

1 Einleitung

Glomerulonephritiden gehören zu den häufigsten Ursachen terminaler Niereninsuffizienz weltweit. Der fortschreitende Verlust der Nierenfunktion ist eng mit einer gesteigerten Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine im Nierengewebe assoziiert. Diese findet sich sowohl bei akuter als auch bei chronischer Niereninsuffizienz und ist nahezu unabhängig davon, ob die Nierenschädigung durch primär arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder Glomerulonephritiden verursacht ist.

Das profibrotische Zytokin Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ist als ein Schlüsselmediator der renalen Matrixakkumulation und Fibrosierung identifiziert worden. Für eine Vielzahl von nicht-immunvermittelten, humanen und experimentellen Nierenerkrankungen ist eine Infiltration des Nierengewebes durch Makrophagen und Lymphozyten als Zeichen der Inflammation gezeigt worden. Während für Makrophagen als Effektoren der unspezifischen Immunantwort eine aktive Beteiligung an der Pathogenese und Progression auch von primär nicht-immunvermittelten Nierenerkrankungen nachgewiesen werden konnte, ist der Beitrag der das spezifische Immunsystem repräsentierenden Lymphozyten an diesem Prozess weitgehend unklar.

Wie auch andere experimentelle Nierenerkrankungen, sind die Modelle der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis und chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose durch eine Infiltration des Nierengewebes durch Lymphozyten und Makrophagen gekennzeichnet. Unklar ist, inwieweit Lymphozyten an der Pathogenese und Progression der Erkrankungen beteiligt sind. Als selektiver „Lymphozytenantagonist“ wurde der neue Immunmodulator FTY720 eingesetzt, um die Rolle von Lymphozyten auf die akute und chronische Anti-Thy1-induzierte renale Matrixexpansion zu untersuchen. Dieses Medikament verhindert über agonistische Wirkungen an Spingosin-1-Phosphat-Rezeptoren, dass Lymphozyten aus den lymphatischen Organen auswandern und zirkulieren.

In dieser Arbeit sollen die folgenden Fragen überprüft werden:

1. Spielen Lymphozyten eine Rolle während der Schädigungsphase und Matrixexpansionsphase der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis?
2. Haben Lymphozyten einen Anteil an der Progression der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose?
3. Bewirkt die Gabe des selektiven Lymphozyteninhibitors FTY720 antifibrotische Effekte an den Tiermodellen der akuten Anti-Thy1 Glomerulonephritis und der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose?

1.1 Epidemiologie chronischer Niereninsuffizienz

In den letzten Jahrzehnten nahmen Prävalenz und Inzidenz der chronischen Niereninsuffizienz in Westeuropa und den USA kontinuierlich zu. Nach den Zahlen des United States Renal Data Systems betrug die Inzidenz terminaler Niereninsuffizienz 1992 in den USA noch 60477 Patienten pro Jahr. Bereits 2002 lag sie bei 100359 (dies entspricht einer Steigerung um 66%). Die Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz im Jahr 2002 lag in den USA bei 470281 Patienten [1].

Die Inzidenz einer terminalen Niereninsuffizienz aufgrund eines Diabetes mellitus lag bei 45%, aufgrund einer arteriellen Hypertonie bei 27% und aufgrund von Glomerulonephritiden bei 9%. Als weitere Ursachen terminaler Niereninsuffizienz wurden zystische Nierenerkrankungen (3%), sekundäre Vaskulitiden (2%) und Neoplasien (2%) genannt.

Vergleichbare Inzidenzen wurden für die Bundesrepublik Deutschland berichtet. Nach dem Report der Qualitäts-Sicherung Niere (QuaSi-Niere GmbH) von 2003/2004 erhielten zum Stichtag des 31.12.2003 58579 Patienten eine Dialysebehandlung, während 19702 Patienten mit einem funktionierenden Nierentransplantat lebten [2]. Die Inzidenz terminaler Niereninsuffizienz bei diabetischer Nephropathie stieg von 27% im Jahr 1995 auf 36% im Jahr 2003. Bei der hypertensiven Nephropathie erhöhte sich die Inzidenz von 11% (1995) auf 20% (2003).

