenden Promotion die neuartige beschriebene Rolle von CCL21 und CCR7 in der renalen Entwicklung und Physiologie nochmals bestätigt werden. Die Wirkung von Chemokinligand und -Rezeptor ist dabei nicht nur auf die Differenzierung und Rekrutierung mesangialer Vorläuferzellen beschränkt, sondern betrifft, wie hier erstmalig gezeigt, auch die Organisation und Strukturierung des Kapillarschlingenkonvoluts und damit die Ausformung des Mesangiums.

Wie zuvor diskutiert, ist es trotz des nicht eindeutigen histologischen Befundes wahrscheinlich, dass auch Mesangialzellen in adulten Tieren den Chemokinrezeptor in geringen Mengen auf ihrer Oberfläche tragen und hinsichtlich ihres Langzeitüberlebens von der konstitutiven podozytären CCL21-Expression profitieren. Diesen Schluss lässt nicht nur die eigene Einzelzellanalyse zu, mit der gezeigt wurde, dass die Mesangialzellzahl in WT-Tiere ab der 15. Lebenswoche konstant bleibt. Dies belegen auch Mausstudien zur Nierenalterung unter physiologischen Bedingungen. Beim Vergleich 6 Monate-alter WT-Tiere mit 24 Monaten-alten WT-Tieren konnten bezüglich des glomerulären Mesangialzellgehalts keine Veränderungen über die Zeit festgestellt werden [Ning *et al.*, 2014]. Es ist allerdings anzunehmen, dass neben CCL21 noch weitere Moleküle positiv auf das Überleben der Mesangialzellen wirken und so den fehlenden CCL21-Stimulus in CCR7^{-/-}-Mäusen kompensieren. Damit könnte erklärt werden, warum CCR7-defiziente Mäuse den Entwicklungsrückstand im Alter von 5 Wochen wieder aufholen können und nach dem rapiden Mesangialzellverlust zwischen der 10. und 15. Lebenswoche bis zum Alter von 30 Wochen über eine niedrigere jedoch konstante Menge an Mesangialzellen verfügen.

Durch die Bestimmung der Mesangialzellzahl konnte mit der hier vorliegenden Arbeit erstmals die langfristige Wirkung der CCR7-Defizienz auf die Mesangialzellzahl nachgewiesen werden. Damit stellt CCL21 nicht nur *in vitro* [Banas *et al.* 1999; 2002; 2004] und Wörnle *et al.* [2004], sondern auch *in vivo* einen Faktor dar, der das Mesangialzell-Überleben födert.

Neben diesen Aspekten, die alle die Physiologie der sich entwickelnden bzw. differenzierten Mesangialzelle betreffen, könnte CCL21 auch unter pathologischen Bedingungen positiv auf das glomeruläre Mesangium wirken. Am Beispiel der Mesangiolysse konnte mehrfach demonstriert werden, dass nach dem Verlust des Mesangiums - sowohl der Zellen als auch der sie umgebenden Matrix - dieses rekonstituiert werden kann. So führt die Injektion von Antikörpern gegen Thy-1 zunächst zur Auflösung des Mesangiums. Kurze Zeit später setzt jedoch schon die Repopulation ein [Schlöndorff und Banas, 2009]. Ito *et al.* [2001] konnte zeigen, dass zumindest ein Teil dieser Zellen aus dem Knochenmark stammt. In einer anderen Arbeit wurden extraglomeruläre Mesangialzellen im juxtaglomerulären Apparat als Quelle für die Reorganisation des Mesangiums postuliert [Hugo *et al.* 1997]. Damit könnte CCL21 auch bei der Reorganisation der glomerulären Struktur einen positiven Effekt auf die Heilung haben, da die Migrations- und Proliferations-fördernde Wirkung des Chemokins auf Mesangialzellen die Repopulation unterstützen würde.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der Einzelzellanalyse und der vergleichenden Untersuchung zum Entwicklungsgrad des Kapillarschlingenkonvoluts in dieser Arbeit zum ersten Mal dargelegt werden, dass die Aktivierung von CCR7 via CCL21 bereits sehr früh auf die Physiologie der glomerulären Mesangialzellen wirkt. Durch die Interaktion mit CCL21 wird sowohl die mesangiale Migration in das entstehende Glomerulum positiv beeinflusst als auch die Fähigkeit das Kapillarschlingenkonvolut zu formen. Zudem fungiert das Chemokin in adulten Tieren als Proliferationsfaktor bzw. Apoptoseinhibitor. Die Ergebnisse dieser Promotion untermauern die der Zellkulturexperimente von Banas *et al.* [1999; 2002; 2004] und Wörnle *et al.* [2004] und bestätigen die Hypothese, dass CCL21 für Mesangialzellen einen Faktor darstellt, der sowohl Migration, Adhäsion und Proliferation begünstigt und vor Apoptose schützt.

4.2.2 Glomeruläre Ablagerung in Folge der CCR7-Defizienz

4.2.2.1 Morphologische Veränderungen in der Architektur des Mesangiums

Das glomeruläre Mesangium setzt sich aus zwei Bestandteilen zusammen: den Mesangialzellen und der mesangialen Matrix, in der die Mesangialzellen eingebettet sind. Die CCR7-Defizienz wirkt sich dabei nicht nur auf die Zellen selbst, sondern auch auf die sie umgebende Matrix aus.

Mit Hilfe der PAS- und Sirius Rot-Färbung wurde ein erster Eindruck gewonnen, wie sich die glomeruläre Morphologie bei $CCR7^{-/-}$ -Mäusen vom WT unterscheidet. Bei beiden Histologien zeigte sich sowohl in der visuellen Auswertung als auch in der Software-gestützten morphometrischen Analyse (vgl. Abb. 34; Abb. 35), dass bei $CCR7^{-/-}$ -Mäusen jeweils zwischen der 15. und 20. Lebenswoche ein massiver Anstieg des mesangialen PAS-positiven Materials bzw. Kollagens stattfindet. In den Tieren bis zum Alter von 15 Wochen konnten beim Vergleich altersgleicher Gruppen keine signifikanten Differenzen festgestellt werden. Um die Ablagerung bei 20 und 30 Wochen-alten Tieren näher zu charakterisieren, wurden für diese Gruppen Silberfärbungen und elektronenmikroskopischen Analysen durchgeführt.

Die deutliche Zunahme des glomerulären Kollagens zusammen mit dem zuvor diskutierten Mesangialzellverlust ab der 10. Lebenswoche lässt Parallelen zu Fibrosierungsprozessen in der Glomerulosklerose erkennen. Diese ist charakterisiert durch die Ablagerung von Kollagen in der mesangialen Matrix [Liu, 2006], die mit einem simultanen Rückgang der Mesangialzellzahl einhergeht. Dieser ist mit einer gesteigerten mesangialen Apoptose assoziiert [Sugiyama *et al.*, 1996; Hornigold *et al.*, 2010], wobei der programmierte Zelltod häufig einer zunächst extensiven mesangialen Proliferation folgt [Baker *et al.*, 1994]. Ähnliches konnte in $CCR7^{-/-}$ -Mäusen festgestellt werden. Nachdem im Alter von 5 bis 10 Wochen die Mesangialzellzahl zunächst deutlich anstieg und danach genauso rapide wieder sank, kam es nach der 15. Lebenswoche zu einer deutlichen Expansion des glomerulären Kollagens. Neben dieser konnte auch eine deutliche Akkumulation von PAS-positivem Material nachgewiesen werden. Dieser Begriff fasst eine Vielzahl von Molekülen und Strukturen zusammen, zu denen Polysaccharide, Kollagen, Glykogen, sowie Muko- und Glykoproteine zählen, genauso aber auch Glyko- und Phospholipide sowie Basalmembranen [McManus *et al.*, 1948]. Die mesangiale Matrixexpansion kann verschiedene Ursachen haben; zu diesen zählen u. a. die Aktivierung der Mesangialzellen in Folge eines proinflammatorischen Stimulus, eine gestörte Zell-Zell-Kommunikation oder Veränderungen in der Komposition der GBM bzw. mesangialen Matrix, die ihrerseits auf die Mesangialzellen wirken. Der Grad der Matrixexpansion, zusammen mit einer mesangialen Hyperzellularität bzw. eines Mesangialzellverlust, steht im direkten Zusammenhang mit der Funktionalität des Nephrons [Schlöndorff und Banas, 2009; Abboud, 2012]. Inwiefern die CCR7-Defizienz auf die renale Physiologie wirkt, wird in 4.2.3 diskutiert. Gegenstand der weiteren Analysen war zunächst die genauere Beschreibung des Mesangiums.

Dazu wurden die Nieren aus 20 und 30 Wochen-alten $CCR7^{-/-}$ - und WT-Mäusen elektronenmikroskopisch untersucht (vgl. Abb. 37). Dabei bestätigte die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen die histologischen Befunde: In den Mesangien der CCR7-defizienten Tiere war es zu einer massiven Akkumulation mesangialer Matrix gekommen. Auffällig war zudem, dass sich innerhalb der Matrix Strukturen mit amorpher Textur befanden, die vor allem in den perimesangialen

und subendothelialen Bereichen lokalisierten. Dabei verfügten diese Strukturen über eine Ähnlichkeit mit Immundepots des Typs IgA (Analyse Prof. Schröder, Uniklinikum Regensburg, Pathologie). Allerdings stellte das Mesangium die einzige betroffene renale Struktur dar, da weder bei Endothelzellen noch bei Podozyten morphologische Auffälligkeiten identifiziert werden konnten. Auch auf die GBM und die Tubuli wirkte sich das Fehlen des Chemokinrezeptors nicht aus. Dieses Ergebnis belegt die Mesangialzell-spezifische Bedeutung von CCR7 im Nephron.

Die GBM wird zwar nicht von Mesangialzellen produziert (vgl. 1.1.1), steht aber dennoch mit diesen und der mesangialen Matrix in engem Kontakt (vgl. 1.1.3). Während die GBM sowohl zwischen Podozyten und Endothelzellen als auch zwischen Podozyten und Mesangialzellen keine strukturellen Veränderungen aufwies, konnten im direkt angrenzenden Mesangium elektronenmikroskopisch dunkle Ablagerungen identifiziert werden. Dass die GBM von der CCR7-Defizienz nicht betroffen ist, verdeutlichen auch die Analysen der Silber-gefärbten [Jones, 1957] Glomerula in den beiden älteren Gruppen (vgl. Abb. 36). Hier ergab die morphometrische Quantifizierung der argyrophilen Strukturen innerhalb des glomerulären Schlingenkonvoluts keine Unterschiede zwischen den Gruppen, obwohl dies aufgrund der PAS-Färbung zu erwarten wäre, da sich auch Komponenten der ECM Silber-imprägnieren lassen.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse dieser Promotion die Spezifität der CCR7-Defizienz in der Niere, die, wie hier erstmals zeigt, ausschließlich das Mesangium betrifft. Dies erweitert nochmals das Wirkspektrum des Chemokinligand-/Rezeptorpaars. Zum ersten Mal konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass das Fehlen des Chemokinrezeptors Physiologie von renalen Nicht-Immunzellen beeinträchtigt.

4.2.2.2 Immunologische Aspekte der Matrixexpansion

Meist lässt sich mesaniale Matrix nicht nur mittels PAS- sondern auch mittels Silberfärbung nachweisen. Das jeweilige Ergebnis der Histologie hängt von der Art mesangialen Ablagerung ab. Bei der monoklonalen Immunglobulin-Ablagerungskrankheit beispielsweise, die die Leicht- und Schwerketten-Ablagerungskrankheiten einschließt und durch die Deposition von Immunkomplexen charakterisiert ist, bleiben die PAS-positiven Bereiche in der Matrix negativ für Silber [Alsaad und Herzenberg, 2007]. Basierend auf den Erkenntnissen der Elektronenmikroskopie und der Silber-Färbung wurden daher zur weiteren Spezifizierung der glomerulären Ablagerungen in 20 und 30 Wochen-alten Mäusen Fluoreszenz-immunhistochemische Färbungen gegen IgA und IgM durchgeführt. Die Analyse der beiden Färbungen ergab unabhängig von ihrem Alter einen signifikanten Unterschied zwischen CCR7^{-/-}- und WT-Mäusen. Während in den WT-Glomerula keine oder gelegentlich nur geringe Anhäufungen von IgA- (vgl. Abb. 38) bzw. IgM- (vgl. Abb. 39) Depots nachgewiesen werden konnten, lokalisierten in den Mesangiien der CCR7^{-/-}-Tieren erhebliche Mengen der beiden Immunglobuline.

