

Aus dem Institut für Vegetative Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Expression des antiinflammatorischen
Proteins Annexin A1 in der Niere

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frank-Stephan Hohberger

aus Aachen

Datum der Promotion: 10.03.2017

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	4
Abstract	6
1. Einleitung.....	8
1.1 Entzündliche Nierenerkrankungen	8
1.2 Das renale Interstitium	9
1.3 Annexin A1	13
2 Zielsetzung	17
3 Material und Methoden	19
3.1 Versuchstiere	19
3.1.1 Anti-Thy-1 Nephritis	20
3.1.2 Doppelt transgene Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR)	21
3.2 Perfusionsfixierung.....	22
3.3 PAS-Färbung.....	23
3.4 Immunfluoreszenz und Immunhistochemie	24
3.5 TaqMan Real-Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	27
3.5.1 RNA- und cDNA-Präparation	27
3.5.2 Quantitative TaqMan RT-PCR	28
3.6 In-situ-Hybridisierung	29
3.7 Präsentation der Daten und statistische Verfahren	32
4 Ergebnisse.....	34
4.1 Lokalisation von Annexin A1 in Kontrolltieren	34

4.2 Identifizierung der Annexin A1-exprimierenden Zellen in Kontrolltieren	35
4.2.1 CD73.....	35
4.2.2 MHC II und ED1	36
4.2.3 RECA	38
4.3 Anti-Thy-1 Nephritis.....	39
4.3.1 Veränderung der Proteinurie im Verlauf der Nephritis.....	40
4.3.2 Glomeruläre Ablagerung des THY1-Antikörpers im Verlauf der Nephritis.....	40
4.3.3 Morphologische Veränderungen im Verlauf der Nephritis.....	41
4.3.4 Makrophagen im Verlauf der Nephritis.....	43
4.3.5 Annexin A1-Expression im Verlauf der Nephritis	45
4.3.6 Annexin A1-Expression in Makrophagen im Verlauf der Nephritis	50
4.4 chronisch fibrosierende Nierenerkrankung	54
4.4.1 Kollagen 1a2 in doppelt transgenen Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR)	54
4.4.2 Expression von Annexin A1 in doppelt transgenen Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR).....	54
4.4.3 Annexin A1-Expression in Fibroblasten in doppelt transgenen Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR).....	55
5 Diskussion	58
5.1 Annexin A1-Expression in der gesunden Niere	58
5.2 Annexin A1 im akuten Nephritismodell.....	60
5.4 Annexin A1 im Modell einer chronischen Nierenerkrankung	69
Literaturverzeichnis	73

Eidesstattliche Versicherung	87
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	88
Tabellarischer Lebenslauf.....	89
Danksagung	91

Abstrakt

Persistierende Entzündungsreaktionen sowie die Akkumulation von fibrotischem Narbengewebe gelten als typische histopathologische Merkmale bei chronischen Nierenerkrankungen. Das antifibrotische, antiinflammatorische und *Resolution*-fördernde Protein Annexin A1 wird in der Niere kräftig exprimiert. Die Funktion und Regulation von Annexin A1 während der Entwicklung chronischer Nierenerkrankungen wurden jedoch bisher nicht systematisch untersucht.

Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der renalen Annexin A1-Expression in der gesunden Niere sowie bei akuten und chronischen Nierenerkrankungen. Hierzu wurden die akute anti-Thy-1 Nephritis als inflammatorisches und transgene Ratten mit einer Überexpression von humanem Renin und humanem Angiotensinogen (dTGR) als chronisch fibrotisches Tiermodell gewählt.

Die morphologische Analyse der renalen Parenchymschädigung erfolgte anhand von PAS-gefärbten Gewebeschnitten. Annexin A1-exprimierende Zellen im renalen Interstitium wurden durch immunhistochemische Doppelmarkierungen für Annexin A1 und etablierten Markern für die interstitiellen Zellen identifiziert. In den Tieren mit der anti-Thy-1 Nephritis erfolgte zudem die Bestimmung der Annexin A1-mRNA mittels quantitativer TaqMan Real-Time Polymerase Kettenreaktion. In den dTGR erfolgte eine Lokalisation Kollagen 1-exprimierender Fibroblasten mittels mRNA in-situ-Hybridisierungen.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten eine kräftige Annexin A1-Expression im gesunden renalen Tubulointerstitium. Diese wurde zum größten Teil von Fibroblasten und Makrophagen getragen. Endothelzellen der größeren Gefäße wiesen ebenfalls eine starke Annexin A1-Expression auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Endothelzellen von Arteriolen, Kapillaren und venösen Gefäße kein Annexin A1-Signal.

Im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis fand sich initial eine rapide Mesangiolyse und tubulointerstitielle Inflammation, gefolgt von reparativen Prozessen und einer Rückbildung der Entzündungsreaktion (*Resolution*). Parallel fand sich ein rapider Anstieg der Expression von Annexin A1-mRNA und von Annexin A1-immunreaktiven Zellen im Interstitium der kranken Tiere. Lokalisationsstudien an Tag 5 und an Tag 15

nach Induktion der Nephritis zeigten eine zunehmende Anzahl Annexin A1-exprimierender interstitiellen Makrophagen. Hiermit konnte erstmalig demonstriert werden, dass interstitielle Makrophagen einen quantitativ relevanten Beitrag zur gesteigerten Annexin A1-Expression in der Ausheilungsphase einer renalen Inflammation leisten.

Auch in den dTGR konnte eine Zunahme der interstitiellen Annexin A1-Expression nachgewiesen werden. Die Zunahme dieser Expression wurde hier primär durch *alpha smooth muscle actin*-negative, ruhende Fibroblasten getragen. *Alpha smooth muscle actin*-positive Myofibroblasten hingegen zeigten keine Annexin A1-Expression. Die gesteigerte Annexin A1-Expression im Rahmen einer chronischen fibrotischen Nierenerkrankung geht somit am ehesten von ruhenden Fibroblasten aus.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass die Expression von Annexin A1 im renalen Interstitium bei Nierenerkrankungen mit unterschiedlicher Genese stimuliert wird. Hierzu tragen Makrophagen und Fibroblasten maßgeblich bei. Diese Ergebnisse stellen eine Basis für die Erforschung neuer antiinflammatorischer sowie Resolutions-fördernder Therapien bei der Behandlung von Nierenerkrankungen dar.

Abstract

Unresolved inflammation and accumulation of fibrotic scar tissue present major causes for the development of renal failure throughout the world. The intrinsic anti-fibrotic, anti-inflammatory and resolution-promoting protein Annexin A1 is abundantly expressed in the kidney but its role during the development of renal disease has not been elucidated.

Aim of this study was to investigate the renal expression of Annexin A1 in animal models for acute and chronic kidney diseases. Anti-Thy-1 nephritic rats and hypertensive rats with an ubiquitous overexpression of the human genes for renin and angiotensinogen (dTGR) were used as animal models for inflammatory and fibrotic kidney disease, respectively.

Morphological studies were performed using PAS-stained kidney sections. Localization studies were performed using double-labeling immunofluorescence for Annexin A1 and established markers for renal interstitial cells. In animals with anti-Thy-1 nephritis Annexin A1 mRNA abundance was determined by TaqMan real-time polymerase chain reaction. mRNA in-situ-hybridisation was used to investigate the expression of collagen 1 in dTGR.

The results of this study demonstrated abundant expression of Annexin A1 in the interstitium of the healthy rodent kidney. Fibroblasts and macrophages were the principal Annexin A1 expressing cells at this site. Endothelial cells of the larger arterial vessels stained positive for Annexin A1, whereas those of the renal microvasculature and veins did not.

Animals with anti-Thy-1 nephritis displayed rapid mesangiolytic and tubulointerstitial inflammation followed by reparative processes. mRNA for Annexin A1 and the number of macrophages were increased in the course of the nephritis. Increased Annexin A1 expression was detected in macrophages at d5 and, more pronounced, at d15. This study thus showed for the first time that macrophages significantly contribute to the increased abundance of Annexin A1 during the resolution phase of nephritic disease.

An increased interstitial abundance for Annexin A1 protein was also detected in the kidneys of dTGR. Here, Annexin A1 signal was primarily localized to alpha smooth

muscle actin negative dormant fibroblasts whereas alpha smooth muscle actin positive myofibroblasts did not express Annexin A1. These findings indicate that the increased expression of Annexin A1 in renal fibrosis is attributable to the renal fibroblasts.

The results of this study allow the conclusion that the expression of Annexin A1 is stimulated during the course of kidney disease. In this context macrophages and fibroblasts play a major role. This knowledge will serve as a foundation for the investigation of novel anti-inflammatory and pro-resolving pathways during renal diseases.

1. Einleitung

1.1 Entzündliche Nierenerkrankungen

Entzündliche Nierenerkrankungen (Nephritiden) bilden nach der diabetischen Nephropathie die häufigste Ursache für die Entwicklung chronischer Nierenschäden (Vinen 2003). So konnte in epidemiologischen Studien gezeigt werden, dass Nephritiden bei über 30% der Dialysepatienten in Deutschland für die Ausbildung der terminalen Niereninsuffizienz verantwortlich sind (Frei 2008). Zusätzlich weisen neuere Daten darauf hin, dass Entzündungsvorgänge auch bei der Pathogenese der diabetischen und hypertensiven Nephropathie eine Schlüsselrolle zur Entwicklung und Progredienz der Nierenschäden einnehmen (Navarro-González 2011). Inflammatorische Prozesse spielen damit bei der Mehrzahl der Nierenerkrankungen eine entscheidende Rolle. Entsprechend des pathomorphologischen Befundes werden dabei Erkrankungen mit einer bevorzugt glomerulären Beeinträchtigung (Glomerulonephritiden) von Erkrankungen mit einer hauptsächlich interstitiellen Beteiligung (interstitielle Nephritis) unterschieden. Eine Beteiligung des Tubulointerstitium ist hierbei bei allen zu verzeichnen (Böcker 2004).

Das möglichst umfassende Verständnis über den Aufbau der gesunden Nieren und die Veränderungen sowie Pathomechanismen der inflammatorischen Nierenerkrankungen ist die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Aktuell werden u. a. die Einstellung auf normotone Blutdruckwerte und spezielle Diäten auf der einen sowie immunsupprimierende Therapien auf der anderen Seite zur weiteren Verhinderung der Progression von Nephritiden durchgeführt (Fassett 2010). Mittels neuer Therapien könnte in Zukunft möglicherweise die Progredienz entzündlicher Nierenerkrankungen effektiver verhindert und somit die Zahl der terminalen Insuffizienzen verringert werden. Dies gewinnt besonders im Hinblick darauf an Bedeutung, dass die Nachfrage für Spendernieren, bei gleichzeitig sinkendem Angebot, in den letzten Jahren deutlich gestiegen ist (Klinger 2007, Siegmund-Schultze 2014).

1.2 Das renale Interstitium

Im gesunden Zustand stellt das renale Interstitium mit 4-9% der gesamten Nierenmasse nur einen geringen Anteil des Nierenparenchyms dar (Kaissling 1996). Die Organisation des Interstitiums hat zum Ziel, dass die Diffusionsstrecke zwischen den Tubulusepithelien und den Blutgefäßen minimal bleibt und damit eine effiziente Nährstoffversorgung sowie ein schneller Abtransport von reabsorbierten Soluten gewährleistet wird (Lemley 1991). Die Zelltypen des Interstitiums sind Fibroblasten, dendritische Zellen und Endothelzellen. Makrophagen und Lymphozyten kommen nur in geringem Ausmaß vor (Kaissling 1996, 2008, Meran 2011, Grgic 2012).

Den quantitativ wichtigsten Anteil der interstitiellen Zellen stellen die Fibroblasten dar. Diese bilden das Gerüst der Niere und regulieren den Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix (Kaissling 2008, Meran 2011). Sie befinden sich in enger räumlicher Nachbarschaft zu den Tubuluszellen und den anderen Zellen des Interstitiums. Durch ihre enge Lagebeziehung und ihre Bedeutung für die Funktion von Endothelzellen werden Fibroblasten von einigen Autoren auch als Perizyten der Kapillaren im kortikalen Interstitium bezeichnet. (Fligny 2013). Zudem produzieren sie das Enzym ecto-5'-Nukleotidase (CD73), über das sie die Bildung von Adenosin regulieren. Im Rahmen immunhistochemischer Untersuchungen wird CD73 als Markerprotein für interstitielle Fibroblasten verwendet (Kaissling 2008).

In enger Nachbarschaft zu den Fibroblasten befinden sich dendritische Zellen. Sie übernehmen die Funktion der Antigenpräsentation und spielen eine wichtige Rolle für die Immunreaktion (Ferenbach 2007). Als Antwort auf einen inflammatorischen Stimulus verlassen dendritische Zellen das Nierenparenchym und migrieren in die renalen Lymphknoten (Banchereau 1998). Als antigenpräsentierende Zellen exprimieren dendritische Zellen große Mengen an *Major histocompatibility complex II* (MHC II), welcher daher als Markersubstanz für diese verwendet wird (Kaissling 2008).