1.2 Nierenfibrose als Folge überschießender Gewebsreparatur

Chronisch progressive Nierenerkrankungen sind histologisch durch eine Hyalinisierung der Glomeruli, eine vermehrte Ansammlung extrazellulärer Matrixproteine im Interstitium und eine Atrophie der Tubuli gekennzeichnet. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer fortschreitenden Nierenfibrose, welche durch eine zunehmende Nierenfunktionseinschränkung gekennzeichnet ist [3]. Die fortschreitende Expansion extrazellulärer Matrix findet sich als uniforme Gewebsantwort auf eine Vielzahl verschiedener Schädigungsreize wie erhöhten Blutdruck, Hyperglykämie oder inflammatorische Reaktionen. Der Grad der Schädigung hängt hierbei von der Häufigkeit, der Dauer und der Schwere des Schädigungsreizes ab, wobei sich ähnliche Gewebsantworten bei einer Vielzahl chronisch-progressiver Erkrankungen wie zum Beispiel der Lungenfibrose, der Leberzirrhose und Myokardfibrose finden. Auch bei diesen Erkrankungen geht die zunehmende Fibrosierung des Organs mit einem Funktionsverlust einher.

Unter physiologischen Bedingungen handelt es sich bei der Matrixakkumulation um einen Reparaturversuch des Gewebes im Rahmen der Wundheilung, mit dem Ziel der Normalisierung der Organfunktion. Der Reparaturprozess ist auf den Ort der Schädigung begrenzt, es herrscht ein Gleichgewicht zwischen Matrixakkumulation und Matrixdegradation. Erst unter pathologischen Bedingungen, wie bei chronischen Glomerulonephritiden, ist dieses Gleichgewicht gestört. Der ständige Schädigungsreiz führt zu anhaltenden Versuchen der Gewebsreparatur mit einer inadäquat gesteigerten Matrixakkumulation und einem reduzierten Matrixabbau.

1.3 Histologie und molekulare Mechanismen der Matrixakkumulation

Die Funktionsverschlechterung bei chronischen Nierenerkrankungen geht auf histologischer Ebene mit einer zunehmenden Vermehrung des Bindegewebes bzw. einer Nierenfibrose einher [4]. Der Grad der Fibrosierung korreliert eng mit dem Grad der Einschränkung der Nierenfunktion [5]. Auf molekularer Ebene liegt dem Prozess der Nierenfibrose eine Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen zugrunde. Diese Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine resultiert aus den folgenden drei Einzelkomponenten [4]:

1. einer vermehrten Produktion von Matrixproteinen (z.B. Fibronectin, Proteoglykane, Kollagen I, III, IV, Laminin, Vitronectin, Tenascin, Heparansulfat)
2. einem verminderten Abbau extrazellulärer Matrix durch verminderte Proteasenbildung (z.B. Metalloproteinasen wie MMP-1, Kollagenase I, Gelatinase A, Gelatinase B, Elastase, Serinprotease) und
3. einer Überexpression von Matrix-bindenden Rezeptoren (z.B. Integrine vom Typ $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin = Fibronectinrezeptor, $\alpha 1 \beta 1$ -Integrin = Kollagen- und Lamininrezeptor).

1.4 Transforming Growth Factor- β als Schlüsselmediator der Matrixakkumulation

Das Zytokin Transforming Growth Factor- β (TGF- β) nimmt bei der Organfibrosierung eine zentrale Rolle ein. Die große Bedeutung von TGF- β wurde zuerst am Modell der experimentellen Anti-Thy1-Glomerulonephritis beschrieben, konnte jedoch in den letzten Jahren bei einer Vielzahl von fibrotischen Organveränderungen (Lungen-, Leber-, Knochenmark-, Haut- und Myokardfibrose) beobachtet werden [4]. Das lässt darauf schließen, dass die Fibrosierung eines Organs oder Gewebes nicht organspezifisch, sondern ein gemeinsamer Prozess aller

fibrotischen Organ- und Gewebeumbauten ist. Daraus ergibt sich der Vorteil der universellen Anwendbarkeit einer sich bereits einmal als wirksam erwiesenen antifibrotischen Therapie.