Dabei verhält sich das Ergebnis der Fluoreszenz-Immuhistochemie kongruent zu Arbeiten über die erhöhte Suszeptibilität CCR7-defizienter Mäuse gegenüber Autoimmunerkrankungen. Dazu untersuchten Davalos-Misslitz *et al.* [2007] CCR7^{-/-}-Mäuse ab einem Alter von 16 Wochen. In den Glomerula männlicher Tiere identifizierten sie im Gegensatz zum WT deutliche IgG-Ablagerungen. Auf weitere Immunglobulin-Typen hin wurde nicht untersucht. Auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden

Arbeit und der Tatsache, dass die CCR7-Defizienz im Mausmodell mit zunehmenden Alter die Anfälligkeit gegenüber einer generellen Autoimmunität, die zahlreiche Organe betrifft, erhöht [Davalos-Misslitz *et al.*, 2007], stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen dem CCR7-abhängigen Mesangialzellverlust und der massiven Matrixexpansion mit IgA-, IgM- und IgG-Depots gibt.

Hauptaufgabe der Mesangialzellen ist es die glomeruläre Homöostase und damit die glomeruläre Funktionalität aufrecht zu erhalten. Als semiprofessionelle Phagozyten endozytieren sie Makromoleküle, Immunkomplexe und apoptotische Nachbarzellen (vgl. 1.3.3.3). Dadurch dass die Ablagerungen in der EMC CCR7-defizienter Mäuse gerade zu dem Zeitpunkt erschienen, nachdem die Mesangialzellzahl stark gesunken war, liegt es nahe, dass auch hier die fehlende Stimulation durch CCL21 eine Rolle spielt. Eventuell sind die phagozytotischen Eigenschaften der Mesangialzellen in CCR7^{-/-}-Tieren eingeschränkt. Analog zum Zellkulturexperiment zur gesteigerten Migrationsfähigkeit von Mesangialzellen [Banas *et al.*, 2002] konnte anhand von DCs gezeigt werden, dass die Zugabe der CCR7-Liganden CCL19 bzw. CCL21 die Rezeptor-abhängige Phagozytose von Ovalbumin-assoziierten Immunkomplexen signifikant steigert [Kikuchi *et al.*, 2005]. Dies verdeutlicht die Bedeutung von CCL21 für die Funktionalität der Mesangialzellen, da es sich sowohl bei der Migration [Banas *et al.*, 2004] als auch der Phagozytose [Hall, 1998] um Prozesse handelt, die von der korrekten Reorganisation des Zytoskelets abhängen.

Auch hier kreuzt sich der Weg der CCR7-Signalkaskade mit den Signalwegen, die die Umstrukturierung des Zytoskelets bei der Endozytose kontrollieren. Durch Inhibierung von Rac1 und Cdc42, die der Familie der Rho-GTPasen angehören, wurde die Phagozytose-Rate bei Makrophagen signifikant reduziert [Leverrier und Ridley, 1992]. Dies verdeutlicht nicht nur die Bedeutung der CCL21-Stimulation für die Mesangialzell-Funktionalität, sondern stellt auch eine mögliche Erklärung dafür dar, dass sich trotz eines gesteigerten Makrophagen/Monzyten-Influx in das Mesangium in diesem Immunkomplexe ansammeln. Wie in Abb. 40 dargestellt, nimmt die Zahl der infiltrierenden Makrophagen/Monzyten in CCR7^{-/-}-Mäusen ab einem Alter von 15 Wochen stetig zu. Diese professionellen Phagozyten unterstützen die Mesangialzellen bei der Beseitigung von Immunkomplexen [Striker *et al.*, 1979].

Der fehlende CCL21-Stimulus könnte aber auch die Expression der Rezeptoren beeinflussen, die in die Bindung und Phagozytose von Immunglobulinen involviert sind. Als mögliche Kandidaten hierfür kommen folgende Moleküle in Frage, da sie über eine *in vitro* oder *in vivo* dokumentierte mesangiale Expression verfügen: die Transglutaminase-2 (TG-2) [Ikee *et al.*, 2007], der Transferrinrezeptor-1 (TFR-1, CD71) [Berthelot *et al.*, 2012] und der Asialoglycoproteinreceptor (ASGPR) [Gomez-Guerrero *et al.*, 1998; Sellitti *et al.*, 2001]. Inwiefern diese Rezeptoren bei der Entstehung mesangialer Immunglobulin-Depots tatsächlich eine Rolle spielen, muss noch geklärt werden. Allerdings konnte mit Hilfe von *in vitro*-Experimenten am Makrophagen-Asialoglycoprotein-bindenden Protein, einem ASGPR-Homolog, eine MAP-(*mitogen activated protein*) Kinase-abhängige Regulation des Rezeptors festgestellt werden [Katsuyama *et al.*, 2001]. Dabei handelt es sich bei der Kinase um ein Botenmolekül, das auch in der Signalkaskade von CCR7 beteiligt ist [New und Wong, 2003].

Neben einem Effekt auf die Expression Antikörper-bindender Rezeptoren kann im Zusammenhang mit den Immunglobulin-Depots auch eine veränderte Expression anderer Chemokine in CCR7^{-/-}-Tieren

eine Rolle spielen. Mit qPCR-Analysen zur differenziellen Expression weiterer Chemokine und ihrer Rezeptoren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit zunehmendem Alter sowohl CCL28 (vgl. Abb. 43) als auch sein Rezeptor CCR10 (vgl. Abb. 44) in CCR7^{-/-}-Mäusen eine gesteigerte mRNA-Expressionsrate aufwiesen. Eine veränderte CCR10- bzw. CCL28-Expression wurde auch im Kontext der IgA-Nephropathie beschrieben [Buren *et al.*, 2007]. Ferner konnten Sundström *et al.* [2008] in einer humanen Immunisierungsstudie nachweisen, dass IgA- und IgM sezernierende Plasmablasten nach einer mukosalen Immunisierung auf CCL28 reagieren. Im Mausmodell konnte zudem gezeigt werden, dass Plasmablasten im Vergleich zu Plasmazellen oder T-Lymphozyten über die höchste Reagibilität gegenüber CCL28 verfügten [Lazarus *et al.*, 2003]. Möglicherweise kommt es als kompensatorische Reaktion in CCR7^{-/-}-Mäusen zu einer erhöhten renalen CCL28 Expression. Dies könnte chemoattraktiv auf IgA- und IgM sezernierende Plasmablasten wirken und evtl. einen Influx dieser begünstigen. Dies könnte auch den Anstieg der CCR10-mRNA in CCR7^{-/-}-Mäusen ab der 15. Lebenswoche erklären.

Zusammenfassend konnte mit der hier vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass im Nephron spezifisch das Mesangium jene Struktur darstellt, deren Architektur und Morphologie von der CCR7-Defizienz betroffen ist. Möglicherweise greifen die Kompensationsmechanismen, die die Ausbildung des Kapillarschlingenkonvoluts und des Mesangiums trotz des fehlenden CCL21-Stimulus ermöglichen, ab einem Alter von ca. 15 Wochen nicht mehr. Dies hat nicht nur den rapiden Mesangialzellverlust zur Konsequenz, sondern auch eine beeinträchtigte physiologische Funktionalität der übrigen Mesangialzellen. Dies resultiert in einer gesteigerten Kollagenproduktion, einem veränderten mRNA-Expressionsmuster anderer Chemokine und Chemokinrezeptoren, einem Makrophagen/Monzyten-Influx in das Mesangium und vor allem einer Akkumulation extrazellulärer Matrix, bei der Immunglobulin-Depots einen wesentlichen Teil darstellen. Damit bestätigen die Ergebnisse dieser Dissertation nicht nur die neue physiologische Rolle von CCR7 und CCL21 außerhalb der Immunhomöostase, sondern untermauern auch, dass physiologische und immunologische Prozesse von einander abhängen. Wie in diesem Abschnitt zum ersten Mal gezeigt werden konnte, führt die CCR7-Defizienz zunächst zu einer beeinträchtigten physiologischen Funktionität der glomerulären Mesangialzellen. Diese resuliert im Lauf der Zeit in einem pathologisch veränderten Phänotyp.

4.2.3 Physiologische Unterschiede zwischen WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

Zusätzlich zu den morphologischen Veränderungen wurden weitere Parameter untersucht, um die physiologische Rolle von CCL21 und CCR7 aufzuklären. Um schnell einen ersten Eindruck davon zu gewinnen, ob sich eine Mutation auf ein Organ auswirkt, wurde nach der Explantation von Nieren, Milz, Herz und Leber das Gewicht dieser in Relation zum Gesamtkörpergewicht gesetzt.

Die renale Bedeutung von CCR7 zeigte sich bereits beim Vergleich der Ratios vom Gewicht der Nieren zu dem des gesamten Körpers. Analog zur Mesangialzellzahl und Matrixakkumulation unterscheidet sich CCR7^{-/-}- und WT-Mäuse erst ab einem Alter von 20 Wochen signifikant von einander (vgl. Abb. 19). In den beiden älteren Gruppen ist die Ratio in CCR7-defizienten Tieren deutlich höher. Dies ist ein weiterer Befund, der nahelegt, dass die CCR7-Defizienz für einige Zeit kompensiert werden kann. Auch die Milz-zu-Körper-Ratio ist in CCR7^{-/-}-Mäuse zum Teil signifikant erhöht (vgl. Abb. 20). Zu

einem vergleichbaren Ergebnis gelangten auch Förster *et al.* [1999], die die CCR7^{-/-}-Maus generierten und als erste charakterisierten. Neben einer veränderten Mikroarchitektur in den sekundären lymphatischen Organen stellten sie auch eine zwei- bis dreifache Vergrößerung der Milz fest. Während es hinsichtlich der Ratio von Leber- zu Körpermassen keine Unterschiede zwischen altersgleichen Gruppen gibt (vgl. Abb. 22), liegt, mit Ausnahme der jüngsten Mäuse, bei allen CCR7^{-/-}-Tieren gegenüber dem altersgleichen WT-Pendant eine erhöhte Herz-zu-Körpermassen-Ratio vor (vgl. Abb. 21).

Die Bedeutung des Chemokinligand-/Rezeptorpaars für das kardiovaskuläre System ist noch nicht eingehend erforscht. Aktuelle Ergebnisse stammen aus der Forschergruppe um Pål Aukrust. Diese induzierten in 8 Wochen-alten CCR7^{-/-}- und WT-Mäusen einen Myokardinfarkt, wobei CCR7-defiziente Tiere im 6 Wochen-Follow-up eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit aufwiesen als die WT-Kontrollgruppe [Yndestad *et al.*, 2012]. Ferner konnte in Humanstudien ein Bezug zwischen einem erhöhten CCL21-Serumlevel und dem Risiko zu chronischer Herzinsuffizienz hergestellt werden. Zudem korreliert eine steigende CCL21-Konzentration im Blut mit einer fallenden geschätzten glomerulären Filtrationsrate (*estimated glomerular filtration rate*, eGFR) [Ueland *et al.*, 2013]. Im Gegensatz dazu kann bei CCR7-defizienten Tieren von einer höheren eGFR ausgegangen werden, da diese mit einem niedrigeren Blutdruck assoziiert ist. In der hier vorliegenden Arbeit wurde in einem Vorversuch der Blutdruck von je vier 25 Wochen-alten CCR7^{-/-}- und WT-Mäusen ermittelt (vgl. Abb. 30). Mit einem mittleren Blutdruck von 127,5 mmHg unterschieden sich WT-Mäuse deutlich, wenn auch nicht signifikant, von CCR7-defizienten Tieren mit 117 mmHg. Ob der niedrigere Blutdruck bei CCR7^{-/-}-Mäusen von einem putativen Effekt der CCR7-Defizenz auf das Myokard herrührt oder auf einer eingeschränkten Kontraktionsfähigkeit der glomerulären Mesangialzellen beruht, muss noch geklärt werden. Die Beteiligung letzterer ist jedoch wahrscheinlich, da Mesangialzellen bezüglich ihrer Fähigkeit ihr Zytoskelett umzuorganisieren [Banas *et al.*, 2004] von der CCL21-Stimulation profitieren. Zudem stellt sich hinsichtlich des Mesangiazellverlusts und der extensiven Matrixakkumulation die Frage, ob die Mesangialzellen älterer CCR7^{-/-}-Mäuse überhaupt noch ein funktionelles Synzytium bilden können (vgl. 1.1.3.2). Dieses stellt eine entscheidende Prämisse für eine effektive Kontraktion dar und könnte den niedrigeren Blutdruck in CCR7^{-/-}-Mäusen erklären.