Peritubuläre Endothelzellen bilden den dritten quantitativ relevanten Zelltyp im renalen Parenchym. Sie kleiden die interstitiellen Kapillaren aus und sind sowohl für die Versorgung der Tubulusepithelien als auch für den Abtransport resorbierter Soluten verantwortlich (de la Paz 2009). Eine zentrale Rolle kommt den Endothelzellen zudem in der Modulation und Beeinflussung des Ablaufs von Entzündungsreaktionen zu, da

immunologisch aktive Zellen wie z.B. Makrophagen, Lymphozyten oder dendritische Zellen erst mittels Transmigration durch den Endothelzellverband hindurch in das Gewebe einwandern müssen (Ringseis 2010). Endothelzellen in Ratten exprimieren das Oberflächenantigen *Rat endothelial cell antigen 1* (RECA), welches zur immunhistochemischen Identifizierung der Zellen genutzt wird (Duijvestijn 1992, Ulger 2002).

Eine Entzündungsreaktion im Rahmen einer akuten Nephritis ist durch das schnelle Auftreten einer vitalen Reaktion des renalen Gewebes gekennzeichnet, die neben dem direkt geschädigten Gewebe auch angrenzende Parenchymanteile und das Gefäßsystem betrifft (Böcker 2004). Diese erste Reaktion auf eine Noxe wird als Initiationsphase einer Inflammation beschrieben (Anders 2003). Es folgt die Phase der Amplifikation/Progression (Anders 2003). Hier kommt es durch eine lokale Aktivierung von Endothelzellen durch vasoaktive Entzündungsmediatoren zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität. Dies führt einerseits zu einem Ausstrom von Flüssigkeit und in Folge dessen zu einem interstitiellen Ödem, andererseits wird hierdurch die Infiltration von mononukleären Zellen begünstigt (Anders 2003, Böcker 2004, Kaissling 2008). Das histologische Bild ist daher vor allem durch das vermehrte Vorkommen von inflammatorischen Zellen wie Makrophagen, Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten im Nierenparenchym gekennzeichnet (Kaissling 2008, Meran 2011, Grgic 2012). Durch diese Infiltrate kommt es zu einer Volumenzunahme des Interstitiums und zu einer Verlängerung der Diffusionsstrecke zwischen den Blutgefäßen und den Tubulusepithelzellen (Lemley 1991).

Zudem werden durch die mononukleären Zellen proinflammatorische Mediatoren gebildet. Hierzu zählen zum einen die Prostaglandine, welche mit Hilfe der Phospholipase A2 sowie der induzierbaren Cyclooxygenase 2 produziert werden (Lim 2007). Des Weiteren tragen auch Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) sowie profibrotische Mediatoren wie *Transforming-growth-factor beta* (TGF- β) zur weiteren Progression der Nierenerkrankungen bei (Lim 2007, Mariotto 2007, Damazo 2011).

Im Idealfall kommt es als Erfolg der Entzündungsreaktion zu einer Entfernung der Noxe und im Anschluss zu einer Rückbildung der Entzündungsreaktion (*Resolution* = Rückbildung einer Entzündungsreaktion). Während der *Resolution* werden reparative

Prozesse aktiv, welche zu einer partiellen oder vollständigen Wiederherstellung der Integrität des betroffenen Gewebes führen (Böcker 2004). Die Mechanismen der *Resolution* sind schon frühzeitig im Verlauf einer Inflammation nachzuweisen. Durch Apoptose geschädigter Zellen und das Abräumen von Zellfragmenten sowie Bindegewebe wird die Grundlage für den Ersatz der zerstörten Strukturen und einer Proliferation gesunder Zellen gelegt (Böcker 2004, Scannell 2006). Des Weiteren kommt es zu einem Rückgang von proinflammatorischen Mediatoren, wie TNF- α , und einer Zunahme von antiinflammatorischen Mediatoren wie Interleukin 10, Lipoxin A4 und Resolvin D1 (Parente 2004, Scannell 2006, Ferenbach 2007).

Im Rahmen der *Resolution* spielen Makrophagen eine entscheidende Rolle. Im Gesunden kommen Makrophagen in der Niere in geringer Zahl im perivaskulären Bindegewebe sowie in der Nähe der Nierenkapsel und des Kelchsystems vor (Kaissling 1996). Diese residenten Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der interstitiellen Homöostase durch die Produktion von Arachidonsäurederivaten, Eliminierung von Pathogenen, sowie Phagozytose von zellulärem Abfall (Hume 1983, Kaissling 1996, Sean Eardley 2005). Im Rahmen einer Entzündungsreaktion kommt es zu einem erheblichen Einstrom weiterer monozytärer Zellen in das Niereninterstitium, welche dort zu Makrophagen differenzieren. In der Phase der akuten Inflammation werden Makrophagen u. a. durch TNF- α und Interferon γ zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid aktiviert. Ziel ist es, eine schnelle Initiierung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion und so eine effiziente Immunantwort der Niere auf verschiedene Pathogene zu gewährleisten (Anders 2003, Mosser 2008, Martinez 2011, Mikita 2011). Im weiteren Verlauf einer Inflammationsreaktion zeigen Makrophagen u. a. durch die Phagozytose von zerstörten Zellen bzw. geschädigten Gewebsbestandteilen und opsonierten Erregern wichtige antiinflammatorische Eigenschaften. Hierdurch können sie eine Überaktivierung der Inflammationsreaktion verhindern und die *Resolution* unterstützen (Kawanishi 2010, Martinez 2011, Mikita 2011). Diese antiinflammatorischen Makrophagen werden u. a. durch IL-10 oder Glukokortikoide aktiviert (Wang 2011).

Makrophagen wurden in dieser Arbeit durch den Marker CD68/ED1, welcher ausschließlich von diesen exprimiert wird, identifiziert (Holness 1993, Kaissling 2008).

Bei Persistenz der Noxe unterbleibt die *Resolution* und es resultiert eine chronische Entzündung mit einer progredienten Gewebsdestruktion. Diese geht mit einer weiteren Zunahme von proinflammatorischen Zellen und einer Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten einher. Auch der profibrotische TGF- β spielt hier eine wichtige Rolle. TGF- β stellt einen der wichtigsten Fibrose induzierenden Wachstumsfaktoren dar und spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung ruhender renaler Fibroblasten und in der Aktivierung der Extrazellulärmatrixsynthese (Liu 2006, Koesters 2010). Myofibroblasten stammen zum größten Teil von Gewebsfibroblasten ab (Kis 2011). Im Rahmen ihrer Differenzierung durch TGF- β oder weitere profibrotische Stimuli kommt es zu einer vermehrten Expression des Strukturproteins *Alpha smooth muscle actin* (α -SMA), welches zur Charakterisierung dieser Zellen genutzt wird (Barnes 2011, Meran 2011). Des Weiteren besitzen sie durch Kalzium-abhängige, intrazelluläre, kontraktile Aktin-Myosin-Filamente die Eigenschaft sich aktiv bewegen und kontrahieren zu können (Follonier Castella 2010). Myofibroblasten spielen eine entscheidende Rolle im Ablauf von inflammatorischen Veränderungen und Wundheilungsprozessen (Kis 2011). Sie sind hier u. a. für die Produktion der Extrazellulärmatrix zuständig (Barnes 2011, Sarrazy 2011). Des Weiteren sind sie in der Lage, durch Zytokinproduktion die Inflammationsreaktion zu beeinflussen (Baum 2011). Anzahl und Aktivität der Myofibroblasten unterliegen dabei einer exakten Steuerung. So gehen gegen Ende eines physiologischen Wundheilungsprozesses Myofibroblasten durch Apoptose unter (Follonier Castella 2010). Im Rahmen der chronischen Nierenerkrankung ist dieser Mechanismus der Apoptose gestört (Kaissling 2008). Es kommt es zu einer Persistenz der Myofibroblasten und dadurch zu einer vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix. Die daraus resultierenden Umbauvorgänge führen zu einer zunehmenden Vernarbung des Nierengewebes mit massiver Ausweitung des interstitiellen Kompartimentes und münden letztendlich im Vollbild der Nierenfibrose (Follonier Castella 2010, Barnes 2011, Meran 2011). Dieser narbige Umbau mit progressivem Funktionsverlust des renalen Parenchyms bildet mit der terminalen Phase der Inflammation die gemeinsame Endstrecke aller chronisch-progredienten Nierenerkrankungen und führt zum Verlust der Organfunktion (Anders 2003, Kaissling 2008, Barnes 2011, Meran 2011, Grgic 2012).

Aus den bisher angeführten Punkten ergibt sich, dass der Prozess der *Resolution* ein essentieller, aktiver Vorgang im Rahmen einer physiologischen Inflammationsreaktion darstellt. Pharmakologisch kann eine aktive Förderung der *Resolution* durch den Einsatz von Glukokortikoiden erreicht werden. Als Folge dieser Therapie kommt es jedoch zu einer generellen Immunsuppression, welche zwar die Symptomatik der Nephritis verbessert, jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden sein kann. So kann es im Rahmen einer dauerhaften Kortisontherapie zu Verlust von Knochensubstanz, zu Wachstumsstörungen und diabetogenen Stoffwechseleränderungen sowie zu opportunistischen Infektionen kommen (Coskey 1986, Dahl 2006). Dies begrenzt die längerfristige Anwendbarkeit der Glukokortikoide beim Menschen. Es ist daher notwendig, spezifischere Angriffspunkte einer entzündungshemmenden Therapie zu finden.

Hierzu ist die genauere Charakterisierung der Signaltransduktionswege der Glukokortikoide erforderlich. Insbesondere Annexin A1, welches weiter *down stream* in diesen Signaltransduktionswegen eine entscheidende Rolle einnimmt, bietet Potenzial für die Entwicklung solcher spezifischeren und nebenwirkungsärmeren Therapieoptionen.

1.3 Annexin A1

Annexin A1 ist ein Phospholipid- und Kalzium-bindendes Protein mit einer Masse von 37 kDa. Es spielt durch Steuerung von u. a. des Zellwachstums und -umsatzes sowie der Endo- und Exozytose eine entscheidende Rolle in der Modulation der systemischen Hämodynamik und Inflammation (Lim 2007, John 2008). Hierzu besitzt es Bindungsstellen für bis zu 8 Kalziumionen sowie Kalzium-abhängige und unabhängige Bindungsstellen für Lipide. Der N-Terminus ist bei niedriger Kalziumkonzentration in einer Tasche des Proteins verborgen und damit inaktiv. Erst bei steigenden Kalziumkonzentrationen wird der N-Terminus aus der Tasche freigesetzt und kann anschließend mit Phospholipiden und Proteinen interagieren (Rosengarth 2003).

Annexin A1 kommt sowohl intra- als auch extrazellulär vor (Lim 2007). Der genaue Sekretionsmechanismus ist zurzeit noch nicht vollständig aufgeklärt, scheint jedoch zellspezifisch zu sein. Eine Beteiligung von selektiven Phosphorylierungsschritten und spezifischen *ATP-binding-cassette*-Transportern wird diskutiert (Coméra 1995, Castro-

Caldas 2002, Solito 2003). Im extrazellulären Raum erfolgt eine partielle Proteolyse des Proteins, welche in der Abspaltung des bioaktiven N-Terminus resultiert (Vergnolle 1995, Migeotte 2006, Rescher 2006). Sowohl das Gesamtmolekül als auch die N-terminalen Fragmente wirken über Rezeptoren der Formyl-Peptid-Rezeptor-Gruppe (FPR) und tragen so zur antiinflammatorischen Wirkung bei (Vergnolle 1995, Migeotte 2006).

Durch Flower und Blackwell konnte erstmals gezeigt werden, dass Annexin A1 in peritonealen Makrophagen von Ratten vorkommt und durch Glukokortikoide induziert wird. Sie wiesen zudem nach, dass Annexin A1 als Mediator für die antiinflammatorische Wirkung der Glukokortikoide fungiert (Flower 1979). Des Weiteren fördern Glukokortikoide die Sekretion von Annexin A1 (Solito 1994, 2003, Philip 1997, Castro-Caldas 2002). Ist die Expression von Annexin A1 gestört, zeigte sich eine verminderte Wirkung der Glukokortikoide (Lim 2007). Hierdurch wurde die essentielle Rolle von Annexin A1 als Vermittler der Glukokortikoidwirkung weiter bestätigt.

Nach dem heutigen Wissensstand besitzt Annexin A1 eine Schlüsselfunktion in der Vermittlung antiinflammatorischer Reaktionen, dessen Induktion zudem die *Resolution* aktiv unterstützt (Lim 2007). Diese antiinflammatorischen und protektiven Effekte von Annexin A1 konnten in Tiermodellen für medikamentöse Nierenschäden (Araujo 2010, 2012), Arthritiden (Yang 2004), Myokardinfarkt (Gavins 2005), Peritonitis (Damazo 2006), *Systemic inflammatory response syndrome* (Damazo 2005) und Schlaganfall (Relton 1991, Gavins 2007) nachgewiesen werden.