Die Schlüsselrolle des Zytokins TGF- β bei der Expansion renaler Matrix ergibt sich aus der Beeinflussung der drei molekularen Mechanismen der renalen Matrixexpansion. So führt die Überexpression von TGF- β zu einer vermehrter Produktion und einem verminderten Abbau renaler Matrix, sowie zu einer vermehrten Produktion vernetzender Proteine. Im Einzelnen konnte nachgewiesen werden, dass TGF- β die Expression von Kollagen, Fibronectin und Proteoglykanen induziert, die Synthese von matrixdegradierenden Proteinase direkt oder indirekt über die vermehrte Synthese von Proteinaseinhibitoren (Plasminogen Aktivator Inhibitor-1, PAI-1) inhibiert und die Expression verschiedener Integrine steigert. Dies lässt den Schluss zu, dass die Höhe der TGF- β -Konzentration direkt mit dem Ausmaß der Fibrosierung korreliert. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Tiermodellen der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis und der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose stellt somit die TGF- β -Expression einen wichtigen Parameter in der Beurteilung der renalen Matrixexpansion dar.

1.5 Therapeutische Strategien bei Nierenfibrose

Die fibrotische Umwandlung der Nieren ist der gemeinsame Endpunkt einer Vielzahl von Nierenerkrankungen. Dieser Endpunkt lässt sich trotz Behandlung der Grunderkrankung beispielsweise im Sinne einer immunsuppressiven Therapie bei Glomerulonephritiden, antihypertensiven Therapie bei hypertensiver Nephropathie oder Blutzuckereinstellung bei diabetischer Nephropathie, meist nur verzögern, nicht vollständig aufhalten.

Die Angiotensin-II-Blockade gilt derzeit als einzige klinisch verfügbare Option einer antifibrotischen Therapie bei Nierenerkrankungen. Für Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors (ACEIs) konnte in Tierexperimenten und großen klinischen Studien die Wirksamkeit bei diabetischer Nephropathie und nichtdiabetischen Nierenerkrankungen gezeigt werden. Für Angiotensin-II-Receptor-Blocker (ATRB) existieren Wirksamkeitsnachweise in Form großer klinischer Untersuchungen bei Typ 2 Diabetikern [6, 7]. Dabei erreichen beide Medikamente jedoch ebenfalls nur eine Verlangsamung der Progression chronischer Nierenerkrankungen. Stoppen können sie diese nicht. Tierexperimentelle Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Harm Peters [8] zeigen, dass auch eine Kombination maximal antifibrotisch wirksamer Einzeldosen des ACEI Enalapril und des ATRB Losartan zu keiner additiven Wirkung auf die Reduktion extrazellulärer Matrixexpansion bei der experimentellen Anti-Thy1-Glomerulonephritis führt, obwohl die maximal verwendeten Einzeldosen über den allgemein verwendeten blutdruckwirksamen Dosen lagen.

Neben der Angiotensin-II-Blockade gilt die Eiweißrestriktion (0,6-0,8 g/kg Körpergewicht/Tag) als zweite wichtige Säule in der Therapie chronischer Nierenerkrankungen. In Kombination mit der Angiotensin-II-Blockade wurden ebenfalls am Tiermodell der Anti-Thy1-Glomerulonephritis additive antifibrotische Effekte beobachtet [9]. Für humane Nierenerkrankungen gibt es derzeit keinen Beweis für eine Wirksamkeit der Eiweißrestriktion.

1.6 Makrophagen und Lymphozyten bei Nierenerkrankungen

Für Makrophagen, als Vertreter der primär unspezifischen Immunantwort, konnte eine aktive Rolle bei der Pathogenese von humanen und experimentellen Nierenerkrankungen nachgewiesen werden. Eine direkte Schädigung renaler Zellen durch Makrophagen erfolgt beispielsweise über die Freisetzung von freien Radikalen, NO, Komplementfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen. Aber auch durch die Stimulation der Expression von Metalloproteinasen, vasoaktiven Peptiden und profibrotischen Zytokinen (TGF- β), welche dann zu einer Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten führen, begünstigen Makrophagen die renalen Umbauvorgänge in Richtung Nierenfibrose [10, 11].

Im Gegensatz zur Rolle der Makrophagen gibt es nur wenige Informationen über eine aktive Rolle von Lymphozyten als Vertreter der spezifischen Immunantwort bei den eher unspezifischen Inflammationsvorgängen chronischer Nierenerkrankungen. In bisher veröffentlichten Publikationen wird zwar das Vorhandensein von Lymphozyten bei nicht immunvermittelten, experimentellen Nierenerkrankungen wie akuter und chronischer Ischämie [12, 13], hypertensiver Nephropathie [14, 15], diabetischer Nephropathie [16, 17] und polyzystischer Nierenerkrankung [18, 19] beschrieben, eine direkte Beteiligung an den renalen Umbauvorgängen akuter und chronischer Nierenerkrankungen konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

Es stellt sich außerdem die Frage, ob eine Aktivierung von Lymphozyten über Mechanismen der spezifischen Immunantwort oder über antigen-unabhängige Wege vermittelt wird. In der Literatur finden sich Hinweise für das Auftreten beider Mechanismen.