Neben den bereits diskutierten Parametern wurden auch Seren- und Urinanalysen hinsichtlich der Konzentration bzw. Menge an Gesamtprotein, Albumin und Kreatinin durchgeführt.

Bei den Seren (vgl. Abb. 23, Abb. 24, Abb. 25) konnten bei CCR7^{-/-}- und WT-Mäusen beim jeweiligen Vergleich altersgleicher Gruppen keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Parametern festgestellt werden (Ausnahme: Serum-Kreatinin bei 20 Wochen-alten Mäusen). Die gemessenen Werte lagen etwas unterhalb der Norm, was eventuell auf das Messverfahren zurückzuführen ist [Wirth-Dzieciolowska *et al.*, 2009]. Auch bei den Urinanalysen (vgl. Abb. 26, Abb. 27, Abb. 28) wurden für je altersgleiche CCR7^{-/-}- und WT-Mäusen keine signifikant differierenden Werte ermittelt (Ausnahme: Urin-Protein bei 30 Wochen-alten Mäusen und Urin-Kreatinin bei 20 Wochen-alten Mäusen). Mit einer im Durchschnitt über alle 10 Gruppen ausgeschiedenen Albuminmenge von 0,08 mg lag weder bei CCR7^{-/-}- noch bei WT-Mäusen eine Albuminurie vor [Hoffsten *et al.*, 1975]. Obwohl in Bezug auf den Menschen relativ viel Protein ausgeschieden wurde, lagen alle festgestellten Werte zum Urin-Protein im Normbereich, der in einigen Mausstämmen Proteinkonzentrationen von bis zu 70 mg/ml einschließt. Üblicherweise beträgt die ausgeschiedene Menge an Protein in männlichen Mäusen über

24 Stunden 20 bis 40 mg. Sie hat ihre Ursache in der extensiven Exkretion von sogenannten MUPs (*major urinary proteins*), die der chemischen Kommunikation dienen [Beynon und Hurst, 2003]. Diese konnten mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung als Gruppe von Peptiden und Proteinen nachgewiesen werden, die über ein Molekulargewicht von 2 bis 20 kDa verfügen (vgl. Abb. 29). Da in Coomassie-gefärbten Gelen keine weiteren Banden erkennbar waren, wurde zusätzlich Silber-gefärbt. Dabei zeigte sich mit Hilfe der Silberfärbung, dass die MUPs bei beiden Genotypen augenscheinlich den größten Teil der Urinproteine darstellen. Im Bereich von 20 bis 70 kDa sind gelegentlich Banden sichtbar, die meist deutlich schwächer sind als Proteinbanden, die MUPs repräsentieren. Bei 70 kDa liegt die Ausschlussgröße des glomerulären Filters. Banden von Proteinen mit höherem Molekulargewicht sind nur vereinzelt und sehr schwach erkennbar. Dies belegt ebenfalls, dass CCR7^{-/-}-Mäuse genauso wie ihr WT-Pendant keine Proteinurie entwickeln, was wiederum verdeutlicht, dass im Glomerulum spezifisch das Mesangium von der CCR7-Defizienz betroffen ist. Der glomeruläre Filter (vgl. 1.1.1) ist durch das Fehlen des Chemokinrezeptors nicht beeinträchtigt. Die physiologischen Aspekte der CCR7-Defizienz beinhalten im renalen Kontext eine erhöhte Nierenzu-Körpergewicht-Ratio und einen niedrigeren Blutdruck, welcher allerdings in angemessener Gruppengröße nochmals bestätigt werden muss. Der glomeruläre Filter, bestehend aus Podozyten, GBM und Endothelzellen, ist, wie bereits die Analyse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte, in seiner physiologischen Funktion nicht betroffen. Im Gegensatz dazu könnte die physiologische Funktionalität der Mesangialzellen in CCR7^{-/-}-Tieren bezüglich ihrer Kontraktionsfähigkeit beeinträchtigt sein. Dass der Chemokinrezeptor auch in anderen Organen unter nicht-pathologischen Bedingungen eine Rolle spielt, zeigen, zusätzlich zu den in dieser Arbeit festgestellten veränderten Organ-zu-Körpergewicht-Ratios von Milz und Herz, die Experimente und Studien anderer Forschergruppen.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

CCR7 und sein Ligand CCL21 werden beide von frühester Entwicklung an von renalen Nicht-Immunzellen exprimiert. Ihr Zusammenspiel in der Nephrogenese fördert die Migration mesangialer Vorläuferzellen (vgl. Abb. 49A) und die Ausformung des glomerulären Kapillarschlingenkonvoluts (vgl. Abb. 49B). Beide Vorgänge sind in $CCR7^{-/-}$ -Mäusen gegenüber ihrem WT-Pendant beeinträchtigt und erfolgen zeitlich verzögert. Da für adulte Tiere die mesangiale CCR7-Expression nicht eindeutig belegt werden konnte, stellt die Analyse einer CCR7-Reportermaus eine Möglichkeit dar, nachzuweisen, ob Mesangialzellen den Chemokinrezeptor auf ihrer Oberfläche tragen. Allerdings ist eine CCR7-Expression wahrscheinlich, da sich die Rezeptoraktivierung durch den konstitutiv podozytär exprimierten Liganden auch mit zunehmendem Alter der Tiere als positiv für das Überleben der Mesangialzellen erweist. Das Fehlen des Chemokinrezeptors hingegen führt einerseits zu einer signifikanten Reduktion des Mesangialzellenanteils an der glomerulären Gesamtzellzahl, andererseits hat die Abwesenheit des CCL21-Stimulus deutliche Auswirkungen auf die mesangiale Physiologie. Neben Veränderungen in den Expressionsmustern anderer Chemokine und ihrer Rezeptoren kommt es bei $CCR7^{-/-}$ -Mäusen zu putativen Einbußen hinsichtlich der mesangialen Kontraktionsfähigkeit. Auch die mesangiale Syntheserate von Kollagen und anderen Matrixkomponenten ist erhöht. Besonders markant ist die extensive Akkumulation von Immunglobulin-Depots (vgl. Abb. 49C). Während all diese Aspekte der CCR7-Defizienz spezifisch das Mesangium betreffen, bleiben andere renale Strukturen wie die Tubuli einerseits und glomeruläre Strukturen wie die GBM und die Zellen, die sie produzieren, andererseits vom fehlenden CCL21-Stimulus unberührt. Dass die Funktion des Glomerulums und des Nephrons (noch) nicht beeinträchtigt ist, verdeutlichen auch die Urinanalysen.

Damit stellen CCL21 und CCR7 das erste CC-Chemokinligand-/Rezeptorpaar dar, das unter physiologischen Bedingungen nicht nur renal exprimiert wird, sondern auch exklusiv die Physiologie und Funktionalität der Mesangialzelle beeinflusst. Zwar resultiert auch eine Defizienz des CX-C-Chemokins CXCL12 bzw. seines Rezeptors zu Veränderungen in der renalen Morphologie und Funktion. Allerdings sterben betroffene Tiere beim einzigen letalen Chemokin-KO perinatal aufgrund von massiven Entwicklungsstörungen multipler Organe [Takabatake *et al.*, 2009; Ueland *et al.*, 2009], so dass in diesem Fall keine ausschließlich renale Ursache für den frühen Tod der Tiere vorliegt.

Da das Fehlen des Chemokinrezeptors spezifisch auf die Physiologie und Morphologie des Mesangiums wirkt, stellt sich die Frage, ob im Gegensatz dazu eine gezielte auf das Glomerulum beschränkte „Überstimulierung“ zu einem mesangioproliferatorischen Phänotyp führt. Dazu soll eine transgene Maus generiert werden, bei der exklusiv im Podozyten eine CCL21-Überexpression induziert werden kann. Dies gelingt dadurch, dass das Zielgen CCL21 unter der Kontrolle des Podozyten-spezifischen Podocin-Promotors steht (vgl. 3.3). Da Podocin bereits in der frühen Embryogenese im S-förmigen Körperchen exprimiert wird [Jia *et al.*, 2008], könnte in diesem Tiermodell auch die renale bzw. glomeruläre Entwicklung manipuliert werden. Neben diesem Aspekt ist auch die Regulation der renalen CCL21 und CCR7-Expression von Interesse. Dies betrifft einerseits unter physiologischen Bedingungen die Kontrolle der Chemokinligand-/Rezeptorexpression auf bestimmten Zelltypen andererseits ein eventuell verändertes Expressionsmuster unter pathologischen Bedingungen. Ein mögliches Modell könnte die induzierte Mesangiolysis darstellen (vgl. Abb. 49C).