Die antiinflammatorische Wirkung von Annexin A1 beruht dabei auf verschiedenen Mechanismen. So hemmt Annexin A1 die Produktion proinflammatorischer Mediatoren, v.a. der Prostaglandine, durch die Hemmung der Expression von Schlüsselenzymen wie der Phospholipase A2 und der Cyclooxygenase 2 (Migeotte 2006, Lim 2007). Die Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-10 wird hingegen gefördert (Scannell 2006). Des Weiteren wird durch Annexin A1 die Adhäsion und Diapedese von Leukozyten durch die Gefäßwände inhibiert (Migeotte 2006, Lim 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass mononukleäre Zellen mit einer hohen Expression von Annexin A1, im Vergleich zu Zellen mit geringerer Expression, in geringerem Maße durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α aktiviert werden (Lim 2007). Im Rahmen der

Apoptose wirkt Annexin A1 als *Find me and eat me*-Signal für Phagozyten, indem es sich an der Oberfläche von apoptotischen Zellen anlagert. Hierdurch wird eine effiziente Phagozytose mit einer schnellen Elimination von abgestorbenen Zellen gewährleistet (Parente 2004, Lim 2007, Dalli 2012). Annexin A1 wird hierfür ebenfalls von apoptotischen Zellen aktiv auf deren Oberfläche exponiert (Weyd 2012).

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Annexin A1 einen antiproliferativen Effekt auf Fibroblasten und Epithelzellen ausübt und deren Aktivierung hemmt (Kamal 2005, Neymeyer 2013).

Durch seine stark antiinflammatorische Wirkung im Organismus stellt Annexin A1 ein vielversprechendes therapeutisches Schlüsselprotein zur Verhinderung von Schäden im Rahmen einer überschießenden oder chronischen Entzündung dar (John 2008).

Fehlt dieses Protein, wie in Annexin A1-knockout-Tieren, oder werden spezifische antagonisierende Antikörper gegen Annexin A1 in Tiere injiziert, unterbleibt, auch bei Gabe von Glukokortikoiden, eine adäquate antiinflammatorische Antwort (Perretti 1994, Damazo 2005, 2006, 2011). Induzierte Entzündungen verlaufen dann stärker als bei Kontrolltieren. In der Lunge konnte hierbei ein vermehrtes Vorkommen der proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und Interferon γ sowie des profibrotischen Mediators TGF- β nachgewiesen werden, welche zu einer vermehrten Bildung von extrazellulärer Matrix mit konsekutiver Fibrose führen (Damazo 2011). Auch in systemischen Autoimmunerkrankungen, wie verschiedenen Formen des Lupus erythematoses, konnten hohe Konzentrationen an anti-Annexin A1-Antikörpern nachgewiesen werden (Kretz 2010). Dies unterstreicht die wichtige Rolle von Annexin A1 im Rahmen immunologischer Vorgänge.

Mehrere Arbeiten haben bereits die renale Expression von Annexin A1 in der gesunden und der geschädigten Niere untersucht. McKanna et al. zeigten, dass Annexin A1 unter Kontrollbedingungen in der Bowman'schen Kapsel, den Podozyten, der Macula densa, dem dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife sowie im Sammelrohr exprimiert wird (McKanna 1992). Im Rahmen einer Inflammation der Niere bei Nephritiden oder bei einer renalen Schädigung bei einer Reperfusion nach Ischämie kommt es zu einer Zunahme der Gesamtproteinmenge von Annexin A1 (McKanna 1992, Ka 2014). Das Vorkommen von Annexin A1 in den Zellen des renalen Interstitiums und dessen

Expression im Verlauf einer Entzündungsreaktion wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

2 Zielsetzung

Im Rahmen von Nephritiden spielen entzündliche Vorgänge wie die Zunahme und Aktivierung von Makrophagen und Fibroblasten eine wichtige Rolle. Das Fortschreiten der Schädigung führt letzten Endes zu einer chronischen Nierenschädigung mit der Notwendigkeit von Nierenersatzverfahren. Die derzeit bestehenden therapeutischen Optionen sind teils ineffektiv oder führen bei längerfristiger Anwendung zu erheblichen Nebenwirkungen. Mit in Zukunft steigender Patientenzahl sowie der zahlenmäßigen Abnahme von transplantierbaren Organen ist es daher zwingend erforderlich, neue Therapien zu etablieren. Diese sollen helfen, frühzeitig die Progredienz der renalen Schädigung einzudämmen sowie die *Resolution* zu fördern um hierdurch die Funktion der Nieren erhalten zu können.

In tierexperimentellen Modellen für Entzündungsreaktionen anderer Organe konnte das endogene Protein Annexin A1 als stark antiinflammatorisch und *Resolutions*-fördernd beschrieben werden. Jedoch ist die Regulation von Annexin A1 sowie dessen Funktion in der Niere bzw. dem renalen Interstitium im Rahmen von entzündlichen Prozessen unbekannt.

In dieser Arbeit sollten daher folgende Hypothesen geprüft werden:

1. Annexin A1 wird im gesunden renalen Tubulointerstitium exprimiert.
2. Im Verlauf von akuten und chronischen Nierenerkrankungen kommt es zu einer Zunahme der Annexin A1-Expression.
3. Die Zunahme der Expression von Annexin A1 wird in Nierenerkrankungen vor allem durch Makrophagen und Fibroblasten getragen.

Hierzu sollte die Expression von Annexin A1 in der gesunden Niere in der Ratte, mit Blick auf das Tubulointerstitium untersucht werden. Zudem sollte die Expression von Annexin A1 im Verlauf der akuten, reversiblen anti-Thy-1 Nephritis mit besonderer Berücksichtigung der Makrophagen analysiert werden. Das Modell kann sowohl für die Phasen der Inflammation (Initiation, Amplifikation und Progression) als auch für die *Resolution* der akuten Nephritis genutzt werden. Des Weiteren sollte die Expression von Annexin A1, mit besonderer Berücksichtigung der Fibroblasten, in einem Tiermodell

mit einer chronisch-progredienten Nierenschädigung untersucht werden. Hierzu wurde doppelt transgene Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR) gewählt, welche auf Grund einer ausgeprägten Hypertonie u. a. eine chronische fibrosierende Nierenschädigung ausbilden.

Die renale Morphologie und ihre Veränderungen sollten in den Tiermodellen mittels PAS-Färbungen untersucht werden. Zur Charakterisierung der tubulointerstitiellen Zellen und zur Analyse der renalen Annexin A1-Expression sollten immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden. Im Rahmen der anti-Thy-1 Nephritis sollten die Proteinurie quantifiziert und die THY1-Antikörperbindung in den Glomeruli ermittelt werden. TaqMan Real-Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) sollte zur quantitativen Auswertung von Annexin A1-mRNA eingesetzt werden. Bei den dTGR sollten die Analysen für Kollagen 1a2 mittels in-situ-Hybridisierungen erfolgen.

Die Veränderung der Annexin A1-Expression in den pathologischen Modellen sowie die genaue Charakterisierung der exprimierenden Zellen soll als Grundlage für weitere Forschungen dienen, die Annexin A1 als Kandidat für Therapien entzündlicher Nierenerkrankungen beleuchten.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Der Einsatz von Tiermodellen hat wesentlich zu dem heutigen Verständnis von Erkrankungen, auch der Nephritiden, des Menschen beigetragen. Zum einen ermöglichen Tiermodelle das Etablieren neuer Fragestellungen, welche dann zielgerichtet an, nur in begrenzten Mengen zur Verfügung stehendem, humanem Material beantwortet werden können. Zum anderen sind Tiermodelle anderen Modellen, wie Zellkulturen und theoretischen Modellen überlegen, da in einem lebenden Organismus prinzipiell alle wichtigen Faktoren und Zellen vorhanden sind. Diese betrifft auch die komplexe Entstehung einer Inflammation oder *Resolution*, wie sie in dieser Arbeit untersucht wurde. Zudem bieten Tiermodelle die Möglichkeit Pathologien gezielt zu verschiedenen Zeitpunkten untersuchen zu können, da tierische Proben je nach Protokoll und Zeitverlauf entnommen werden können. Jedoch muss erwähnt werden, dass eine direkte Übertragung von Tiermodellen auf den menschlichen Organismus nicht immer möglich ist. Es bleibt daher zwingend notwendig, jede Erkenntnis aus einem Tierversuch vor der Übertragung auf den Menschen kritisch zu prüfen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, es Expression und Lokalisation von Annexin A1 in der gesunden Niere sowie in verschiedenen Tiermodellen einer Nierenschädigung zu untersuchen. Für die Untersuchungen zur Lokalisation von Annexin A1 im Gesunden wurde dazu Nierenmaterial von perfusionsfixierten, adulten Sprague-Dawley-Ratten (männlich, Gewicht: 250g) verwendet, welches im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. S. Bachmann bereits vorlag. Die Versuche zur Lokalisation von Annexin A1 im Verlauf einer akuten anti-Thy-1 Nephritis wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. H. Peters (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie der Charité) an 6 Wochen-alten Wistar-Ratten (männlich, Gewicht: 200g) durchgeführt. Die Tierversuche erfolgten entsprechend den „Grundsätzen der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ und wurden vor Durchführung durch die Berliner Tierschutzbehörde (LAGESO) genehmigt (Projekt G 0010/08). Nieren der dTGR (transgen für humanes Renin und humanes Angiotensinogen) wurden uns

freundlicherweise von Prof. F. Luft (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin) zur Verfügung gestellt (Luft 1999).

3.1.1 *Anti-Thy-1 Nephritis*

Das anti-Thy-1 Nephritis Modell gilt als Tiermodell einer reversiblen, antikörpervermittelten mesangioproliferativen Glomerulonephritis und zeigt im pathologischen Bild Ähnlichkeiten zur humanen IgA Nephropathie. Die Erkrankung wird durch Gabe eines monoklonalen Antikörpers gegen das Thy-1.1 Antigen von Mesangialzellen der Ratte induziert und zeigt einen charakteristischen zeitlichen Verlauf. Nach Gabe des Antikörpers bindet dieser spezifisch an sein Antigen auf der Oberfläche von Mesangialzellen und führt innerhalb von 48 Stunden zu einer Komplement- und Stickstoffmonoxid-abhängigen Mesangiumzelllyse (Initiationsphase). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Infiltration mononukleärer Zellen in die betroffenen Glomeruli sowie, zu einem späteren Zeitpunkt, auch in das umliegende Tubulointerstitium (Amplifikationsphase). Parallel zur Ausbildung der mesangialen und extraglomerulären Schädigung lassen sich bereits frühzeitig beginnende Reparaturprozesse nachweisen. Diese nehmen im Lauf mehrerer Wochen quantitativ zu, sodass es im weiteren Verlauf zu einer Rückbildung (*Resolution*) der Entzündungsreaktion mit einer Normalisierung der renalen Funktionen kommt (*Resolutions-Phase*) (Peters 2000).

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit früheren Studien aus der Arbeitsgruppe von Prof. H. Peters zu gewährleisten, wurden die Versuche an insgesamt 40 Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und im weiteren Versuchsverlauf im Tierstall des Charité Center for Cardiovascular Research unter standardisierten Bedingungen bei 22 bis 24 °C, ca. 50% Luftfeuchtigkeit und einem 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Die Tiere hatten zu jedem Zeitpunkt freien Zugang zu einem proteinreichen Zuchtfutter und Leitungswasser. Nach einer Eingewöhnungszeit von 1 Woche wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip auf 4 Gruppen mit jeweils 10 Tieren (Tab. 1) aufgeteilt und entweder mit 5 mg/kg anti-Thy-1-Antikörpers (Klon 1-22-3) in *Phosphate buffered saline* (PBS) (Merck, Darmstadt, Deutschland) oder mit PBS ohne Antikörper behandelt (Wang 2005). Die Applikation

des Antikörpers erfolgte intravenös über die Vena dorsalis penis unter Isofluran-Inhalationsnarkose.