So konnten Truong et al [13] an den Tubuli chronisch ischämischer Nieren zeigen, dass es hier zu einer veränderten endogenen Antigenpräsentation kommen kann. Es wurden der Verlust verschiedener Zellmembranproteine und eine vermehrte Expression der normalerweise nur embryonal exprimierten Zytoskelettfilamente Vimentin und Keratin beobachtet. Auch das Auftreten von Hitzeschockproteinen in der Frühphase von Nierenschädigungen ist eine wichtige Beobachtung zur Erklärung spezifischer Immunabwehr bei chronischen Nierenerkrankungen,

da diese für den Transport und die Zusammensetzung von Molekülen verantwortlich sind, welche dann über den T-Zell-Rezeptor von Lymphozyten erkannt werden können [20-22].

Lymphozyten können vermutlich auch über antigen-unabhängige Wege aktiviert werden. Hinweise hierfür ergeben sich aus der Beobachtung, dass bei chronischer Hepatitis C und Multipler Sklerose zwar eine große Zahl infiltrierender Lymphozyten vorhanden ist, von diesen Lymphozyten jedoch nur ein geringer Anteil spezifisch für Hepatitis C-Proteine bzw. Antigene des Zentralen Nervensystems ist [10].

Doch auch trotz dieser indirekten Hinweise auf eine mögliche Aktivierung von Lymphozyten, bleibt deren Beitrag zur Matrixakkumulation und Progression akuter und chronischer Nierenerkrankungen unklar. So existieren bislang keine Interventionsstudien, die durch das gezielte Ausschalten von Lymphozyten deren pathophysiologische Rolle bei renalen Erkrankungen untersucht haben.

1.7 Lymphozytenmodulator FTY720

Ein neues wissenschaftliches Werkzeug zur Untersuchung des Einflusses von Lymphozyten auf experimentelle akute und chronische Nierenerkrankungen stellt der Immunmodulator FTY720 dar. Dieser Wirkstoff wurde erstmals 1992 durch chemische Umwandlung des Metaboliten Myriocin des Askomyceten *Isaria sinclaria* synthetisiert. Nach Phosphorylierung in vivo ist FTY720 als Agonist am G-Protein-gekoppelten Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor von Lymphozyten in der Lage, die Rezirkulation von sich in Lymphknoten und Peyer Plaques befindenden Lymphozyten zu peripheren inflammatorisch veränderten Geweben zu verhindern [23]. Die Zahl der Lymphozyten im peripheren Blut wird hierdurch um mehr als 90% verringert, ohne jedoch die Lymphozytenfunktion zu beeinflussen.

In den letzten Jahren konnte die Effektivität und Spezifität von FTY720 in einer Vielzahl von Transplantationsmodellen, aber auch Modellen zu Autoimmunerkrankungen und Tumorerkrankungen nachgewiesen werden [24, 25]. Außerdem konnte die Effektivität von FTY720 in klinischen Studien der Phase II bei de novo nierentransplantierten Patienten gezeigt werden und wird derzeit in klinischen Studien der Phase III untersucht.

1.8 Modell der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis und chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose

Das Modell der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis der Ratte ist ein etabliertes Modell zur Induktion einer kurz andauernden Glomerulonephritis [26] durch die einmalige Injektion des

Antikörpers OX-7, welcher gegen das Thy1-Epitop gerichtet ist. Dieses Epitop ist bei der Ratte ausschließlich auf Mesangialzellen zu finden, so dass es nach der Injektion zu einer selektiven Mesangialzelllyse kommt. Die gesamte glomeruläre Reaktion gleicht den Erscheinungen einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis beim Menschen. Der Ablauf der Erkrankung ist durch das relativ uniforme Auftreten dreier Stadien gekennzeichnet:

1. In der sogenannten Schädigungsphase kommt es ca. 6 bis 18 Stunden nach Antikörperinjektion zur maximalen Ausprägung einer komplementvermittelten Lyse der Mesangialzellen.
2. Ab Tag 5 bis Tag 12 nach Antikörperinjektion ist die Phase der Matrixexpansion durch eine Mesangialzellproliferation und überschießende Matrixbildung gekennzeichnet.
3. In der Regenerationsphase Tag 12 bis 5 Wochen nach Antikörperinjektion kommt es zu einer Rückbildung der glomerulären Veränderungen im Sinne einer Ausheilung.