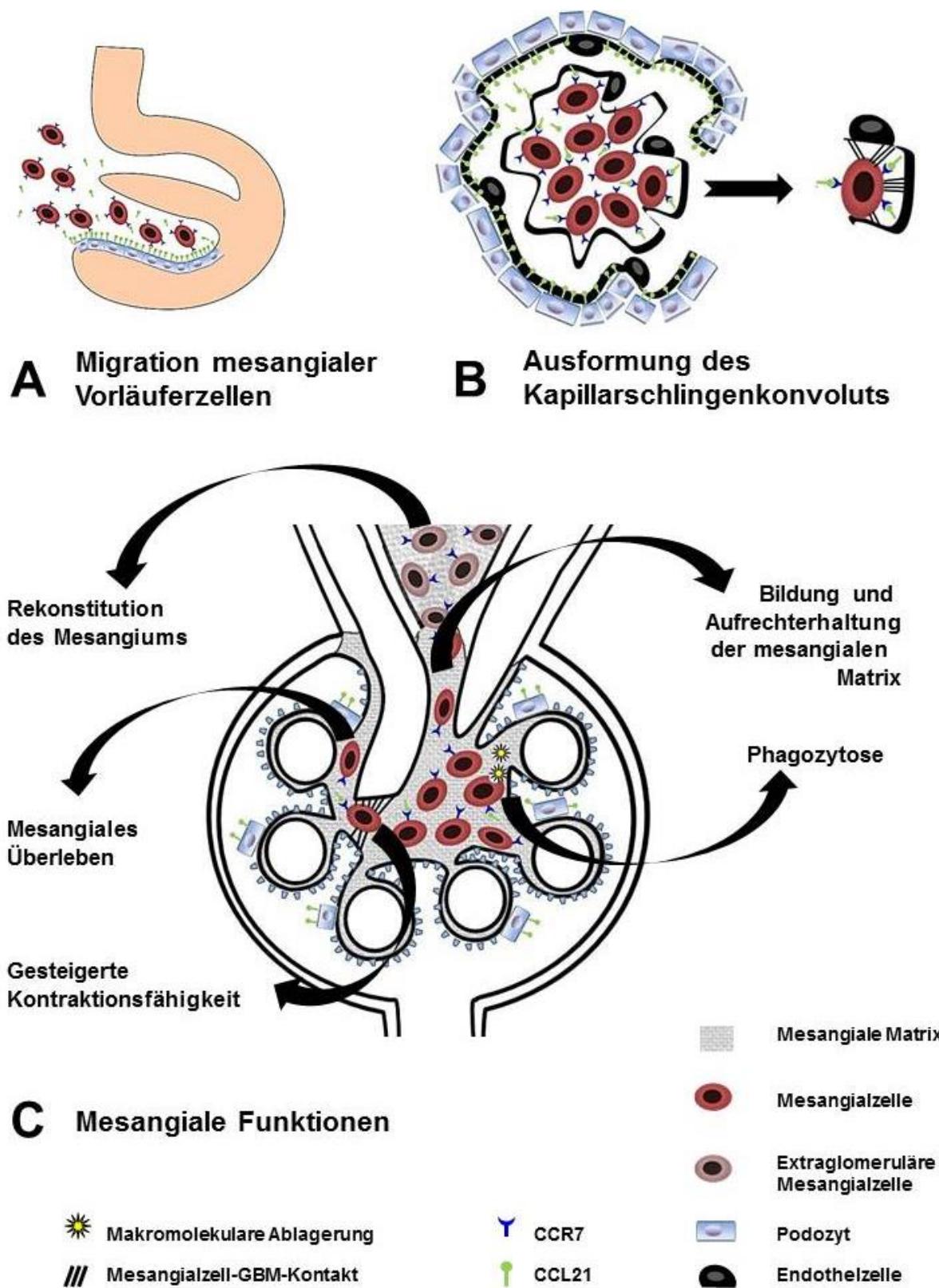


Abb. 49: Die mögliche Bedeutung von CCR7 und CCL21 für die Entwicklung des Mesangiums und die Aufrechterhaltung seiner Funktionsfähigkeit. In Abb. 49A wandern die CCR7 (dunkelblau) -exprimierenden Mesangialzellen (rot) in der Nephrogenese unterstützt vom CCL21 (hellgrün) -vermittelten Stimulus in die Spalte des S-förmigen Körperchens. Im Kapillarschlingenstadium (vgl. Abb. 49B) bewirkt die Aktivierung durch CCL21 ein effizientes Ausformen des glomerulären Kapillarschlingenkonvoluts. Im differenzierten Glomerulum, dargestellt in Abb. 49C, fungiert CCL21 als Faktor, der das mesangiale Überleben und damit die mesangialen Funktionen wie die Phagozytose bzw. den Auf- und Abbau verschiedener mesangialer Matrixkomponenten positiv beeinflusst. Weitere mögliche Bedeutungen des Chemokins auf die Mesangialzellen sind eine gesteigerte Kontraktionsfähigkeit sowie eine Rolle bei der Rekonstitution des Mesangiums nach einer induzierten Mesangiolysye.

Anhang

5 Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

- Abboud HE, Mesangial cell biology. *Exp Cell Res*, 318, 979–985. 2012
- Abrahamson DR, Origin of the glomerular basement membrane visualized after *in vivo* labeling of laminin in newborn rat kidneys. *J Cell Biol*, 100, 1988-2000. 1985
- Abrahamson DR, *et al.*, Origins and formation of microvasculature in the developing kidney. *Kidney Int Suppl*, 67, 7-11. 1998
- Alpern RS, *et al.*, Seldin and Giebisch's The Kidney - Physiology & Pathophysiology 1-2. Elsevier Inc., 5. Auflage, Band 1, Seite 595-691. 2013
- Alpers CE, *et al.*, PDGF-receptors localizes to mesangial, parietal epithelial, and interstitial cells in human and primate kidneys. *Kidney Int*, 43, 286-294. 1993
- Alsaad KO, Herzenberg AM, Distinguishing diabetic nephropathy from other causes of glomerulosclerosis: an update. *J Clin Pathol*, 60, 18–26. 2007
- Anderson AO, Anderson ND, Lymphocyte emigration from high endothelial venules in rat lymph nodes. *Immunology*, 31, 731-748. 1976
- Ansel KM, *et al.*, A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*, 406, 309-314. 2000
- Arar M, *et al.*, Platelet-derived growth factor receptor β regulates migration and DNA synthesis in metanephric mesenchymal cells. *J Biol Chem*, 275, 9527-9533. 2000
- Arbonés ML, *et al.*, Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*, 1, 247-260. 1994
- Asperti-Boursin F, *et al.*, CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. *J Exp Med*, 204, 1167-1179. 2007
- Atherton A, Born GVR, Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel walls. *J Physiol*, 222, 447-474. 1972
- Bachelder RE, *et al.*, The cleavage of Akt/protein kinase B by death receptor signaling is an important event in detachment-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 34702-34707. 2001
- Badr KF, *et al.*, Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. *J Clin Invest*, 83, 336-342. 1989
- Baekkevold ES, *et al.*, The CCR7 ligand ELC (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med*, 193, 1105-1112. 2001
- Bajenoff, M. *et al.* Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity*, 25, 989–1001. 2006
- Baker AJ, *et al.*, Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest*, 94, 2105-2116. 1994
- Ballermann BJ, *et al.*, Physiologic regulation of atrial natriuretic peptide receptors in rat renal glomeruli. *J Clin Invest*, 76, 2049-2056. 1985
- Banas B, *et al.*, Chemokine and chemokine receptor expression in a novel human mesangial cell line. *J Am Soc Nephrol.*, 10, 2314–2322. 1999
- Banas B, *et al.*, Roles of SLC/CCL21 and CCR7 in human kidney for mesangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis. *J Immunol*, 168, 4301-4307. 2002
- Banas B, *et al.*, Binding of the chemokine SLC/CCL21 to its receptor CCR7 increases adhesive properties of human mesangial cells. *Kidney Int*, 66, 2256-2263. 2004

- Bard JBL, et al., Early nephron formation in the developing mouse kidney. *J Anat*, 199, 385-392. 2001
- Bardi G, et al. The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC. *Eur J Immunol*, 31, 3291–3297. 2001
- Barreiro O, et al. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunological Reviews*, 218, 147-164. 2007
- Barreiro O, Sánchez-Madrid F, Molecular basis of leukocyte–endothelium interactions during the inflammatory response. *Rev Esp Cardiol*, 62, 552-562. 2009
- Bazan JF, et al. A new class of membran-bound chemo-kine with a CX3C motif. *Nature*, 385, 640-644. 1997
- Bennett MR, et al., Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine. *Circ Res*, 77, 1136-1142. 1995
- Berg EL, et al., L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature*, 366, 695-698. 1993
- Berger EA, et al., Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*, 17, 657-700. 1999
- Berthelot L, et al., Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J Exp Med*, 209, 793-806. 2012
- Bevilacqua MP, et al., Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 9238-9242. 1987
- Beynon RJ, Hurst JL, Multiple roles of major urinary proteins in the house mouse, *Mus domesticus*. *Biochem Soc Trans*, 31, 142-146. 2003
- Bianchi C, et al., Distinct localization of atrial natriuretic factor and angiotensin II binding sites in the glomerulus. *Am J Physiol*, 251, 594-602. 1986
- Bielek H, et al., Morphological and proliferative abnormalities in renal mesangial cells lacking RhoGDI. *Cell Signal*, 21, 1974-1983. 2009
- Birkenbach M, et al., Epstein-Barr virus-induced genes: First lymphocyte-specific G protein-coupled peptide receptors. *J Virol*, 67, 2209-2220. 1993.
- Bleul CC, Böhm T, Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol*, 30, 3371-3379. 2000
- Blum H, et al., Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99. 1987
- Bokoch GM, Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* 86, 1649–1660. 1995
- Bonventre JV, et al., Vasopressin increases cytosolic free calcium concentration in glomerular mesangial cells. *Am J Physiol*, 251, 94-102. 1986
- Boscacci RT, et al., Comprehensive analysis of lymph node stroma-expressed Ig superfamily members reveals redundant and nonredundant roles for ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in lymphocyte homing. *Blood*, 116, 915-925. 2010
- Boyle S, et al., Fate mapping using Cited1-CreERT2 mice demonstrates that the cap mesenchyme contains self-renewing progenitor cells and gives rise exclusively to nephronic epithelia. *Dev Biol*, 313, 234-245. 2008
- Braun A, et al., Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. *Nat Immunol*, 12, 879-887. 2011
- Britschgi MR, et al., CCL21 is sufficient to mediate DC migration, maturation and function in the absence of CCL19. *Eur J Immunol*, 40, 1299-1271. 2010
- Brunskill EW, et al., Atlas of gene expression in the developing kidney at microanatomic resolution. *Dev Cell*, 15, 781-791. 2008
- Buren M, et al., Altered expression of lymphocyte homing chemokines in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Contrib Nephrol*, 157, 120-124. 2007
- Burgstahler R, et al., Expression of the chemokine receptor BLR2/EBI1 is specifically transactivated by Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 215, 737-743. 1995
- Burns RK, Development of the mesonephros in Ambystoma after early extirpation of the duct. *Proc Soc Exp Biol Med*, 39, 111-113. 1938

- Byers MA, et al., Arrestin 3 mediates endocytosis of CCR7 following ligation of CCL19 but not CCL21. *J Immunol*, 181, 4723-4732. 2008
- Campbell JJ, et al., Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*, 279, 381-384. 1998
- Carlos TM, et al., Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood*, 76, 965-970. 1990
- Carlsen HS, et al., Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. *Blood*, 106, 444-446. 2005
- Chen SC, et al., Ectopic expression of the murine chemokines CCL21a and CCL21b induces the formation of lymph node-like structures in pancreas, but not skin, of transgenic mice. *J Immunol*, 168, 1001-1008. 2002
- Christopherson KW, et al., Low-molecular-weight heparins inhibit CCL21-induced T cell adhesion and migration. *J Pharmacol Exp Ther*, 302, 290-295. 2002
- Cogan MG, Atrial natriuretic factor can increase renal solute excretion primarily by raising glomerular filtration. *Am J Physiol*, 250, 710-714. 1986
- Colditz IG, Movat HZ, Kinetics of neutrophil accumulation in acute inflammatory lesions induced by chemotaxins and chemotaxinogens. *J Immunol*, 133, 2169-2173. 1984
- Constantin G, et al., Chemokines trigger immediate beta₂ integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*, 13, 759-69. 2000
- Cortes-Hernandez J, et al., Murine glomerular mesangial cell uptake of apoptotic cells is inefficient and involves serum-mediated but complement-independent mechanisms. *Clin Exp Immunol*, 130, 459-466. 2002
- Courtoy PJ, et al., Comparative distribution of laminin, type IV collagen, and fibronectin in the rat glomerulus. *J Histochem Cytochem*, 30, 874-886. 1982
- Davalos-Misslitz ACM, et al., Generalized multi-organ autoimmunity in CCR7-deficient mice. *Eur J Immunol*, 37, 613-622. 2007
- Dean M, et al., Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science*, 273, 1856-1862. 1996
- Deckers JGM, et al., Synergistic effect of IL-1 α , IFN- γ , and TNF- α on RANTES production by human renal tubular epithelial cells in vitro. *J Am Soc Nephrol*, 9, 194-202. 1997
- Delcommenne M, et al., Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 11211-11216. 1998
- Desjardins M, Bendayan M, Heterogenous distribution of type IV collagen, entactin, heparan sulfate proteoglycan, and laminin among renal basement membranes as demonstrated by quantitative immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*, 37, 885-897. 1989
- De Wet J, et al., Firefly Luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 7, 725-737. 1987
- Diamond MS, et al., Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*, 65, 961-971. 1991
- Dieu MC, et al., Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med*, 188, 373-386. 1998
- Dobner T, et al., Differentiation-specific expression of a novel G protein-coupled receptor from Burkitt's lymphoma. *Eur J Immunol*, 22, 2795-2799. 1992
- Drenckhahn D, et al., Ultrastructural organization of contractile proteins in rat glomerular mesangial cells. *Am J Pathol*, 137, 1343-1351. 1990
- Ecker RC, Steiner GE, Microscopy-based multi-color tissue cytometry at the single cell level. *Cytometry*, 59, 182-190. 2004
- Ekblom P, et al., In vitro segregation of the metanephric nephron. *Dev Biol*, 84, 85-95. 1981
- Ekblom P, et al., The origin of the glomerular endothelium. *Cell Differ*, 11, 35-39. 1982
- Ekblom P, Developmentally regulated conversion of mesenchyme to epithelium. *FASEB J*, 3, 2141-2150. 1989