Gruppe	Intervention	Zeitpunkt der Untersuchung
Kontrolle	Injektion von PBS an Tag 0	15 Tage nach Injektion
24 Stunden	Injektion von 5 mg/kg 1-22-3 Antikörper in PBS an Tag 14	24 Stunden nach Injektion
5 Tage	Injektion von 5 mg/kg 1-22-3 Antikörper in PBS an Tag 10	5 Tage nach Injektion
15 Tage	Injektion von 5 mg/kg 1-22-3 Antikörper in PBS an Tag 0	15 Tage nach Injektion

Tab. 1. Aufteilung der Ratten im Rahmen der anti-Thy-1 Nephritis

Die Injektionen wurden so terminiert, dass alle Tiere am gleichen Tag getötet wurden. Die Zeitpunkte der Tötungen wurden so gewählt, dass die Resolution als aktiver Prozess im Werden untersucht werden konnte. Kontrolltiere sowie die Tiere der 5- und 15-Tage-Gruppe wurden am Tag vor der Tötung für jeweils 24 Stunden in metabolische Käfige gesetzt, um die Proteinurie laborchemisch bestimmen zu können. Am Ende der Versuchszeit wurden jeweils 5 Tiere jeder Gruppe für morphologische Analysen nach dem weiter unten detaillierten Protokoll perfusionsfixiert. Die restlichen Tiere wurden nach tiefer Isofluran-Narkose durch Genickbruch getötet; die Nieren wurden entnommen, mit einer sterilen Rasierklinge in Kortex, äußere Medulla und innere Medulla aufgeteilt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

3.1.2 Doppelt transgene Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR)

In einem weiteren Versuchsteil sollte der Einfluss einer chronisch-progredienten Nierenschädigung auf die Expression von Annexin A1 untersucht werden. Als Modell hierfür wurde das Modell der TGR(hAOGEN-hRen) doppelt transgenen Ratte verwendet. Diese Tiere wurden ursprünglich durch die Arbeitsgruppe von Prof. Ganten erzeugt und stellen ein wichtiges Modell für die Erforschung des humanen Renin-Angiotensin-Systems und Hypertonie-assoziiierter Endorganschäden dar (Luft 1999,

Ganten 1992). Durch Überexpression von humanem Renin und humanem Angiotensinogen kommt es in diesen Tieren zu einer drastisch gesteigerten Bildung von Angiotensin II. In Folge entwickelt sich eine ausgeprägte Hypertonie mit systolischen Blutdruckwerten von ca. 200 mmHg. Die hypertensiven Endorganschäden umfassen eine kardiale Hypertrophie, fibrinoide Nekrose von Widerstandsgefäßen und myointimalen Umbau größerer Gefäße. Im Interstitium der Niere kommt es zur Proliferation und Aktivierung von Fibroblasten und in Folge zur Ausbildung einer ausgeprägten Fibrosierung (Luft 1999). Sieben Wochen nach Geburt sterben die Tiere auf Grund von Herz- und Nierenschädigung. Für die vorliegende Studie wurde Nierenmaterial von 5 Wochen-alten Tieren verwendet, welches freundlicherweise von Dr. D. Müller zur Verfügung gestellt wurde.

3.2 Perfusionsfixierung

Die Perfusionsfixierung der Tiere (Sprague-Dawley-Ratten, Wistar-Ratten, dTGR) erfolgte nach einem standardisierten Protokoll im Institut für vegetative Anatomie der Charité. Die Fixierung war für den Gewebeerhalt sowie für weitere immunhistochemische und mRNA-basierte Darstellungsverfahren optimiert. Dafür wurde zunächst das Abdomen mittels medianer Laparotomie eröffnet und die Aorta abdominalis mit einem dünnen Faden angeschlungen. Im nächsten Schritt wurde die Aorta abdominalis mit einer Mikroklemme unmittelbar distal des Abgangs der Nierenarterien ausgeklemmt und mit einer Mikroschere angeschnitten. In den entstandenen Schnitt wurde nun ein mit Schlauchlösung gefüllter Teflonschlauch eingebracht und mit dem vorher platzierten Faden fixiert. Im Anschluss wurde die Vena cava inferior mit der Mikroschere eröffnet, die Klemme unterhalb der Nierenarterien entfernt und die Perfusion mit einem Druck von 220 cm Wassersäule begonnen. Das detaillierte Protokoll für die Perfusion ist in Tabelle 2 angegeben. Nach erfolgter Perfusion wurden die Nieren vorsichtig entnommen und in Höhe des Hilus halbiert. Für die Paraffineinbettung bestimmte Proben wurden für mindestens 6 Stunden in 3% PFA nachfixiert und anschließend in 300 mosmol Sukrose/PBS/0,02% Natriumazid (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 4 °C gelagert. Die Einbettung erfolgte hiernach im Labor der Kinderpathologie der Charité am Campus Mitte. Das für die Kryoeinbettung bestimmte Gewebe wurde zum Schutz vor Gefrierschäden über Nacht in 800 mOsm

Sucroslösung/PBS nachbehandelt und dann in Stickstoff-gekühltem Isopentan eingefroren.

Lösung	Inhaltsstoffe	Zeit
Schlauchlösung	2 ml 0,9% NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland), 1 ml ProcainHCl 1% (Sigma, München, Deutschland) 1 ml CaCl ₂ 16% (Sigma, München, Deutschland), 1 ml Heparin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland)	-
Vorspüllösung	23,94 g Sucrose (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) 100 ml 10xPBS, Aqua dest. auf 1 l; pH 7,35	30 s
Fixierung (3% PFA/PBS)	15 g PFA (Merck, Darmstadt, Deutschland) 50 ml 10x PBS Aqua dest. auf 1 l; pH 7,35	5 min

Tab. 2. Protokoll für die Perfusionsfixierung des Tierexperiments (Ratten)

3.3 PAS-Färbung

Die Analyse der morphologischen Veränderungen im Rahmen der anti-Thy-1 Nephritis erfolgte an PAS-gefärbten Paraffinschnitten. Dazu wurden zunächst mit einem Paraffin-Mikrotom (Leica RM2125RT, Wetzlar, Deutschland) 4 µm Schnitte hergestellt und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet. Für die Färbung wurden die Schnitte zunächst durch Inkubation in Xylol (3x30 min) (J.T. Baker, Griesheim, Deutschland) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, 70%; jeweils 5 min) (Merck, Darmstadt, Deutschland) rehydriert. Nach erfolgter Rehydrierung wurden die Schnitte in PBS überführt und bis zur Durchführung der Färbung darin gelagert. Für die Färbung wurden die Schnitte für 10 min mit 1% Periodsäurelösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt. In diesem Schritt werden Glycolgruppen in Zuckern zu Aldehyden oxydiert und damit aktiviert. Nach einem Waschschrift in 70% Ethanol wurden die Schnitte für 10 min in Schiff'schem Reagenz (Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Während dieses Schrittes bindet

fuchsinschwefelige Säure an die Zuckeraldehyde, welche dadurch eine rosa Färbung annehmen. Im Anschluss an die PAS-Reaktion wurden die Schnitte für 1 min in destilliertem Wasser gewaschen und für die Kernfärbung für 2 min in Mayers Hämalaun gefärbt. Mayers Hämalaun wurde aus 1 g Hämatoxylin (Sigma, München, Deutschland), 1 l Aqua dest., 200 mg NaIO₃ (Merck, Darmstadt, Deutschland), 50 g KAl(SO₄)₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland), 50 g Chlorhydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) sowie 1 g Zitronensäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Zur abschließenden Farbentwicklung wurden die Schnitte dann für 10 min in Leitungswasser gebläut, im Anschluss in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100% Ethanol) und Xylol entwässert und mit Eukitt (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet. Die Auswertung und Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe eines Leica DMRB Mikroskops mit Interferenzkontrastmodul (Leica, Wetzlar, Deutschland) und Zeiss Kamera (Axio Cam McR, Zeiss, Jena, Deutschland).

3.4 Immunfluoreszenz und Immunhistochemie

Die Lokalisation der verschiedenen Zelltypen in den gewonnenen Gewebeproben erfolgte mittels Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie. Zur Darstellung von Fibroblasten wurde ein Antikörper benutzt, der gegen CD73 gerichtet ist (Kaissling 2008, Grgic 2012). Dieses Enzym katalysiert die Bildung von 5'AMP zu Adenosin. In der Niere wird CD73 neben den Fibroblasten auch von Zellen des proximalen Tubulus und den Schaltzellen des Sammelrohrs exprimiert (Kaissling 2008). Myofibroblasten wurden durch einen Antikörper gegen deren Strukturprotein α -SMA dargestellt (Kaissling 2008). Die Darstellung von Makrophagen erfolgte mittels eines Antikörpers gegen ED1/CD68 (Dijkstra 1985). Dendritische Zellen wurden in der gesunden Niere mittels eines Antikörpers gegen MHC II identifiziert (Kaissling 2008). Die Identifikation von Endothelzellen erfolgte anhand eines Antikörpers, der gegen RECA gerichtet war, ein Antigen, welches alle Endothelzellen exprimieren (Ulger 2002). Als Sekundärantikörper wurden mit Carbocyanin 2 (Cy2), Carbocyanin 3 (Cy3) oder *Horse-radish-peroxidase* (HRP) konjugierte Antikörper benutzt. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 dargestellt. In Vorversuchen wurde deren Konzentration austitriert und deren Funktion geprüft.

Zur Immunhistochemie und Immunfluoreszenz wurden sowohl Paraffin- als auch Cryostatschnitte angefertigt. Paraffinschnitte (4 µm) wurden entparaffiniert und rehydriert. Zur Verbesserung der Antigenverfügbarkeit folgte nun das Kochen der Schnitte für 6 min in Zitratpuffer mit anschließendem Abkühlen der Schnitte in PBS. Der Zitratpuffer war zuvor aus 7,65 g Zitronensäure und 48,2 g Natriumzitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 2 l Aqua dest. hergestellt worden. Cryostatschnitte (6 µm) wurden mit Hilfe eines Cryostaten (Leica CM3050S, Wetzlar, Deutschland) geschnitten und bei Raumtemperatur für 5 min getrocknet.

Die weitere Aufbereitung der Präparate erfolgte nach Protokollen der Immunhistochemie bzw. der Immunfluoreszenz, welche im Folgenden beschrieben werden.

Für die Immunhistochemie erfolgte zunächst eine Inkubation der Schnitte in 3% H₂O₂ in Methanol (12 min) (Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Denaturierung endogener Peroxidasen. Im Anschluss wurden die Präparate für 5 min in PBS gewaschen, bevor sie in 0,5% Triton X 100 (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 30 min inkubiert wurden. Nach wiederholtem Waschen in PBS für 5 min folgte die Inkubation in einer 5% Milchpulverlösung (BD Difco™ Skim Milk, Heidelberg, Deutschland) in PBS zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen. Im Anschluss wurden die Schnitte über Nacht mit den entsprechenden Primärantikörpern inkubiert, welche zuvor in 5% Milchpulverlösung verdünnt worden waren. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte hierauf die Applikation des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers, ebenfalls in 5% Milch verdünnt. Nach einer Stunde wurde die Schnitte wiederholt in PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Signalentwicklung erfolgte durch Inkubation der Schnitte mit DAB (Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid; KemEnTec Diagnostiks, Taastrup, Denmark) und H₂O₂ (0,0003%). Dabei wurde die Signalentwicklung unter dem Lichtmikroskop verfolgt und durch Waschen in PBS abgestoppt, bevor eine unspezifische Hintergrundfärbung entstehen konnte. Im Anschluss erfolgte die Inkubation in Mayers Hämalaun für 1 min. Die eigentliche Färbung der Kerne erfolgte dabei wieder durch Bläuen mit Leitungswasser. Die Schnitte wurden hiernach mit Eukitt eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte wieder mit Hilfe eines Lichtmikroskops mit Interferenzkontrastmodul.

Die Aufbereitung der Schnitte für die Immunfluoreszenz entsprach weitgehend dem oben beschriebenen Protokoll der Immunhistochemie, wobei die Behandlung der Schnitte mit 3% H₂O₂ entfiel. Nach Behandlung mit 0,5% Triton X 100 erfolgte hier die Inkubation mit Primär- und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper, jeweils verdünnt in 5% Milchpulverlösung. Nach Waschschrritten in PBS erfolgte die mikroskopische Kontrolle des Signals.

Für die Doppelfärbungen wurden die mit dem ersten Antikörperpaar (Primär- und Sekundärantikörper) gefärbten Schnitte erneut der oben beschriebenen Prozedur unterzogen. Zur Detektion des gebundenen zweiten Primärantikörpers wurde dann jedoch ein Cy2-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Nach erneutem Waschen in PBS erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol für 10 min; Sigma, München, Deutschland). Die Schnitte wurde anschließend mit Glycerin (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und PBS im Verhältnis 1:1 eingedeckt und bis zur Auswertung bei 4 °C im Kühlschrank in Dunkelheit gelagert. Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop (LMS5Exciter Zeiss, Jena, Deutschland) und der dazugehörigen ZEN-Software (Zen Version 8, Zeiss, Jena, Deutschland).

Antikörper	Hersteller	Katalog-ID
Rabbit-anti-Annexin A1	Lifespan Bioscience, Eching, Deutschland	LS-C20640
Mouse-anti-CD73	Freundlicherweise durch Prof. Dr. Brigitte Kaissling, Zürich, Schweiz bereitgestellt	-
Mouse-anti- α -SMA	DAKO, Eching, Deutschland	M0851
Mouse-anti-ED1/CD68	ABD Serotec, Düsseldorf, Deutschland	MCA341R
Mouse-anti-MHC II	Harlan Sera Lab, Rossdorf, Deutschland	MAS 043
Mouse-anti-RECA	ABD Serotec, Düsseldorf, Deutschland	MCA970GA
Donkey-anti-rabbit Cy3	Jackson Immuno Research	711-165-152

	Laboratories, Suffolk, UK	
Donkey-anti-mouse Cy3	Jackson Immuno Research Laboratories, Suffolk, UK	715-165-150
Donkey-anti-rabbit Cy2	Jackson Immuno Research Laboratories, Suffolk, UK	711-225-152
Donkey-anti-mouse Cy2	Jackson Immuno Research Laboratories, Suffolk, UK	715-225-151
Donkey-anti-rabbit HRP	Jackson Immuno Research Laboratories, Suffolk, UK	711-035-152
Donky-anti-mouse IgG	Jackson Immuno Research Laboratories, Suffolk, UK	715-001-003

Tab. 3. Übersicht über die bei der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper

3.5 TaqMan Real-Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Annexin A1-mRNA wurde im renalen Kortex sowie im inneren und äußeren Nierenmark mittels RT-PCR untersucht. Hierzu war die Präparation der cDNA notwendig.