Im Gegensatz dazu beobachtet man bei dem von Kawachi et al entwickelten Modell der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose [27] zwar ebenfalls Phasen der Schädigung und Matrixexpansion, doch heilt die Krankheit bei diesem Modell nicht aus, sondern schreitet aufgrund von primär nicht-immunvermittelten Mechanismen selbstständig in Richtung Glomerulosklerose, tubulointerstitielle Fibrose und Niereninsuffizienz fort. Ab Woche 20 verstirbt ein Großteil der Tiere an den Folgen eines urämischen Nierenversagens.

Die chronische Anti-Thy1-Glomerulosklerose wird bei uninephrektomierten Ratten durch die einmalige Injektion des Anti-Thy1-Antikörpers MoAb 1-22-3 induziert. Im Gegensatz zur diabetischen und hypertensiven Nephropathie bei denen ständig neue Schädigungsreize zu einer Progression der Niereninsuffizienz führen, kommt es bei diesem Tiermodell zu keinen weiteren Schädigungsreizen. Somit lassen sich hier die rein intrarenalen Ursachen und Mechanismen untersuchen.

1.9 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Lymphozyten für die akute und chronisch-progressive Matrixexpansion bei experimenteller Glomerulonephritis/Glomerulosklerose zu untersuchen. Am Modell der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis und der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose der Ratte wurde zudem das therapeutische Potential des Lymphozytenmodulators FTY720 evaluiert.

Für diese Studie wurden die folgenden 3 Versuchsansätze und Fragen formuliert:

1. Welche Wirkung hat die FTY720-vermittelte Lymphozyteninhibition auf die kurzzeitige, NO-vermittelte Nierenschädigung bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Tag 1 nach Antikörperinjektion)? In diesem Protokoll wurde FTY720 bei Ratten mit Anti-Thy1-Glomerulonephritis 5 Tage vor der Injektion des Anti-Thy1-Antikörpers gegeben (**Protokoll 1, Vorbehandlung**). Die Nierenschädigung wurde anhand der Zahl lysierter Mesangialzellen bestimmt.
2. Welche Wirkung hat die FTY720-vermittelte Lymphozyteninhibition auf die Phase der nachfolgenden Matrixexpansion der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Tag 7 nach Antikörperinjektion)? In diesem Protokoll wurde FTY720 während der Matrixexpansionsphase der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis gegeben. Die FTY720-Gabe wurde 24 Stunden nach Injektion des Anti-Thy1-Antikörpers (**Protokoll 2, Nachbehandlung**) und damit nach abgelaufener Mesangialzellschädigung begonnen. Es sollte die Frage untersucht werden, ob die FTY720-vermittelte Lymphozyteninhibition zu einer Abnahme der renalen Matrixexpansion führt. Und wenn ja, ob die antifibrotische Wirkung mit einer verminderten Expression des profibrotischen Zytokins TGF- β einhergeht.
3. Welche Wirkung hat die FTY720-vermittelte Lymphozyteninhibition auf die Progression der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose (Woche 20 nach Krankheitsinduktion)? In diesem Versuchsaufbau wurde FTY720 den Tieren für 20 Wochen nach Induktion einer chronisch-progressiven Glomerulosklerose gegeben. Zur Induktion der Erkrankung wurden Ratten uninephrektomiert und erhielten eine einmalige Injektion des Anti-Thy1-Antikörpers MoAb 1-22-3. Die FTY720-Gabe wurde erst 7 Tage nach Injektion des Anti-Thy1-Antikörpers begonnen, um eine vollständige Ausbildung der glomerulären Schädigung zu begünstigen (**Protokoll 3, Progression**). Untersucht wurde die Frage, ob die Lymphozyteninhibition im peripheren Blut mit einer Verminderung der Lymphozytenzahl in der Niere einhergeht und ob die FTY720-bedingte

Lymphozyteninhibition zu einer Verminderung der renalen Matrixexpansion führt. Wenn ja, gibt es Unterschiede in der renalen Matrixexpansion zwischen Glomeruli und Tubulointerstitium und geht die Lymphozyteninhibition mit Veränderungen der Nierenfunktion einher?