- Elices MJ, et al., VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4 /fibronectin binding site. *Cell*, 60, 577-584. 1990
- Engelhardt B, Wolburg H, Mini-review: transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol*, 34, 2955-2963. 2004
- Eremina V, Quaggin SE, The role of VEGF-A in glomerular development and function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 13, 9-15. 2004
- Fan L, et al. Cutting edge: ectopic expression of the chemokine TCA4/SLC is sufficient to trigger lymphoid neogenesis. *J Immunol*, 164, 3955-3959. 2000
- Farquhar MG, Palade GE. Functional evidence for the existence of a third cell type in the renal glomerulus: Phagocytosis of filtration residues by a distinctive "third" cell. *J Cell Biol*, 13, 55-87. 1962
- Feng Y, et al., HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272, 872-877. 1996
- Fierlbeck W, et al., Endothelial cell apoptosis during glomerular capillary lumen formation in vivo. *J Am Soc Nephrol*, 14, 1349-1354. 2003
- Flanagan K, et al., The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naïve T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatory CD4+ T cells. *Cell Immunol*, 231, 75-84. 2004
- Florey H, Grant L, Leukocyte migration from small blood vessels stimulated with ultraviolet light: An electron-microscopic study. *J Pathol*, 82, 13-17. 1961
- Förster R, et al., A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell*, 87, 1037-1047. 1996
- Förster R, et al., CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. *Cell*, 99, 23-33. 1999
- Fossati P, et al., Enzymatic Creatinine assay: a new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement. *Clin Chem* 29, 1494-1496. 1983
- Fraser EA, The development of the vertebrate excretory system. *Biological Reviews*, 25, 159-187. 1950
- Friedl P, et al., Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol*, 70, 491-509. 2001
- Gallatin WM, et al., A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*, 304, 30-34. 1983
- Georgas K, et al., Use of dual section mRNA in situ hybridisation/immunohistochemistry to clarify gene expression patterns during the early stages of nephron development in the embryo and in the mature nephron of the adult mouse kidney. *Histochem Cell Biol*, 130, 927-942. 2008
- Georgas K, et al., Analysis of early nephron patterning reveals a role for distal RV proliferation in fusion to the ureteric tip via a cap mesenchyme-derived connecting segment. *Dev Biol*, 332, 273-286. 2009
- Girard JP, Springer TA, High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today*, 16, 449-457. 1995
- Gomez RA, et al., Development of the kidney vasculature. *Microsc Res Tech* 39, 254-260. 1997
- Gomez-Guerrero G, et al., Mesangial cells possess an asialoglycoprotein receptor with affinity for human immunoglobulin A. *J Am Soc Nephrol*, 9, 568-576. 1998
- Göttle P, et al., Activation of CXCR7 receptor promotes oligodendroglial cell maturation. *Ann Neurol*, 68, 915-924. 2010
- Greenwood J, et al., Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *Immunology*, 86, 408-415. 1995
- Gretz JE, et al., Sophisticated strategies for information encounter in the lymph node: The reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic. *J Immunol*, 157, 495-499. 1996
- Griffin JD, et al., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol*, 145, 576-584. 1990

- Grobstein C, Inductive epithelio-mesenchymal interaction in cultured organ rudiments. *Science*, 113, 52–55. 1953
- Grobstein C, Inductive interaction in the development of the mouse metanephros. *J Exp Zool*, 130, 319–339. 1955
- Grobstein C, Some transmission characteristics of the tubule-inducing influence on mouse metanephrogenic mesenchyme. *Exp Cell Res*, 13, 575-587. 1957
- Gröne HJ, et al., Spatial and temporally restricted expression of chemokines and chemokine receptors in the developing human kidney. *J Am Soc Nephrol.*, 13, 957-967. 2002
- Gunn MD, et al., A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature*, 391, 799–803. 1998 (a)
- Gunn MD, et al., A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 258-263. 1998 (b)
- Gunn MD, et al., Mice Lacking Expression of Secondary Lymphoid Organ Chemokine Have Defects in Lymphocyte Homing and Dendritic Cell Localization. *J Exp Med*, 189, 451-460. 1999
- Gurner AC, et al., The origin of Ia antigen-expressing cells in the rat kidney. *Am J Pathol*, 127, 342-348. 1987
- Hall A, Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279, 509-514. 1998
- Halvorsen B, et al., Increased levels of CCR7 ligands in carotid atherosclerosis: different effects in macrophages and smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 102, 148–156. 2014
- Hannigan GE, et al., Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*, 379, 91-96. 1996
- Hatini V, et al., Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev*, 10, 1467-1478. 1996
- Hau J, Skovgaard Jensen HJ, Diagnosis and monitoring of pregnancy in mice: correlations between maternal weight, fetal and placental mass and the maternal serum levels of progesterone, pregnancy-associated murine protein-2 and α-fetoprotein. *Lab Anim*, 21, 306-310. 1987
- Hedrick JA, Zlotnik A. Identification and characterization of a novel beta chemokine containing six conserved cysteines. *J Immunol*, 159, 1589-1593. 1997
- Hellström M, et al., Role of PDGF-B and PDGFR-β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126, 3047-3055. 1999
- Hemler ME, et al., The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight beta subunit. *J Biol Chem*, 262, 3300-3309. 1987
- Herzlinger D, et al., Metanephric mesenchyme contains multipotent stem cells whose fate is restricted after induction. *Development*, 114, 565-572. 1992
- Hirschi KK, D'Amore PA., Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res*, 32, 687-698. 1996
- Hoar RM, Comparative developmental aspects of selected organ systems. II. Gastrointestinal and urogenital systems. *Environ Health Perspect*, 1, 61-66. 1976
- Hoffsten PE, et al., Studies of abuminuria and proteinuria in normal mice and mice with immune complex glomerulonephritis. *J Lab Clin Med*, 83 920-930. 1975
- Honczarenko M, et al., Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*, 24, 1030–1041. 2007
- Horley JK, et al., Molecular cloning of murine intercellular adhesion molecule (ICAM-1). *EMBO J*, 8, 2889-2896. 1989
- Hornigold N, et al., Upregulation of Hic-5 in glomerulosclerosis and its regulation of mesangial cell apoptosis. *Kidney Int*, 77, 329–338. 2010
- Hromas R, et al., Isolation and characterization of Exodus-2, a novel C-C chemokine with a unique 37-amino acid carboxyl-terminal extension. *J Immunol*, 15, 2554-2558. 1997
- Huang JH, et al., Requirements for T lymphocyte migration in explanted lymph nodes. *J Immunol*, 178, 7747-7755. 2007

- Huang J, et al., T cell antigen recognition at the cell membrane. *Mol Immunol*, 52, 155– 164. 2012
- Huber AR, et al., Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*, 254, 99-102. 1991
- Hughes J, et al., Human glomerular mesangial cell phagocytosis of apoptotic neutrophils: mediation by a novel CD36-independent vitronectin receptor/thrombospondin recognition mechanism that is uncoupled from chemokine secretion. *J Immunol*, 158, 4389-4397. 1997
- Hugo C, et al., Extraglomerular origin of the mesangial cell after injury. A new role of the juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest*, 100, 786-794. 1997
- Humphreys BD, et al., Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol*, 176, 85-97. 2010
- Hyink DP, et al., Endogenous origin of glomerular endothelial and mesangial cells in grafts of embryonic kidneys. *Am J Physiol*, 270, 886-899. 1996
- Ikee R, et al., Involvement of transglutaminase-2 in pathological changes in renal disease. *Nephron Clin Pract*, 105, 139-146. 2007
- Inkyo-Hayasaka K, et al., Three-dimensional analysis of the whole mesangium in the rat. *Kidney Int*, 50, 672-683. 1996
- Indrasingh I, et al., Route of lymphocyte migration through the high endothelial venule (HEV) in human palatine tonsil. *Ann Anat*, 184, 77-84. 2002
- Ishino T, et al., Biochemical characterization of contractile proteins of rat cultured mesangial cells. *Kidney Int*, 39, 1118-1124. 1991
- Issekutz TB, et al., The in vivo quantitation and kinetics of monocyte migration into acute inflammatory tissue. *Am J Pathol*, 103, 47-55. 1981
- Ito T, et al., Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol*, 12, 2625-2635. 2001
- Ivaska J, et al., Integrin $\alpha 2\beta 1$ promotes activation of protein phosphatase 2A and dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase 3 β . *Mol Cell Biol*, 22, 1352-1359. 2002
- Jia Q, et al., Ablation of developing podocytes disrupts cellular interactions and nephrogenesis both inside and outside the glomerulus. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295, 1790-1798. 2008.
- Jones DB, Nephrotic glomerulonephritis. *Am J Pathol*, 33, 313-329. 1957
- Junqueira LCU, et al., Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemical Journal* 11, 447-455. 1979
- Kaiser E, et al., The G protein-coupled receptor BLR1 is involved in murine B Cell Differ and is also expressed in neuronal tissues. *Eur J Immunol*, 23, 2532-2539. 1993
- Kamiyama M, et al., Contribution of Rho A and Rho kinase to platelet-derived growth factor-BB-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb*, 10, 117-123. 2003
- Kanwar YS, et al., Distribution of de novo synthesized sulfated glycosaminoglycans in the glomerular basement membrane and mesangial matrix. *Lab Invest*, 49, 216-225. 1983
- Katakai T, et al., A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int Immunol*, 16, 1133-1142. 2004 (a)
- Katakai T, et al., Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med*, 200, 783-795. 2004 (b)
- Katsuyama R, et al., Expression of macrophage asialoglycoprotein-binding protein is induced through MAPK classical pathway. *Biochem Biophys Res Com* 280, 1269-1273. 2001
- Kelner GS, et al. Lymphotactin: A cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, 266, 1395-1399. 1994
- Kikkawa Y, et al., Mesangial cells organize the glomerular capillaries by adhering to the G domain of laminin alpha5 in the glomerular basement membrane. *J Cell Biol*, 161, 187-196. 2003
- Kikuchi K, et al., CCR7 ligand-enhanced phagocytosis of various antigens in mature dendritic cells—time course and antigen distribution different from phagocytosis in immature dendritic cells. *Microbiol Immunol*, 49, 535-544. 2005