3.5.1 RNA- und cDNA-Präparation

Für die mRNA Präparation wurden tiefgefrorene Gewebeproben mit Hilfe eines Mörsers und flüssigem Stickstoff gemörsert und hierdurch homogenisiert. Die Präparation der mRNA erfolgte anschließend mittels Trizol. Dazu wurden 500 µl Trizol (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) sowie 100 µl Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) zu dem homogenisierten Gewebe hinzugefügt. Nach Mischen der Probe durch Schütteln für 15 min erfolgte das Zentrifugieren für 10 min bei 16000 g. Nach dem Zentrifugieren wurde die obere Phase in ein neues Gefäß überführt und mit 250 µl Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach erfolgte das erneute Zentrifugieren der Probe mit 16000 g für 20 min bei 4 °C wodurch es zu einem Ausfällen der mRNA kam. Die gefällte mRNA wurde nach Verwerfen des Überstandes isoliert, mit 500 µl Ethanol 70% gewaschen und erneut mit 7500 g bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, die Probe erneut mit 250 µl Ethanol 100% gewaschen und abermals für 5

min bei 4 °C mit 7500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die isolierte mRNA bei 65 °C für 10 min getrocknet. Hiernach erfolgte die Resuspension in 20 µl RNase-freiem Wasser sowie die Inkubation bei 65 °C für 10 min. Zur Lagerung wurde die gelöste mRNA schockgefroren.

Im Rahmen der TaqMan RT-PCR erfolgte in den nächsten Schritten die Transkription der mRNA in stabile cDNA. Dies erfolgte mit Hilfe eines cDNA-Synthese Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Nach erfolgter Synthese wurde die fertige cDNA bei -20 °C gelagert.

3.5.2 Quantitative TaqMan RT-PCR

Die Quantifizierung der Annexin A1-mRNA Menge über den zeitlichen Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis erfolgte mittels quantitativer TaqMan RT-PCR. Diese Methode beruht auf einem modifizierten PCR-Verfahren, in welchem neben den konventionellen Primern ein weiteres Oligonukleotid zur Anwendung kommt. Die Sequenz dieser sogenannten TaqMan-Sonde ist komplementär zur jeweiligen Zielsequenz. Zusätzlich ist sie mit einem Donorfluorochrom (Reporter) und einem Akzeptorfluorochrom (Quencher) markiert. Durch die große Nähe der beiden Fluochrome auf dem Oligonukleotid kommt es nach Anregung des Donorfluorochroms zu einem Förster-Resonanzenergietransfer auf das Akzeptorfluorochrom und damit zu einer Auslöschung der Fluoreszenz des Reporters. Während der PCR hybridisiert dieses Nukleotid mit der Ziel-DNA und wird durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Dabei werden Quencher und Reporter voneinander getrennt und die Energieübertragung unterbrochen. Durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität des Reporters kann nun die Menge an ungebundenem Reporter-Fluochrom und damit die Menge der amplifizierten DNA gemessen werden.

Das TaqMan Genexpressions-System wurde von der Firma Applied Biosystems bezogen (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Die TaqMan RT-PCR wurde mit einer kommerziell erhältlichen Sonde für Annexin A1 (Rn01454280_m1; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Abundanz von GAPDH cDNA (Hs03929097_g1; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) wurde im gleichen Ansatz bestimmt und als Ladekontrolle verwendet.

Hierzu wurde ein Mastermix nach Angaben des Herstellers aus dem spezifischen TaqMan Genexpressionsansatz und GAPDH angesetzt. 10 µl dieses Mastermix sowie 5 µl der präparierten cDNA wurden zusammen in ein Reaktionsgefäß gegeben und im Fast 7900 Cyler (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gemessen. Hierbei erfolgte zuerst das Erhitzen der Proben auf 95 °C für 20 s. Danach folgten 40 Zyklen mit Abkühlen der Proben auf 60 °C für 30 s und erneutem Erhitzen auf 95 °C für 3 s. Die Messwerte wurden mittels SDS 2.1 Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) erhoben. Das Expressionsniveau wurde mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak 2001) bestimmt und als x-faches der Kontrolle angegeben.

3.6 In-situ-Hybridisierung

Die in-situ-Hybridisierung für Kollagen 1a2 erfolgte nach einem publizierten Protokoll. Die Technik ist in unserem Labor etabliert (Weichert 2001, Serradeil-Le Gal 2002, Campean 2003, Mutig 2007). Für die Generierung der Sonde wurden zunächst nach dem weiter oben detaillierten Protokoll cDNA aus dem Schwanzgewebe einer Ratte generiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation der Nukleotide 2256-2468 der cDNA für Kollagen 1a2 (NM_053356) mittels konventioneller Endpunkt-PCR.

Hiernach wurden je 300 ng des PCR-Produktes für die Transkription zur Herstellung der mRNA-Sonde verwendet. Die zur Transkription verwendeten Materialien wurden alle von der Firma Roche bezogen (Roche, Mannheim, Deutschland). Mittels der DNA, 2 µl Transkriptionspuffer und 2 µl Digoxigenin markiertem Nukleotidmix wurde ein Ansatz hergestellt, welcher auf 20 µl mit DEPC Wasser aufgefüllt wurde. Dieser Ansatz wurde mit 2 µl RNA Polymerase (-20 °C) versetzt und im Brutschrank (Haraeus, Hanau, Deutschland) bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 135 min durch den Zusatz von 2 µl 0,2 Mol EDTA, 2,5 µl Lithiumchlorid und 75 µl absolutem Ethanol (-20 °C) gestoppt. Das Fällern der RNA erfolgte anschließend bei -20 °C für 16 Stunden. Hiernach erfolgte durch Zentrifugation das Trennen der gefällten RNA vom Überstand, das Waschen dieser in 80% Ethanol und die Resuspension in 100 µl DEPC Wasser.

Vor Durchführung der in-situ-Hybridisierung wurden alle Küvetten und Instrumente bei 180 °C für 6 Stunden gebacken, um eventuell vorhandene DNAsen/RNAsen zu beseitigen. Hiernach wurden am ersten Tag die Schnitte in Xylol entparaffiniert und dann durch eine absteigende Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, 70%) und abschließend

in PBS rehydriert. Anschließend erfolgte eine Nachfixierung mit 4% PFA in PBS (20 min, 4 °C). Mittels 0,2 M HCl (20 min, 4 °C) (Merck, Darmstadt, Deutschland), dem Waschen in PBS und der nachfolgenden Inkubation mit Proteinase K (Roche, Mannheim, Deutschland) für 30 min bei 37 °C wurden vorhandene Proteine denaturiert. Es erfolgte eine erneute Inkubation in 4% PFA (20 min, 4 °C). Hieran schloss sich die Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 96%, 100%) für jeweils 5 min bei 4 °C an. Nachdem sie für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet worden waren, erfolgte nun zuerst die Inkubation mit dem Prähybridmix (Grundmix 64 µl (Tab. 4) + 16 µl H₂O pro Schnitt) für 2 Stunden und hiernach die Inkubation mit dem Hybridmix (Grundmix 32 µl (Tab. 4) + 4 µl Sonde in 50% Formamid gekocht + 4 µl H₂O pro Schnitt) für 18 Stunden bei 40 °C. Im Anschluss erfolgte das Waschen der Schnitte mit 50% Formamid in *Saline-sodium-citrate*-Lösung (SSC) für 30 min bei 40 °C zur Entfernung ungebundener Sonden. Hierauf folgte eine Behandlung mit SSC in absteigender Konzentration (2xSSC, 30 min, 40 °C; 2xSSC, 2x15min, Raumtemperatur; 1xSSC, 2x15 min, Raumtemperatur). Es schloss sich die Inkubation mit Puffer 1 (10 min, Raumtemperatur; Tab. 4) und Puffer 2 (30 min, Raumtemperatur; Tab. 4) an. Zur Detektion der an die RNA gebundenen Sonden wurde der alkalische Phosphatase-konjugierten anti-Digoxigenin Antikörper (1:50) (DAKO, Eching, Deutschland) appliziert und die Schnitte für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Puffer 1 (15 min, Raumtemperatur; Tab. 4) wurden die Schnitte in Puffer 3 überführt (2 min, Raumtemperatur; Tab. 4). Die Generierung des lichtmikroskopisch detektierbaren Signals erfolgte durch Inkubation der Schnitte mit Entwicklungspuffer (Tab. 4). Der Fortschritt der Signalentwicklung wurde dabei in regelmäßigen Abständen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde Puffer 4 (2x15 min, Raumtemperatur; Tab. 4) benutzt. Nach dem Waschen mit PBS und dem Abdecken mittels Glasplättchen erfolgte die Analyse und die Fotodokumentation des in-situ-Signals mittels des Leica DMRB Mikroskops.

Ansatz	Inhaltsstoffe	Menge
Grundmix	50% Dextransulfat (Sigma, München, Deutschland)	8 ml
	100% deionisiertes Formamid (Sigma, München, Deutschland)	16 ml
	Milli Q Wasser (Merck, Darmstadt, Deutschland)	3,2 ml

	5 M NaCl 1 M Tris-Cl, pH 7,4 (Merck, Darmstadt, Deutschland) 0,5 M EDTA, pH 8 (SERVA GmbH, Heidelberg, Deutschland) 50xDenhardt's (Sigma, München, Deutschland) 100 mg/ml Blockade tRNA (Roche, Mannheim, Deutschland)	2,4 ml 0,8 ml 0,4 ml 0,8 ml 0,4 ml
20xSSC	NaCl Natriumzitat Milli Q Wasser --> pH auf 7,0 mittels 10 M NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland) einstellen --> Milli Q Wasser auf 2 Liter auffüllen	350,6 g 176,4 g 1800 ml
Puffer 1	1 M Tris (Merck, Darmstadt, Deutschland) 5 M NaCl Milli Q Wasser	20 ml 6 ml 200 ml
Puffer 2	1% Blocking Reagenz (Roche, Mannheim, Deutschland) in Puffer 1 lösen 0,5% BSA nach dem Auskühlen dazu	
Puffer 3	1 M Tris 5 M NaCl 1 M MgCl ₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland) Milli Q Wasser	25 ml 5 ml 12,5 ml 250 ml
Puffer 4	1 M Tris 0,5 M EDTA, pH 8,0	20 ml 0,4 ml
Puffer Entwicklung	Levamisol (Sigma, München, Deutschland) Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (Roche, Mannheim, Deutschland) X-Phosphat = BCIP (Roche, Mannheim, Deutschland) Puffer 3	10 mg 45 µl 35 µl 10 ml

Tab. 4. Verwendete Lösungen/Puffer für die in-situ-Hybridisierung

3.7 Präsentation der Daten und statistische Verfahren

Zur Quantifizierung der Makrophagen wurden alle klar als Makrophagen identifizierbare Zellen ausgewertet. Die Auswertung erfolgte auf Grund der Hauptpathologie der anti-Thy-1 Nephritis ausschließlich im renalen Kortex. Hier wurde des Weiteren zwischen glomerulären sowie tubulointerstitiellen Makrophagen differenziert. Für jedes Tier wurden 2 Schnitte ausgewertet.

Die Veränderung der Anzahl der Makrophagen im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis wurde mittels immunhistochemischer Färbung für ED1 quantifiziert. Für die Auszählung der glomerulären Makrophagen wurden 40 Glomeruli je Schnitt erfasst. Die Gesamtzahl der glomerulären Makrophagen wurde zur Anzahl der gezählten Glomeruli ins Verhältnis gesetzt und das Ergebnis als Makrophagen pro Glomerulum angegeben. Für die interstitiellen Makrophagen wurden 20 zusammenhängende Gesichtsfelder im kortikalen Interstitium je Schnitt ausgewertet. Das Gesichtsfeld (40er Objektiv) des Mikroskops wurde hierfür meanderförmig durch den renalen Kortex geführt, sodass von einer repräsentativen Darstellung der Makrophagenverteilung auszugehen war. Die Anzahl der gesamten ausgezählten Makrophagen wurde zur betrachteten Fläche ins Verhältnis gesetzt und das Ergebnis als Makrophagen pro Gesichtsfeld angegeben.

Die Auswertung der Annexin A1-Expression von Makrophagen im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis erfolgte an histologischen Schnitten, an denen zuvor eine Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz für Makrophagen (ED1) und Annexin A1 durchgeführt worden war. Jeder ED1-positive Makrophage wurde anhand der Doppelfärbung auf die Expression von Annexin A1 untersucht. Für die glomerulären Makrophagen erfolgte die Auswertung von 40 Glomeruli je Schnitt. Die Gesamtzahl der Annexin A1-exprimierenden glomerulären Makrophagen wurde zur Anzahl der Glomeruli ins Verhältnis gesetzt und das Ergebnis als Annexin A1-positive Makrophagen pro Glomerulum angegeben. Die Auswertung der interstitiellen Annexin A1-exprimierenden Makrophagen erfolgte anhand von 20 Gesichtsfeldern je Schnitt, welche wie oben beschrieben meanderförmig durch das kortikale renale Interstitium geführt wurden.