- Kikuta A, Rosen SD., Localization of ligands for L-selectin in mouse peripheral lymph node high endothelial cells by colloidal gold conjugates. *Blood*, 84, 3766-3775. 1994
- Kitamoto Y, et al., Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: Glomerulogenesis and Nephrogenesis. *J Clin Invest*, 99, 2351-2357. 1997
- Klein DJ, et al., Partial characterization of heparan and dermatan sulfate proteoglycans synthesized by normal rat glomeruli. *J Biol Chem*, 261, 16636-16652. 1986
- Kloth S, et al., Interrelationship of renal vascular development and nephrogenesis. *Cell Tissue Res*, 277, 247-257. 1994
- Koch AE, et al., Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258, 1798-1801. 1992
- Kohout TA, et al., Differential desensitization, receptor phosphorylation, β -arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J Biol Chem*, 279, 23214-23222. 2004
- Kriz W, et al., Structure-stabilizing forces in the glomerular tuft. *J Am Soc Nephrol*, 5, 1731-1739. 1995
- Kruskal WH, Wallis WA, Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Statist Assoc*, 47, 583-621. 1952
- Kunkel EJ, et al., CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *The J Clin Invest* 111, 1001-1010. 2003
- Kupiec-Weglinski JW, et al., Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues. *J Exp Med*, 167, 632-645. 1988
- Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685. 1970
- Larson DM, et al., Junctional transfer of small molecules in cultured bovine brain microvascular endothelial cells and pericytes. *Microvasc Res*, 34, 184-199. 1987
- Latta H, Collagen in normal rat glomeruli. *J Ultrastruct Res*, 5, 364-373. 1961
- Lazarus NH, et al., A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts. *J Immunol*. 170, 3799-3805. 2003
- Lawrence MB, Springer TA, Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, 65, 859-873. 1991
- Legler DF, et al., B Cell-attracting Chemokine 1, A human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med*, 187, 655-660. 1998
- Levashova ZB, et al., ELR⁺-CXC chemokines and their receptors in early metanephric development. *J Am Soc Nephrol*, 18, 2359-2370, 2007
- Levéen P, et al., Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev*, 8, 1875-1887. 1994
- Levene H, Robust tests for equality of variances. In: I. Olkin, et al., Eds., *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*, Stanford University Press, Palo Alto, 278-292. 1960
- Leverrier Y, Ridley AJ, Requirement for Rho GTPases and PI 3-kinases during apoptotic cell phagocytosis by macrophages. *Cell*, 70, 389-399. 1992
- Ley K, et al., Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood*. 77, 2553-2555. 1991
- Lin EE, et al., RBP-J in FOXD1 renal stromal progenitors is crucial for the proper development and assembly of the kidney vasculature and glomerular mesangial cells. *Am J Physiol*, 306, 249-258. 2014
- Lindahl P, et al., Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 277, 242-245. 1997
- Lindahl P, et al., Paracrine PDGF-B/PDGFR β signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli. *Development* 125, 3313-3322. 1998.
- Lindquist RL, et al., Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol*, 5, 1243-1250. 2004
- Link A, et al., Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol*, 8, 1255-1265. 2007

- Liu A, et al., Neutralizing TGF- β 1 antibody infusion in neonatal rat delays in vivo glomerular capillary formation. *Kidney Int*, 56, 1334-1348. 1999
- Liu Y, Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int*, 69, 213-217. 2006
- Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25, 402-408. 2001
- Lloyd AR, et al., Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. *J Immunol*, 156, 932-938. 1996
- Love M, et al., Solution structure of CCL21 and identification of a putative CCR7 binding site. *Biochemistry*, 24, 733-735. 2012
- Luo Y, Dorf ME, β -Chemokine TCA3 binds to mesangial cells and induces adhesion, chemotaxis, and proliferation. *J Immunol*, 156, 742-748. 1996
- Luster AD, et al., The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med*, 182, 219-231. 1995
- Luther SA, et al., Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt=plt mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 12694-12699. 2000
- Ma Q, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 9448-9453. 1998
- Mackay CR, Chemokines: What chemokine is that? *Curr Biol*, 7, 384-386. 1997
- Mann NR, Whitney DR, On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statist.* 18, 50-60. 1947
- McManus JFA, et al., Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol* 98, 99-108. 1948
- Mené P, et al., Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev*, 69, 1347-1424. 1989
- Meyrick B, Reid L, The effect of continued hypoxia on rat pulmonary arterial circulation. An ultrastructural study. *Lab Invest*, 38, 188-200. 1978
- Möller MJ, et al., An efficient system for tissue-specific overexpression of transgenes in podocytes in vivo. *Am J Physiol - Renal Physiol*, 289, 481-488. 2005
- Molloy AP, et al., Mesenchymal stem cell secretion of chemokines during differentiation into osteoblasts, and their potential role in mediating interactions with breast cancer cells. *Int J Cancer*, 124, 326-332. 2009
- Mori S, et al., Mice lacking expression of the chemokines Ccl21-Ser and Ccl19 (plt mice) demonstrate delayed but enhanced T cell immune responses. *J Exp Med*, 193, 207-217. 2001
- Morin S, et al., Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates integrin LFA-1 de-adhesion during T lymphocyte migration. *J Exp Med*, 205, 195-205. 2008
- Morteau O, et al., An indispensable role for the chemokine receptor CCR10 in IgA antibody secreting cell accumulation. *J Immunol*, 181, 6309-6315. 2008
- Mueller SN, Germain RN, Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nature Reviews Immunol* 9, 618-629. 2009
- Müller A, et al., Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410, 50-56. 2001
- Muller WA, Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response. *Lab Invest*, 82, 521-533. 2002
- Mundel P, et al., Microfibrils are a major component of the mesangial matrix in the glomerulus of the rat kidney. *Cell Tissue Res*, 254, 183-187. 1988
- Murphy PM, The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol*, 12, 593-633. 1994
- Nagira M, et al., Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13. *J Biol Chem*, 272, 19518-19524. 1997
- Nagira M, et al., A lymphocyte-specific CC chemokine, secondary lymphoid tissue chemokine (SLC), is a highly efficient chemoattractant for B cells and activated T cells. *Eur J Immunol*, 28, 1516-1523. 1998

- Nakai K, et al., Difference of myosin heavy chain expression between mesangial cells and vascular smooth muscles. *Jap J Nephrol*, 37, 428-435. 1995
- Nakano H, et al., Genetic defect in T lymphocyte-specific homing into peripheral lymph nodes. *Eur J Immunol*, 27, 215-221. 1997
- Nakano H, et al., A Novel Mutant Gene Involved in T-Lymphocyte-Specific Homing Into Peripheral Lymphoid Organs on Mouse Chromosome 4. *Blood*, 91, 2886-2895. 1998
- Nakano H, Gunn MD, Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation. *J Immunol*, 166, 361-369. 2001
- Nehls V, Drenckhahn D, Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *J Cell Biol.*, 113, 147-154. 1991
- Nehls V, et al., Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res*, 270, 469-477. 1992
- Neiss WF, Morphogenesis and histogenesis of the connecting tubule in the rat kidney. *Anat Embryol*, 165, 81-95. 1982
- New DC, Wong YH, CC chemokine receptor-coupled signalling pathways. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 35, 779-788. 2003
- Ngo VN, et al., Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J Exp Med*, 188, 181-191. 1998
- Ning L, et al., Laminin α 1 regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF- β pathway. *Am J Pathol*, 184, 2014.
- Nyengaard JR, Bendtsen TF, Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anatomical Record*, 232, 194-201. 1992
- Ohl L, et al., Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J Exp Med*, 1971, 1199-1204. 2003
- Okada T, Cyster JG, CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. *J Immunol*, 178, 2973-2978. 2007
- Okuda T, et al., Angiotensin II and vasopressin stimulate calcium-activated chloride conductance in rat mesangial cells. *J Clin Invest*, 78, 1443-1448. 1986
- Oppenheim JJ, et al., Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol*, 9, 617-648. 1991
- Oppenheimer-Marks N, et al., Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol* 147, 2913-2921. 1991
- O'Rahilly R, Muecke EC, The timing and sequence of events in the development of the human urinary system during the embryonic period proper. *Z Anat Entwickl.-Gesch*, 138, 99-109. 1972
- Osathanondh V, Potter E., Development of human kidney as shown by microdissection III: Formation and interrelationships of collecting tubules and nephrons. *Arch Pathol*, 76, 290-302. 1963
- Osborn L, et al., Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, 59, 1203-1211. 1989
- Ott RT, et al., Determinants of high-affinity binding and receptor activation in the N-Terminus of CCL-19 (MIP-3 α). *Biochemistry*, 43, 3670-3678. 2004
- Ott RT, et al., The N-terminal domain of CCL21 reconstitutes high affinity binding, G protein activation, and chemo-tactic activity, to the C-terminal domain of CCL19. *Biochem Biophys Res Commun*, 348, 1089-1093. 2006
- Overton J. Studies on the mode of outgrowth of the amphibian pronephric duct. *J Embryol Exp Morphol*, 7, 86-93. 1959.
- Park EJ, et al., Distinct roles for LFA-1 affinity regulation during T-cell adhesion, diapedesis, and interstitial migration in lymph nodes. *Blood*, 115, 1572-1581. 2010
- Pavalko FM, LaRoche SM, Activation of Human neutrophils induces an interaction between the Integrin β_2 -subunit (CD18) and the actin binding protein α -actinin. *J Immunol*, 151, 3795-3807. 1993

- Pham THM, et al., S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by Gαi-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity*, 28, 122-133. 2008
- Ponte AP, et al., The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells*, 25:1737–1745. 2007
- Pricam C, et al., Gap junctions in mesangial and lacis cells. *J Cell Biol*, 63, 349-354. 1974
- Prodjosudjadi W, et al., Production and cytokine-mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int*, 48, 1477-1486. 1995
- Reif K, et al., Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature*, 416, 94-99. 2002
- Reeves WH, et al., Assembly of the glomerular filtration surface. Differentiation of anionic sites in glomerular capillaries of newborn rat kidney. *J Cell Biol*, 85, 735-753. 1980
- Ricono JM, et al., Morphological insights into the origin of glomerular endothelial and mesangial cells and their precursors. *J Histochem Cytochem*, 51, 141-150. 2003
- Ringe J, et al., Towards *in situ* tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem*, 101, 135–146. 2007
- Risau W, et al., Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*, 102, 471-478. 1988.
- Risau W, Famme I, Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11, 73-91. 1995
- Robert B, et al., Direct visualization of renal vascular morphogenesis in Flk1 heterozygous mutant mice. *Am J Physiol*, 275, 164-172. 1998
- Robert B, et al., Coexpression of neuropilin-1, Flk1, and VEGF₁₆₄ in developing and mature mouse kidney glomeruli. *Am J Physiol*, 279, 275-282. 2000
- Roberts WG, Palade GE, Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 108, 2369-2379. 1995.
- Rollins BJ. Chemokines. *Blood*, 90, 909-928. 1997
- Romagnani P, et al., Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 2518-2526. 1999
- Romani N, et al., Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*, 169, 1169-1178. 1989
- Rossi DL, et al., Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. *J Immunol*, 158, 1033-1036. 1997
- Rossi DL, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, 18, 217–242. 2000
- Rot A, et al., RANTES and macrophage inflammatory protein 1 α induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med*, 176, 1489-1495. 1992
- Rovin BH, et al., Cytokine-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured human mesangial cells. *J Immunol*, 148, 2148-2153. 1992
- Rüster B, et al., Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, 108, 3938-3944. 2006
- Sainio K, et al., Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium. *Development*, 124, 4077-4087. 1997
- Sakai N, et al., Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC, CCL21) CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 14098-14103. 2006
- Sakai T, Kriz W, The structural relationship between mesangial cells and the basement membrane of the renal glomerulus. *Anat Embryol*, 176, 373-386. 1987
- Sallusto F, et al., Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*, 28, 2760-2769. 1998
- Sallusto F, et al., Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401, 708-712. 1999

- Sanchez-Madrid F, et al., Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, and LFA-3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79, 7489-7493. 1982
- Sariola H, et al., Differentiation and vascularization of the metanephric kidney grafted on the chorioallantoic membrane. *Dev Biol*, 96, 427-435. 1983
- Sariola H, et al., Dual origin of glomerular basement membrane. *Dev Biol*, 101, 86-96. 1984
- Sariola H, Mechanisms and regulation of the vascular growth during kidney differentiation. *Iss Biomed*, 14, 69-80. 1991
- Sasaki K, et al., Ultrastructural localization of the intercellular adhesion molecule (ICAM-1) on the cell surface of high endothelial venules in lymph nodes. *Anat Rec*, 244, 105-111. 1996
- Satriano JA, et al., Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN- γ , tumor necrosis factor- α , IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. *J Immunol*, 150, 1971-1978. 1993
- Saxén L, Wartiovaara, Cell contact and cell adhesion during tissue organization. *Int J Canc*, 1, 271-290. 1966
- Saxén L. Organogenesis of the kidney. Developmental and cell biology series. Cambridge University Press. 1987
- Saxén L, Lehtonen E, Embryonic kidney in organ culture. *Differentiation*, 36, 2-11. 1987
- Saxén L, Sariola H, Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol*, 1, 385-392. 1987
- Schall TJ, et al., Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*, 347, 669-671. 1990
- Schlöndorff D, The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J*, 1, 272-281. 1987
- Schlöndorff D, Banas B, The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol*, 20, 1179-1187. 2009
- Schreiner GF, et al., Characterization of resident glomerular cells in the rat expressing Ia determinants and manifesting genetically restricted interactions with lymphocytes. *J Clin Invest*, 68, 920-931. 1981
- Schreiner GF, Cotran RS, Localization of an Ia-bearing glomerular cell in the mesangium. *J Cell Biol*, 94, 784-788. 1982.
- Schreiner GF, The mesangial phagocyte and its regulation of contractile cell biology. *J Am Soc Nephrol*, 2, 74-82. 1992
- Schröder JA, et al., Microwave-assisted tissue processing for same-day EM-diagnosis. *Micron*, 37, 577-590. 2005
- Schwarz M, et al., Lymphocyte-derived cytokines induce sequential expression of monocyte- and T cell-specific chemokines in human mesangial cells. *Kidney Int*, 52, 1521-1531. 1997
- Schumann K, et al., Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity*, 32, 703-713. 2010
- Schwartz E, et al., Extracellular matrix microfibrils are composed of core proteins coated with fibronectin. *J Histochem Cytochem*, 33, 264-274. 1985
- Schweickart VL, et al., Cloning of human and mouse EBI1, a lymphoid-specific G-protein-coupled receptor encoded on human chromosome 17q12-q21.2. *Genomics*, 23, 643-650. 1994
- Sedor JR, et al., Immune complexes bind to cultured rat glomerular mesangial cells to stimulate superoxide release. Evidence for a Fc receptor. *J Immunol*, 138, 3751-3757. 1987
- Seifert RA, et al., Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in the developing and adult mouse kidney. *Kidney Int*, 54, 731-746. 1998
- Sellitti DF, et al., Thyroglobulin increases cell proliferation and suppresses Pax-8 in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Com*, 285, 795-799. 2001
- Sequeira Lopez MLS, Gomez AR, Development of the Renal Arterioles. *J Am Soc Nephrol*, 22, 2156-2165. 2011
- Shamri R, et al., Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol*, 6, 497-506. 2005

- Shapiro SS, Wilk MB, An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52, 591-611, 1965
- Shepro D, Morel NM, Pericyte physiology. *FASEB J*, 7, 1031-1038. 1993
- Shigehara T, et al., Inducible podocyte-specific gene expression in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol*. 14, 1998-2003. 2003
- Shultz PJ, et al., Effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide on rat mesangial cells. *Am J Physiol*, 258, 162-167. 1990
- Shulman Z, et al., Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin. *Immunity*, 30, 384–396. 2009
- Silberberg-Sinakin I, et al., Antigen-bearing Langerhans cells in skin, dermal lymphatics and in lymph nodes. *Cell Immunol*, 25, 137,151. 1976
- Simonson MS, Dunn MJ, Endothelin-1 stimulates contraction of rat glomerular mesangial cells and potentiates beta-adrenergic-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation. *J Clin Invest*, 85, 790-797. 1990
- Simonson MS, Dunn MJ, Ca²⁺ signaling by distinct endothelin peptides in glomerular mesangial cells. *Exp Cell Res*, 1, 148-156. 1991
- Sims DE, The pericyte – a review. *Tissue Cell*, 18, 153-174. 1986
- Singhal PC, et al., Endocytosis by cultured mesangial cells and associated changes in prostaglandin E2 synthesis. *Am J Physiol*, 252, 627-634. 1987
- Singhal PC, et al., Effects of vasoactive agents on uptake of immunoglobulin G complexes by mesangial cells. *Am J Physiol*, 258, 589-596. 1990
- Smith PK, et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85. 1985
- Smith-Garvin JE, et al., T Cell Activation. *Annu Rev Immunol*, 27, 591-619. 2009
- Sordi V, et al., Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*, 106, 419-427. 2007
- Soriano P, Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev*, 8, 1888-1896. 1994
- Sozzani S, et al., Cutting edge: Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol*, 161, 1083–1086. 1998
- Springer TA, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76, 301-314. 1994
- Stachowiak AN, et al., Homeostatic lymphoid chemokines synergize with adhesion ligands to trigger T and B lymphocyte chemokinesis. *J Immunol*, 177, 2340-2348. 2006
- Stein JV, et al., The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (tca-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling t lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *J Exp Med*, 191, 61-76. 2000
- Stockand JD, Sansom SC, Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Physiol Rev*, 78, 723-744. 1998
- Strieter RM, et al., Interleukin-8 - a corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol*, 141, 1279-1284. 1992
- Strieter RM, et al., Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 210, 51-57. 1995 (a)
- Strieter RM, et al., The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*, 270, 27348-27357. 1995 (b)
- Striker GE, et al., Role of marrow-derived monocytes and mesangial cells in removal of immune complexes from renal glomeruli. *J Exp Med*, 149, 127-136. 1979
- Sugiyama H, et al., Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int*, 49, 103-111. 1996
- Sullivan SK, et al., pharmacological and signaling analysis of human chemokine receptor CCR-7 stably expressed in HEK-293 cells: High-affinity binding of recombinant ligands MIP-3 β and SLC stimulates multiple signaling cascades. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 685–690. 1999

- Sundström P, et al., Human IgA-secreting cells induced by intestinal, but not systemic, immunization respond to CCL25 (TECK) and CCL28 (MEC). *Eur J Immunol.* 38, 3327-3338. 2008
- Tachibana K, et al., The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature.* 393, 591-594. 1998
- Takabatake Y, et al., The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis is essential for the development of renal vasculature. *J Am Soc Nephrol.* 20, 1714-1723. 2009
- Takahashi T, et al., Renal microvascular assembly and repair: Power and promise of molecular definition. *Kidney Int.* 53, 826-835. 1998
- Takeda K, et al., Effect of angiotensin II on Ca^{2+} kinetics and contraction in cultured rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol.* 254, 254-266. 1988
- Tal O, et al., DC mobilization from the skin requires docking to immobilized CCL21 on lymphatic endothelium and intralymphatic crawling. *J Exp Med.* 208, 2141-2153. 2001
- Tanaka Y, et al., T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature.* 361, 79-82. 1993
- Taugner R, et al., Gap junctional coupling between the JGA and the glomerular tuft. *Cell Tissue Res.* 186, 279-285. 1978
- Timpl R, et al., Laminin - a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem.* 254, 9933-9937. 1979
- Togawa A, et al., Progressive impairment of kidneys and reproductive organs in mice lacking Rho GDI α . *Oncogene.* 18, 5373-5380. 1999
- Towbin H, et al., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354. 1979
- Tsuboi K, et al., Role of high endothelial venule-expressed heparan sulfate in chemokine presentation and lymphocyte homing. *J Immunol.* 191, 448-455. 2013
- Tsukahara H, et al., Decrease in ambient [Cl $^-$] stimulates nitric oxide release from cultured rat mesangial cells. *Am J Physiol.* 267, 190-195. 1994
- Tybulewicz VLJ, Robert BH, Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nature.* 9, 630-644. 2009
- Ueland J, et al., A novel role for the chemokine receptor Cxcr4 in kidney morphogenesis: an in vitro study. *Dev Dyn.* 238, 1083-1091. 2009
- Ueland T, et al., CCL21 is associated with fatal outcomes in chronic heart failure: data from CORONA and GISSI-HF trials. *Eur J Heart Fail.* 15, 747-755. 2013
- Van Epps DE, et al., Suppression of human lymphocyte chemotaxis and transendothelial migration by anti-LFA-1 antibody. *J Immunol.* 143, 3207-3210. 1989
- Vassileva G, et al., The reduced expression of 6Ckine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6Ckine genes. *J Exp Med.* 190, 1183-1188. 1999
- Vaughan MR, Quaggin SE, How do mesangial and endothelial cells form the glomerular tuft? *J Am Soc Nephrol.* 19, 24-33. 2008
- Vicente-Manzanares M, Sánchez-Madrid F, Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature Rev Immunol.* 4, 110-122. 2004
- Warner SJ, Libby P, Human vascular smooth muscle cells. Target for and source of tumor necrosis factor. *J Immunol.* 142, 100-109. 1989
- Warnock RA, et al., Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med.* 187, 205-216. 1998
- Weiss MA, et al., Immunofluorescent localization of fibronectin in the human kidney. *Lab Invest.* 41, 340-347. 1979
- Willimann K, et al., The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol.* 28, 2025-2034. 1998
- Wirth-Dzięciołowska E, et al., Selected blood serum biochemical indicators in twelve inbred strains of laboratory mice. *Anim Sci Pap Rep.* 27, 159-167. 2009
- Wolf G, et al., Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. *J Clin Invest.* 100, 1047-1058. 1997

- Wolpe SD, et al., Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med*, 167, 570-581. 1988
- Woolf E, et al., Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat Immunol*, 8, 1076- 1085. 2007
- Worbs T, et al., CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. *J Exp Med*, 204, 489-495. 2007
- Wörnle M, et al., Effects of chemokines on proliferation and apoptosis of human mesangial cells. *BMC Nephrol*, 5:8. 2004
- Wu D, et al., G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8. *Science*, 261, 101-103. 1993
- Yanagihara S, et al., EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol*, 161, 3096-3102. 1998
- Yndestad A, et al., The homeostatic chemokine CCL21 predicts mortality and may play a pathogenic role in heart failure. *PLoS One*, 7, 33038. 2012
- Yoshida R, et al., Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *J Biol Chem*, 272, 13803-13809. 1997
- Yoshida R, et al., Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem*, 273, 7118-7122. 1998
- Yoshimura T, et al., Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J Immunol*, 139, 788-793. 1987
- Yuasa T, et al., Thy-1 expressing mesenchymal cells in rat nephrogenesis in correlation with cells immunoreactive for α -smooth muscle actin and vimentin. *J Toxicol Pathol*, 23, 1-10. 2010
- Zhang H, et al., Transcriptional activation of placental growth factor by the Forkhead/Winged Helix transcription factor FoxD1. *Curr Biol*, 13, 1625-1629. 2003
- Zehn D, et al., TCR signaling requirements for activating T cells and for generating memory. *Cell Mol Life Sci*, 69, 1565-1575. 2012
- Zidar DA, et al., Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 9649-9654. 2009
- Zigmond SH, Mechanisms of sensing chemical gradients by polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 249, 450–452. 1974
- Zimmermann KW, Über den Bau des Glomerulus der Säugerniere. *Z mikr-anat Forsch*, 32, 176-278. 1933
- Zou YR, et al., Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393, 595-599. 1998

5.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere	min	Minute
Abb.	Abbildung	mM	Milimolar
ad.	bis zu einem Gesamtvolumen von	mm	Milimeter
bp	Basenpaare	mmHg	mm Quecksilbersäule
bzgl.	bezüglich	µg	Mikrogramm
bzw.	beziehungsweise	µl	Mirkoliter
°C	Grad Celsius	µM	Mikromolar
ca.	circa	µm	Mirkometer
cDNA	komplementäre DNA	ng	Nanogramm
cm	Zentimeter	nM	Nanomolar
cm ²	Qadratzentimeter	mRNA	<i>messenger-RNA, Boten-RNA</i>
Δ	Differenz	RNA	Ribonukleinsäure
Da	Dalton	p	p-Wert
dl	Deziliter	rpm (max.)	(maximale) Umdrehungszahl
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
ect.	<i>et cetera</i> , und die übrigen	RT ⁽⁻⁾	(ohne) reverse Transkriptase
et al.	<i>et alii</i> , und andere	s	Sekunde
g	Gramm	s. u.	siehe unten
h	Stunde	U	<i>units</i> , Einheiten
<i>in vitro</i>	„im Glas“, in der Zellkultur	u. a.	unter anderem
<i>in vivo</i>	„im Lebendigen“, im Tier-/Humanmodell	üN	über Nacht
kg	Kilogramm	V	Volt
kDa	Kilodalton	vgl.	vergleiche
l	Liter	v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
mA	Miliampere	w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
mg	Milligramm	z. B.	zum Beispiel