Die Gesamtzahl der Annexin A1-exprimierenden interstitiellen Makrophagen wurde so ermittelt und zur Anzahl der Gesamtmakrophagen (Annexin A1-negative interstitielle Makrophagen + Annexin A1-positive interstitielle Makrophagen) ins Verhältnis gesetzt.

Das Ergebnis wurde als Fraktion (Annexin A1-positive Makrophagen/Gesamtmakrophagen) angegeben.

Die Messwerte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (*Standard error of the mean*) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitiger ANOVA. Es wurde von der Normalverteilung aller erzeugten Daten ausgegangen. Bei den Tierversuchen lag die Anzahl je Gruppe bei $n=5$. Bei einem $p<0,05$ wurden die Nullhypothese verworfen und die Unterschiede als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Lokalisation von Annexin A1 in Kontrolltieren

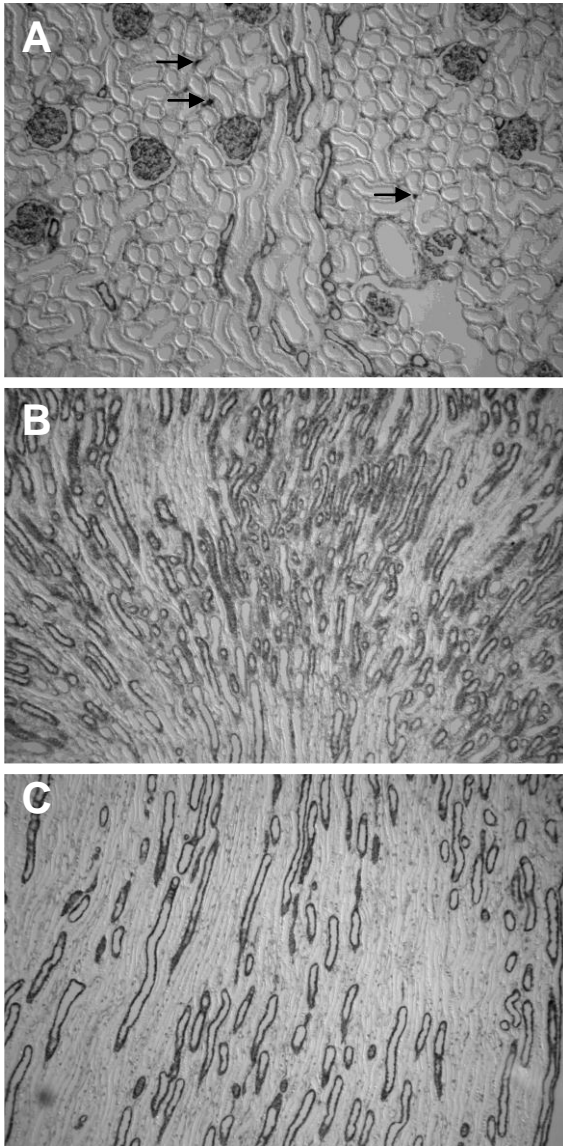


Abb. 1. *Übersichtsaufnahmen zur Darstellung der Annexin A1-Expression in der gesunden Niere der Ratte. Im Kortex (A) zeigt sich ein kräftiges Annexin A1-Signal in den Glomeruli sowie in Teilen des distalen Tubulussystems. Auch interstitielle Zellen weisen eine Annexin A1-Expression auf (Pfeile). Im äußeren (B) sowie im inneren Mark der Niere (C) weisen vorzugsweise epitheliale Strukturen eine starke Signalintensität für Annexin A1 auf. Immunhistochemie an 4 µm dicken Paraffinschnitten, ursprüngliche Vergrößerung x100. Diese Abbildungen wurden von Dr. A. Paliege zur Verfügung gestellt.*

Die Immunhistochemie zeigte eine glomeruläre Expression von Annexin A1 in den Podozyten und den Zellen der Bowman'schen Kapsel. Eine tubuläre Expression fand sich im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, der Macula densa sowie dem Sammelrohr. Die deutliche vaskuläre Expression von Annexin A1 zeigte sich in den Endothelzellen der Arteriae arcuatae. In den peritubulären Kapillaren ließ sich kein Signal nachweisen (Abb. 1 und 2).

Im Interstitium des Nierenkortex wurden regelmäßig Annexin A1-positive Zellen mit der Immunhistochemie dargestellt (Abb. 1 und 2). Um diese Zellen zu identifizieren, wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen Annexin A1, ED1 (Makrophagen), MHC II (dendritische Zellen), CD73 (Fibroblasten) und RECA (Endothelzellen) durchgeführt.

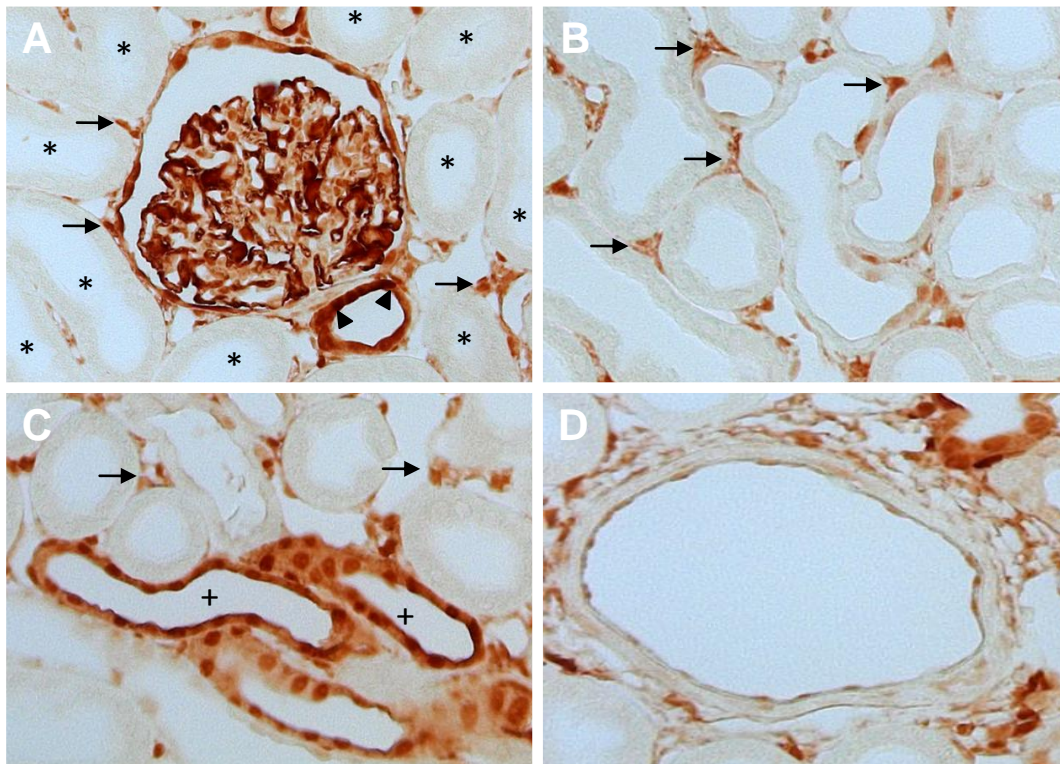


Abb. 2. Detailaufnahmen zur Darstellung der Annexin A1-Expression im renalen Kortex der Ratte. In A weisen die Glomeruli, mit Podozyten und Bowman'scher Kapsel, und die angrenzende Macula densa (Dreiecke) ein starkes Signal für Annexin A1 auf. Proximale Tubuli sind negativ (*). Periglomerulär und peritubulär zeigen interstitielle Zellen, ein intensives Signal (Pfeile in A-C). Auch der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife (+ in C) weist ein kräftiges Annexin A1-Signal auf. Größere Gefäße (D), wie die Arteriae arcuatae, werden von schwach Annexin A1-positiven Endothelzellen ausgekleidet. Immunhistochemie an 4 µm dicken Paraffinschnitten, ursprüngliche Vergrößerung x400 (A-D).

4.2 Identifizierung der Annexin A1-exprimierenden Zellen in Kontrolltieren

4.2.1 CD73

Die Identifizierung von Fibroblasten erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbungen für CD73, welches von den Fibroblasten exprimiert wird (Kaissling 1994, 2008, Meran 2011). Der überwiegende Teil der tubulointerstitiellen Zellen zeigte ein kräftiges Signal für CD73 (Abb. 3). Diese Zellen wiesen zudem typische Formen von Fibroblasten auf, wie trianguläre Zellkörper mit feinen Zellausläufern, welche sich über lange Distanzen ausstrecken (Kaissling 1996). In der Doppelfärbung für Annexin A1 und CD73 zeigten alle CD73-positiven Zellen ebenfalls Annexin A1-Positivität (Abb. 3). Ob die Fibroblasten peritubulär, perivaskulär oder periglomerulär lokalisiert waren, schien hierbei keinen Einfluss auf die Annexin A1-Expressionsstärke zu haben.

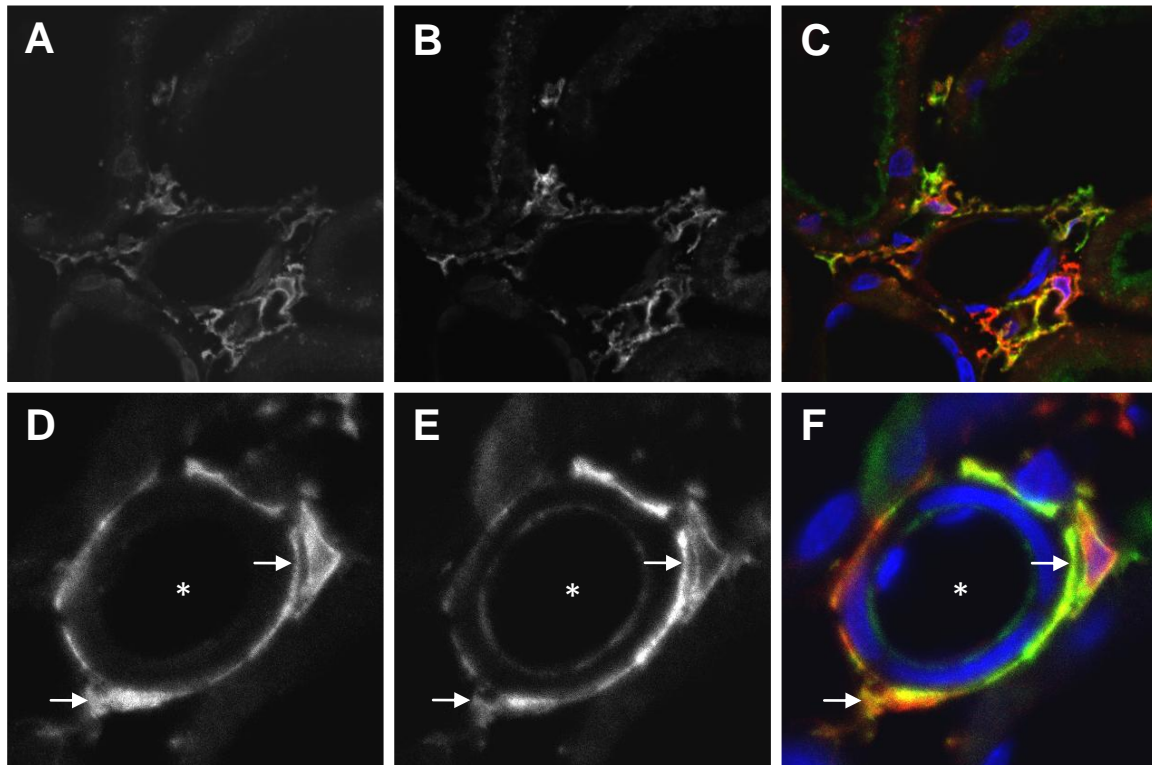


Abb. 3. Doppelmarkierung für Annexin A1 und CD73 in interstitiellen kortikalen Zellen der gesunden Niere der Ratte.

Peritubuläre (A) und perivaskuläre interstitielle Zellen (D) zeigen eine Annexin A1-Expression. Die gleichen Zellen zeigen in B und E ein ausgeprägtes Signal für CD73. Die Doppelmarkierung für Annexin A1 (rot) und CD73 (grün) zeigt eine klare Kolokalisation beider Signale sowohl in peritubulären (C), als auch perivaskulären Zellen (Pfeile in F). Arteriole durch * gekennzeichnet (D-F). Doppelfärbung an 4 µm dicken Cryostatschnitten. Ursprüngliche Vergrößerung ca. 400x. Kernfärbung mit DAPI.

4.2.2 MHC II und ED1

MHC II wird von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. In der gesunden Niere sind dies überwiegend dendritische Zellen, die im peritubulären Interstitium vorkommen und ortständige Immunzellen darstellen. In weitaus kleinerer Anzahl kommen des Weiteren einzelne Makrophagen vor allem in der Nähe von Gefäßen oder in Glomeruli vor (Kaissling 1996, 2008). Das Vorkommen dieser immunologisch aktiven Zellen im renalen Interstitium wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung für MHC II bestätigt.

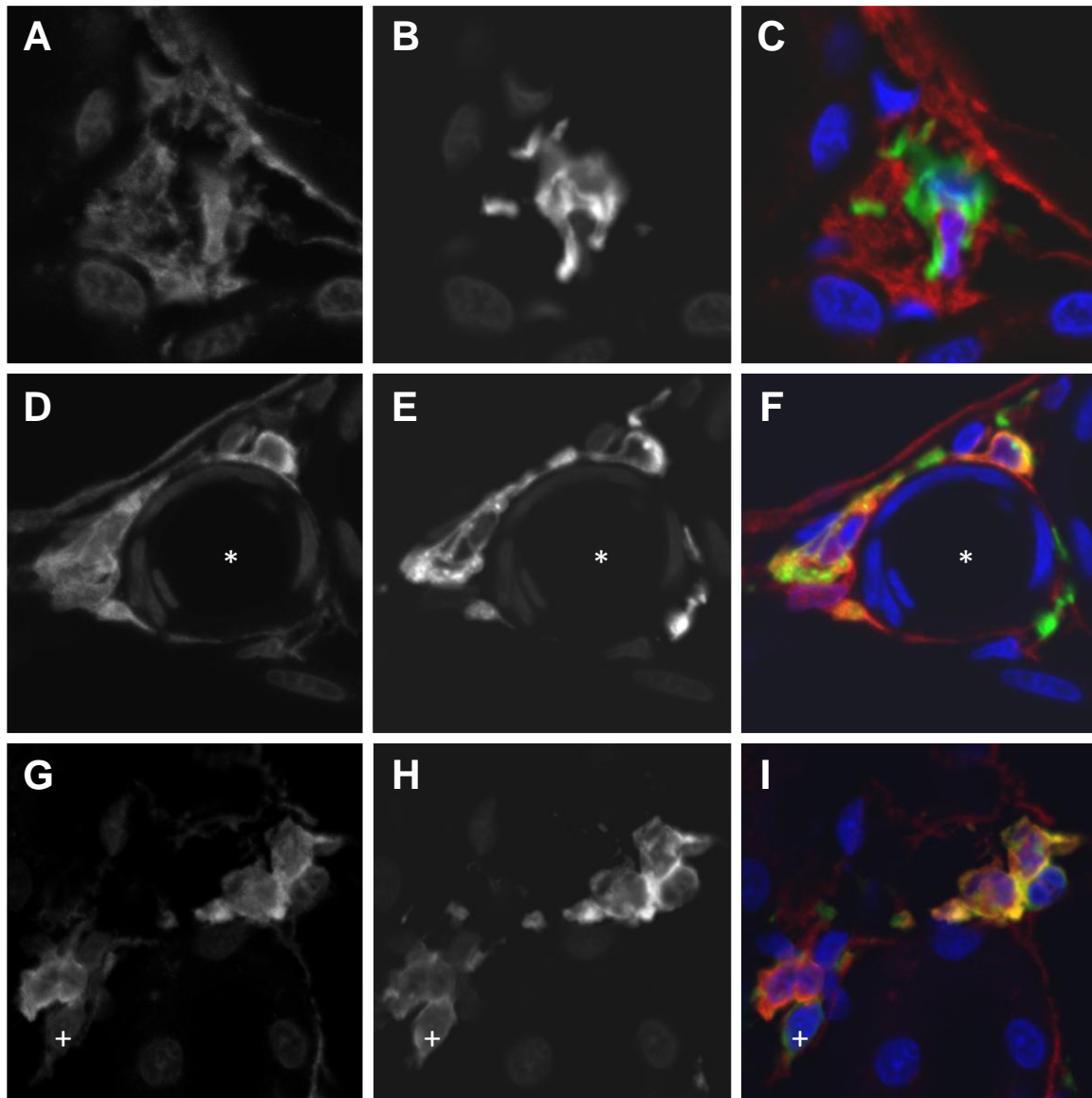


Abb. 4. Doppelmarkierung für Annexin A1 und major histocompatibility complex II (MHC II) (A-F), sowie Annexin A1 und ED1 (G-I) in interstitiellen kortikalen Zellen der gesunden Niere der Ratte. Interstitielle Zellen zeigen in allen Schnitten (A, D, G) ein starkes zytoplasmatisches Signal für Annexin A1. Peritubuläre Zellen zeigen ein zytosolisches Signal für MHC II (B). Die Doppelmarkierung für Annexin A1 (rot) und MHC II (grün) in C zeigt die klare Separation beider Signale. Mehrere perivaskuläre Zellen weisen ein kräftiges Signal für MHC II auf (E). In F zeigt sich hingegen die klare Kolokalisation beider Signale in den peritubulären Zellen (Arteriole durch * gekennzeichnet in D-F). Mehrere interstitielle Zellen zeigen ein intensives Signal für ED1 (H). In der Doppelmarkierung für Annexin A1 (rot) und ED1 (grün) zeigt sich die klare Kolokalisation fast aller ED1-positiven Zellen mit dem Annexin A1-Signal (I). Eine ED1-positive Zelle am unteren Bildrand zeigt jedoch keine Kolokalisation mit Annexin A1 (+). Doppelfärbung an 4 µm dicken Cryostatschnitten. Ursprüngliche Vergrößerung ca. 400x. Kernfärbung mit DAPI.

Die Identifikation der dendritischen Zellen und Makrophagen erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung für MHC II und ED1 (Abb. 4). Die große Mehrzahl der MHC II-exprimierenden Zellen fand sich peritubulär und zeigte charakteristische Eigenschaften ortständiger dendritischer Zellen, wie ein rundliches Perikaryon mit

dendritischen Ausläufern. Vereinzelt zeigten perivaskuläre und periglomeruläre Zellen ein Signal, die von der Form und Lokalisation her wahrscheinlich Makrophagen waren. Mittels der Färbung für MHC II war jedoch keine sichere Differenzierung zwischen dendritischen Zellen und Makrophagen möglich, da dieses von beiden Zelltypen exprimiert wird. Es erfolgte daher eine weitere Färbung mit ED1, welches ein spezifischer Makrophagenmarker ist (Abb. 4) (Dijkstra 1985). ED1-positive Zellen kamen, im Gegensatz zu den MHC II-positiven Zellen, nur in geringem Maße in dem gesunden renalen Tubulointerstitium vor. Der größte Anteil dieser Zellen befand sich periglomerulär und perivaskulär.

Zur weiteren Charakterisierung der dendritischen Zellen und Makrophagen bezüglich ihrer Annexin A1-Expression wurde eine Doppelfärbung für Annexin A1 und MHC II bzw. ED1 (Abb. 4) im kortikalen Interstitium durchgeführt. Hier zeigte sich in der überwiegenden Mehrzahl keine Expression von Annexin A1 in MHC II-positiven Zellen. Annexin A1-positive, MHC II-coexprimierende Zellen fanden sich in geringer Zahl überwiegend im perivaskulären Interstitium sowie in unmittelbarer Nähe zu den Glomeruli. Diese Zellen wurden mittels einer Doppelfärbung für Annexin A1 und ED1 als Makrophagen identifiziert (Abb. 4). So scheint ein gewisser Anteil der renalen Makrophagen Annexin A1 zu exprimieren, dendritische Zellen eher nicht.

4.2.3 RECA

Anhand einer Immunfluoreszenzfärbung für RECA wurden in dieser Arbeit Endothelzellen identifiziert. Alle Endothelzellen unabhängig der Gefäßgröße bzw. -art zeigten ein kräftiges Signal für RECA (Abb. 5).

Mittels Doppelfärbung für Annexin A1 und RECA wurde zudem die Annexin A1-Expression von Endothelzellen untersucht. Hierdurch konnten die Ergebnisse unserer ersten immunhistochemischen Versuche, in denen Endothelzellen der großen Gefäße Annexin A1 exprimierten, bestätigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen der Kapillaren, peritubulär oder glomerulär, der kleineren Arteriolen und der Vasa recta keine Annexin A1-Expression aufweisen (Abb. 5). Venöse Gefäße stellten sich unabhängig ihrer Größe als Annexin A1-negativ dar (Daten nicht dargestellt).

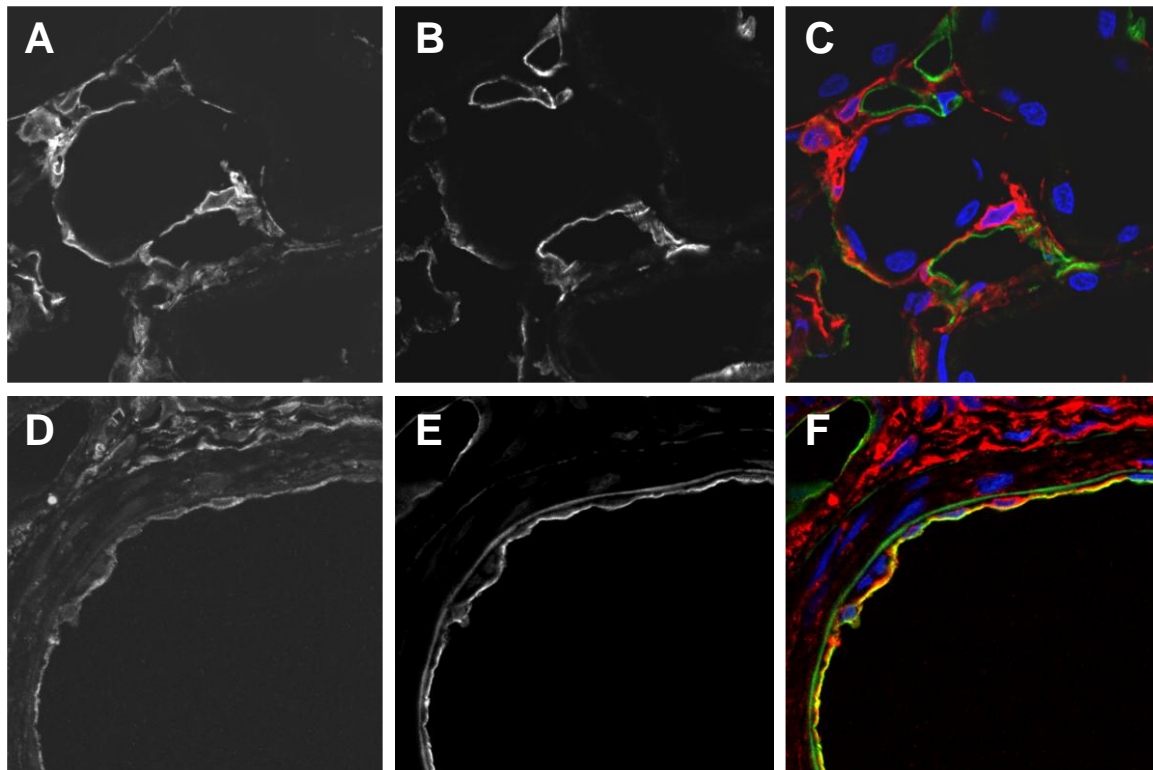


Abb. 5. Doppelmarkierung für Annexin A1 und rat endothelial cell antigen 1 (RECA) im renalen Kortex der gesunden Niere der Ratte.

Mehrere interstitielle Zellen weisen peritubulär ein starkes Signal für Annexin A1 auf (A). Zellen der großen renalen Gefäße zeigen ein Signal für Annexin A1 (D). Die Endothelzellen der kleinen (B) und großen Gefäße (E) weisen eine Expression von RECA auf. Die Doppelmarkierung für Annexin A1 (rot) und RECA (grün) zeigt in den kleinen peritubulären Gefäßen eine klare Separation beider Signale (C). In den großen Gefäßen hingegen zeigt sich eine klare Kolokalisation beider Signale (F). Doppelfärbung an 4 µm dicken Cryostatschnitten. Ursprüngliche Vergrößerung ca. 400x. Kernfärbung mit DAPI.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Fibroblasten Annexin A1 exprimieren. Auch ein Teil der in der gesunden Niere vorkommenden Makrophagen exprimieren Annexin A1. Dendritische Zellen hingegen exprimieren kein bzw. nur geringe Mengen Annexin A1. Endothelzellen der größeren Gefäße weisen wiederum eine Annexin A1-Expression auf, währenddessen die der Arteriolen, Kapillaren und aller venösen Gefäße keine Expression zeigen.

4.3 Anti-Thy-1 Nephritis

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Makrophagen in der gesunden Niere eine relevante Quelle für Annexin A1 darstellen. In einem nächsten Versuchsschritt wurde die Veränderung dieser Annexin A1-exprimierenden Zellen im Verlauf einer Entzündungsreaktion untersucht. Hierzu wurden in Versuchstieren eine

anti-Thy-1 Nephritis induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Nephritis die renalen Makrophagen bezüglich deren Annexin A1-Expression analysiert und quantifiziert.