5.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Aubau eines Nephrons und eines Glomerulums
- Abb. 2 Skizzenhafte Darstellung der Nierenbeckenentwicklung.
- Abb. 3 Frühe Entwicklungsstadien in der Entwicklung des Nephrons
- Abb. 4 Schematische Darstellung der Entwicklung eines Nephrons und einer Nephronarkade
- Abb. 5 Glomerulogenese vom Stadium des S-förmigen Körperchens über das Kapillarschlingenstadium bis zum kapillarisierten Glomerulum
- Abb. 6 Entwicklung von der einzelnen Kapillarschlinge zum glomerulären Schlingenkonvolut
- Abb. 7 Schematische Darstellung eines glomerulären Ausschnitts mit einer Mesangialzelle, die von drei Kapillaren umgeben ist
- Abb. 8 Mehrstufiger Ablauf der Leukozytenrekrutierung in entzündetes Gewebe
- Abb. 9 Rekrutierung einer naiven T-Zelle in die T-Zellzone eines Lymphknotens
- Abb. 10 Lymphozyten-Adhäsion
- Abb. 11 Lymphozytenmigration entlang des retikulären Netzwerks im Lymphknoten
- Abb. 12 Wirkspektrum von Chemokinen und ihren Rezeptoren
- Abb. 13 Effekt von CCL21 auf kultivierte Mesangialzellen
- Abb. 14 Aufbau des Western Blots in der Blotting Apparatur
- Abb. 15 Verlauf der CCR7 und CCL21 mRNA-Expression in Embryonen, sowie postpartalen und adulten Mäusen
- Abb. 16 Immunhistochemischer Nachweis von CCR7 im murinen Nierengewebe von der Embryonalentwicklung bis zum adulten Tier
- Abb. 17 Immunhistochemischer Nachweis von CCL21 im murinen Nierengewebe von der Embryonalentwicklung bis zum adulten Tier
- Abb. 18 Gesamtkörpergewicht bei 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen
- Abb. 19 Ratio vom Gewicht beider Nieren zum Gesamtkörpergewicht bei 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen
- Abb. 20 Ratio von Milz- zu Gesamtkörpergewicht bei 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen
- Abb. 21 Ratio von Herz- zu Gesamtkörpergewicht bei 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen
- Abb. 22 Ratio von Leber- zu Gesamtkörpergewicht bei 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen
- Abb. 23 Graphische Darstellung der Proteinkonzentration in den Seren von 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen
- Abb. 24 Graphische Darstellung der Konzentration des Serum-Albumins von 20 und 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen
- Abb. 25 Graphische Darstellung der Konzentration des Serum-Kreatinins von 20 und 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen

- Abb. 26 Graphische Darstellung der Urinanalyse hinsichtlich des ausgeschiedenen Proteins von 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen
- Abb. 27 Graphische Darstellung der Urinanalyse hinsichtlich des ausgeschiedenen Albumins von 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen
- Abb. 28 Graphische Darstellung der Urinanalyse hinsichtlich des ausgeschiedenen Kreatinins von 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-} (hellgrau) Mäusen
- Abb. 29 Coomassie- und Silber-gefärbte SDS-Gele
- Abb. 30 Mittlerer Blutdruck von 25 Wochen-alten WT und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Abb. 31 Glomeruläre Mesangialzellzahl über den Zeitraum von 5 bis 30 Wochen in WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Abb. 32 Beispielbilder für die verschiedenen glomerulären Entwicklungsstadien
- Abb. 33 Verteilung der vergebenen Scores in 5 und 10 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Abb. 34 Histochemischer Nachweis von PAS-positivem Material in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (schwarz) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen mit morphometrischer Auswertung der PAS-positiven glomerulären Fläche.
- Abb. 35 Histochemischer Nachweis von Kollagen in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (schwarz) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen mit morphometrischer Auswertung der Sirius Rot-positiven glomerulären Fläche
- Abb. 36 Histochemischer Nachweise argyrophiler Strukturen in 20 und 30 Wochen-alten WT- (schwarz) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen mit morphometrischer Auswertung der Silber-gefärbten glomerulären Fläche
- Abb. 37 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nierenpräparaten aus 20 und 30 Wochen-alten WT und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Abb. 38 Fluoreszenz-immunhistochemische Färbung gegen IgA
- Abb. 39 Fluoreszenz-immunhistochemische Färbung gegen IgM
- Abb. 40 Anteil der infiltrierenden Makrophagen pro Glomerulum in 5 bis 30 Wochen-alten WT-(dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen
- Abb. 41 Relative CXCL13 mRNA-Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen
- Abb. 42 Relative CXCR5 mRNA-Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen
- Abb. 43 Relative CCL28 mRNA-Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen
- Abb. 44 Relative CCR10 mRNA-Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- (dunkelgrau) und CCR7^{-/-}- (hellgrau) Mäusen
- Abb. 45 Western Blot-Analyse zur Induzierbarkeit von pTRE_CCL21a in HEK 293T-Zellen
- Abb. 46 Luciferase-Assay zu den mit pTRE Luci bzw. pTRE_CCL21a_Luci transfizieren HEK 293T-Zellen bzw. MMCs
- Abb. 47 Mikroskopie-Aufnahmen von kultivierten HEK 293T-Zellen und MMCs, 24 Stunden nach Transfektion mit p-EGFP-N1 bzw. p-CCL21a-EGFP-N1
- Abb. 48 Luciferase-Assay zu den pTRE CCL21a Luci und CCL21a-Teilsequenz-Luciferase-Konstrukten transfizieren HEK 293T-Zellen bzw. MMCs
- Abb. 49 Die mögliche Bedeutung von CCR7 und CCL21 für die Entwicklung des Mesangiums und die Aufrechterhaltung seiner Funktionsfähigkeit

5.4 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1 Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes
- Tabelle 2 Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes
- Tabelle 3 Verwendete Primer für die Klonierungen und die qPCRs
- Tabelle 4 Zusammensetzung der Trenngele entsprechend ihres Acrylamidanteils, sowie des Sammelgels
- Tabelle 5 Verwendete Antikörper für die IHC-Färbungen mit Beschreibung des durchgeföhrten *Antigen Retrievals*, der verwendeten Blockierungslösung und dem zur Detektion verwendeten konjugierten Enzym bzw. Fluoreszenzfarbstoff
- Tabelle 6 Verwendete Farbschattierungen, definiert durch die jeweiligen Rot-, Grün- und Blautöne, sowie dem entsprechenden *Sigma* zur morphometrischen Analyse der histochemischen Färbungen
- Tabelle 7 Verwendete Farbschattierungen, definiert durch die jeweiligen Rot-, Grün- und Blautöne, sowie dem entsprechenden *Sigma* zur Einzelzellanalyse der IHC-Färbung gegen PDGFR- β
- Tabelle 8 Inhaltsstoffe und Zusammensetzung der Kultur- und Kryomedien
- Tabelle 9 Transfektionsansatz für das Doxycyclin-abhängige System der Luciferase-Vektoren
- Tabelle 10 Transfektionsansatz für das Doxycyclin-unabhängige System der GFP-Vektoren
- Tabelle 11 Statistische Analyse bzgl. des Körpergewichts von 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 12 Statistische Analyse bzgl. der Ratio des Gewichts beider Nieren zum Gesamtkörpergewicht von 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 13 Statistische Analyse bzgl. der Ratio des Milzgewichts zum Gesamtkörpergewicht von 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 14 Statistische Analyse bzgl. der Ratio des Herzgewichts zum Gesamtkörpergewicht in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 15 Statistische Analyse bzgl. der Ratio des Lebergewichts zum Gesamtkörpergewicht in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 16 Statistische Analyse bzgl. des Serum-Gesamtproteins in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 17 Statistische Analyse bzgl. des Serum-Albumins in 20 und 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 18 Statistische Analyse bzgl. des Serum-Kreatinins in 20 und 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 19 Statistische Analyse bzgl. des Gesamtproteins in 24 Stunden-Sammelurin in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 20 Statistische Analyse bzgl. des Albumins in 24 Stunden-Sammelurin in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 21 Statistische Analyse bzgl. des Kreatinins in 24 Stunden-Sammelurin in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 22 Statistische Analyse bzgl. des glomerulären Mesangialzellanteils an der glomerulären Gesamtzellzahl in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 23 Statistische Analyse bzgl. des glomerulären Entwicklungsstandes in 5 und 10 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 24 Statistische Analyse bzgl. der glomerulären PAS-positiven Fläche in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen

- Tabelle 25 Statistische Analyse bzgl. der glomerulären Sirius Rot-positiven Fläche in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 26 Statistische Analyse bzgl. der glomerulären Silber-gefärbten Fläche in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäuse
- Tabelle 27 Statistische Analyse bzgl. der IgA-Ablagerungen in 20 und 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 28 Statistische Analyse bzgl. der IgM-Ablagerungen in 20 und 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 29 Statistische Analyse bzgl. des glomerulären Makrophageninfiltrats in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 30 Statistische Analyse bzgl. der renalen CXCL13 mRNA-Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 31 Mediane x-fache Veränderung der CXCL13 mRNA-Expression
- Tabelle 32 Statistische Analyse bzgl. der renalen CXCR5 mRNA-Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 33 Mediane x-fache Veränderung der CXCR5 mRNA-Expression
- Tabelle 34 Statistische Analyse bzgl. der renalen CCL28 mRNA Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 35 Mediane x-fache Veränderung der CCL28 mRNA-Expression
- Tabelle 36 Statistische Analyse bzgl. der renalen CCR10 mRNA Expression in 5 bis 30 Wochen-alten WT- und CCR7^{-/-}-Mäusen
- Tabelle 37 Mediane x-fache Veränderung der CCR10 mRNA-Expression

5.5 Danke

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, im Rahmen des SFB699 zu promovieren und mich mit dem äußerst vielseitigen Projekt zur Bedeutung der Chemokine in der Niere zu beschäftigen. Der Gedankenaustausch und seine vielfältigen Anregungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön geht an meinen ersten Mentor Prof. Dr. Bernhard Banas nicht nur dafür, dass ich dieses spannende Thema bearbeiten durfte und bei allen theoretischen und praktischen Fragen uneingeschränkt Unterstützung erhalten habe, sondern auch dafür, dass er mir so viel Vertrauen entgegenbringt und ich auch weiter in seiner Arbeitsgruppe tätig sein darf.

Vielen Dank auch an meinen zweiten Mentor Prof. Dr. Eberhard Schlatter für die freundliche Unterstützung und die hilfreichen Anregungen.

Eine Lösung für fast jedes größere Problem und ein offenes Ohr für alle kleineren Problemchen. Hier möchte ich mich ganz besonders bei Dr. Andreas Steege bedanken, der mich durch zahlreiche Diskussionen und Anregungen sowie die exzellente Betreuung und Hilfe (auch nach deinem Ausscheiden) immer unterstützt hat.

Vielen Dank auch an Dr. Miriam Banas für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Danke fürs Zuhören, die vielfältige Unterstützung und nicht zuletzt das Lesen meiner Arbeit.

Außerdem danke ich allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Inneren Medizin II und der Abteilung für Nephrologie, die mich herzlich aufgenommen haben. Danke auch für die angenehme Laboratmosphäre und die gute Zusammenarbeit und Unterstützung. Ein Extra-Dankeschön geht dabei an Kathrin Eidenschink, Brigitte Ruhland, Gabriela Pietrzyk und Dr. Martina Zimmermann.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie (auch der in spe!) und meinen Freunden danken. Durch euer Vertrauen, eure Hilfe und eure Geduld sowie der Tatsache, dass ihr einfach da wart, wenn ich euch gebraucht habe, habt ihr einen wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Lieber Robert, das Beste und Wichtigste immer zum Schluss! Vielen lieben Dank für dein Verständnis, deine Rücksicht, dein Interesse, deine Freundschaft und deine Liebe. Danke, dass du mit mir zusammen sowohl ein Studium als auch eine Doktorarbeit durchgestanden hast und ich auch immer auf deine Hilfe bauen konnte. Ohne dich wäre dies nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich 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.

Regensburg, Mai 2014

(Simone Wurm)