4.3.1 Veränderung der Proteinurie im Verlauf der Nephritis

Zum Nachweis der glomerulären Schädigung erfolgte zunächst die Quantifizierung der Proteinurie (Abb. 6). Die Ergebnisse zeigten, dass es im Rahmen der Nephritis zu einer Zunahme der Proteinurie kam. So zeigte sich 5 Tage nach Induktion der Nephritis eine signifikante Zunahme (Kontrolle: $2,4 \pm 0,6$ mg/24h; 5d: $13,8 \pm 1,5$ mg/24h; $p < 0,05$). Nach 15 Tagen kam es zu einer signifikanten Verminderung der Proteinurie im Vergleich zu dem Wert nach 5 Tagen ($6,6 \pm 0,7$ mg/24h; $p < 0,05$).

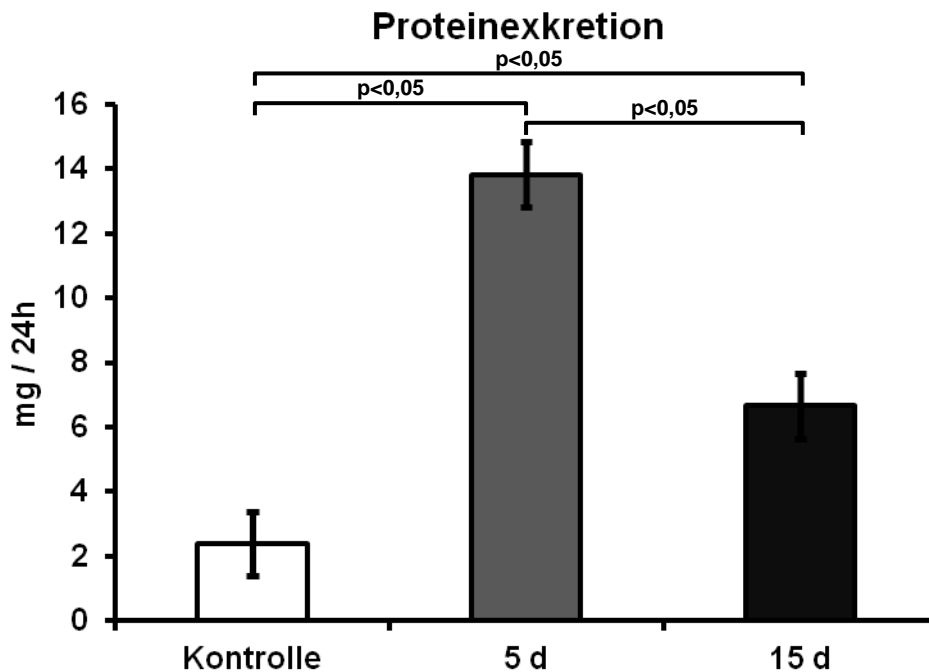


Abb. 6. Proteinurie im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis.

Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der Proteinurie nach 5 Tagen im Vergleich zu den Kontrollen. Nach 15 Tagen ist die Exkretion im Vergleich zu den Kontrolle weiterhin signifikant erhöht. Jedoch ist es im Vergleich zu den Werten nach 5 Tagen zu einem signifikanten Rückgang gekommen.

4.3.2 Glomeruläre Ablagerung des THY1-Antikörpers im Verlauf der Nephritis

Zur Identifizierung der Antikörper-Ablagerung wurde eine direkte Immunfluoreszenzfärbung für den THY1-Antikörper im Verlauf der Nephritis (Kontrolle, sowie 24h, 5d und 15d nach Antikörperinjektion) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten

die Ablagerungen des Antikörpers in den jeweiligen Stadien (Abb. 7): In der Kontrolle konnte kein mesangiales Signal detektiert werden. Nach 24 Stunden konnte ein ausgeprägtes mesangiales Fluoreszenzsignal des Antikörpers festgestellt werden. Diese starke Signalintensität zeigte sich im weiteren Verlauf der Nephritis mit dem Beginn der Antikörperelimination abnehmend. Nach 5 Tagen war weiterhin ein deutliches, jedoch, im Vergleich zu den 24 Stunden nach Injektion, schwächeres Signal zu detektieren. Nach 15 Tagen zeigte sich kein Signal des Antikörpers mehr.

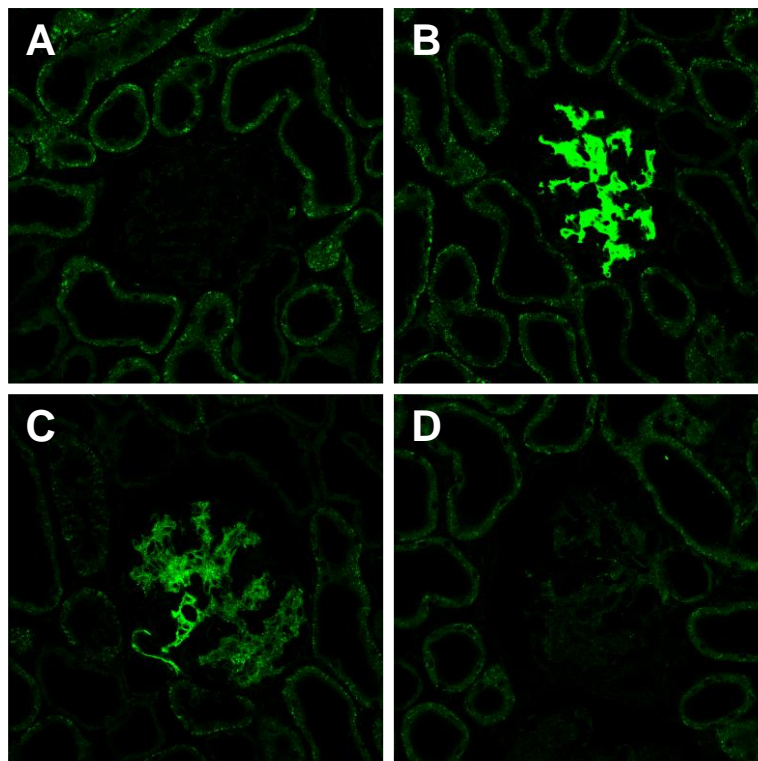


Abb. 7. Direkte Immunfluoreszenzfärbung für Maus-IgG zum Nachweis des THY1-Antikörpers im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis

In der Kontrollgruppe zeigt sich kein mesangiales Signal (A). 24 Stunden nach Injektion des Antikörpers zeigt sich ein starkes mesangiales Signal (B). Nach 5 Tagen zeigt sich eine Abschwächung des Signals (C). 15 Tage nach Injektion ist kaum noch Signal zu erkennen (D). Färbung an 4 μ m dicken Cryostatschnitten. Ursprüngliche Vergrößerung ca. 100x.

4.3.3 Morphologische Veränderungen im Verlauf der Nephritis

Zur Analyse der pathologischen glomerulären und interstitiellen Veränderungen im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis und zum Beleg der Funktion des Tiermodells, wurden im nächsten Schritt PAS-gefärbte Schnitte untersucht (Abb. 10 und 11).

Es zeigten sich in den Kontrolltieren gesunde Glomeruli mit einer normalen Architektur und ohne Zeichen von Sklerose. Auch der periglomeruläre Raum und das

Tubulointerstitium zeigte keine pathologischen Auffälligkeiten. 24 Stunden nach Injektion des Antikörpers konnten eine beginnende Mesangiolyse mit Volumenzunahme des kapillären Gefäßknäuels sowie hierbei vermehrt in das Lumen prolabierte Podozyten dargestellt werden. 5 Tage nach Injektion zeigte sich eine hochgradig veränderte Architektur der Glomeruli, welche mit einer weiteren Zunahme der mesangialen Matrix einherging. Hierbei kam es vermehrt zur Bildung von sog. mesangialen Ballonierungen, welche mit der fast vollständigen Ausfüllung eines Glomerulums mit mesangialer Matrix und einem starken Rückgang der Kapillardichte einhergingen. In selteneren Fällen zeigten sich sog. lobuläre Aneurysmen, welche pathologische Aufdehnungen einzelner Abschnitte der Kapillaren in einem Glomerulum entsprechen. Des Weiteren konnten vermehrt Adhäsionen zwischen Bowman'scher Kapsel und dem Schlingenkonvolut festgestellt werden. 15 Tage nach Injektion zeigte sich ein, verglichen zu den anderen Zeitpunkten, inhomogenes Bild von weit fortgeschrittener Inflammation mit vollständig zerstörten und atrophen Glomeruli bis hin zu Glomeruli mit stattgefundener Defektheilung mit zentralen narbigen Residuen. Wenige Glomeruli zeigten das Bild einer kompletten Remission.

Interstitiell konnte 24 Stunden nach Injektion des Antikörpers im Gegensatz zu den glomerulären Veränderungen nur eine minimale Reaktion auf die Nephritis festgestellt werden. Weitestgehend zeigte sich ein physiologisches Tubulointerstitium wie in den Kontrolltieren. Glomeruli und Tubuli waren in einem zarten Netzwerk aus interstitiellen Zellen eingebettet. Nach 5 Tagen zeigten sich Veränderungen des renalen Interstitiums. Es kam zu einer deutlichen Expansion des tubulointerstitiellen Raumes mit einer Zunahme der zellulären Bestandteile, vornehmlich bedingt durch die Infiltration von Leukozyten. Zudem zeigte sich neben der starken Zunahme der interstitiellen Zellzahl auch ein signifikanter Anstieg der extrazellulären Matrix. Auch traten nun gehäuft Areale mit abgestorbenen Tubulusbestandteilen auf, in denen sich neben der extrazellulären Matrix nur noch wenig vitale Zellen abgrenzen ließen. Diese Ergebnisse veranschaulichen den Übertritt der anfänglichen rein glomerulären Inflammation zu einer, welche auch das Interstitium betrifft. 15 Tage nach Injektion zeigte sich ein recht inhomogenes Bild mit Gebieten der Inflammation und Gewebszerstörung neben solchen mit komplett oder narbig regenerierten Parenchymstrukturen.

4.3.4 Makrophagen im Verlauf der Nephritis

Zur Analyse der Veränderung der Makrophagenanzahl im renalen Interstitium im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis wurde eine immunhistochemische Färbung für ED1 durchgeführt (Abb. 10 und 11).

In den Glomeruli der Kontrollgruppe (Abb. 8 und 10) zeigten sich nur wenige Makrophagen ($1,5 \pm 0,1$ Makrophagen/Glomerulum). 24 Stunden nach Antikörper-Injektion nahm die Anzahl der glomerulären Makrophagen im Rahmen der beginnenden anti-Thy-1 Nephritis signifikant zu ($8,9 \pm 0,7$ Makrophagen/Glomerulum; $p < 0,05$). Nach 5 Tagen zeigte sich diese Anzahl wiederum signifikant rückläufig ($6,0 \pm 0,2$ Makrophagen/Glomerulum; $p < 0,05$). Zudem zeigten sich nun zunehmend Makrophagen im periglomerulären Bereich im Rahmen der beginnenden Mitbeteiligung des Tubulointerstitiums. 15 Tage nach Injektion stellte sich wie im letzten Absatz beschrieben ein inhomogenes Bild mit starker glomerulärer Schädigung einerseits und regenerierten Glomeruli andererseits dar. In den stark geschädigten Glomeruli zeigten sich die Makrophagen zahlenmäßig ähnlich stark vertreten wie 5 Tage nach Antikörperinjektion. In Arealen ohne nekrotischer Parenchymanteile kam es zu einem weiteren Rückgang der Makrophagen, sodass Werte ähnlich denen der Kontrolle erreicht wurden. Im Mittel zeigte sich eine signifikante Abnahme der Anzahl im Vergleich zum Tag 5 ($4,3 \pm 0,2$ Makrophagen/Glomerulum; $p < 0,05$).

Im Interstitium (Abb. 9 und 11) zeigte sich in den Kontrollen eine geringe Anzahl von Makrophagen (30 ± 2 Makrophagen/Gesichtsfeld, 40x). Mit Beginn der glomerulären Inflammation zeigte sich hier eine signifikante Abnahme der Makrophagenanzahl (20 ± 1 Makrophagen/Gesichtsfeld; $p < 0,05$). Nach 5 Tagen kam es im Vergleich zu dem Ausgangswert zu einem signifikanten Anstieg, welcher mit einer Affektion des Interstitiums im Verlauf der Nephritis vereinbar ist (75 ± 3 Makrophagen/Gesichtsfeld; $p < 0,05$). Nach 15 Tagen zeigte sich ein weiterer signifikanter Anstieg der gesamten interstitiellen Makrophagen (117 ± 11 Makrophagen/Gesichtsfeld; $p < 0,05$). In Bereichen mit starker Inflammation wurden massive Ansammlungen der beschriebenen Zellen nachgewiesen. In Gebieten mit fast vollständiger eingetretener *Resolution* und wiederhergestellter Architektur des Parenchyms zeigte sich hingegen ein Rückgang der Anzahl der Makrophagen fast auf den Wert der Kontrolltiere.

Insgesamt zeigte sich die Zahl der interstitiellen Makrophagen nach Antikörperinjektion mit Dauer der Nephritis ansteigend, die der glomerulären Makrophagen hingegen fallend.

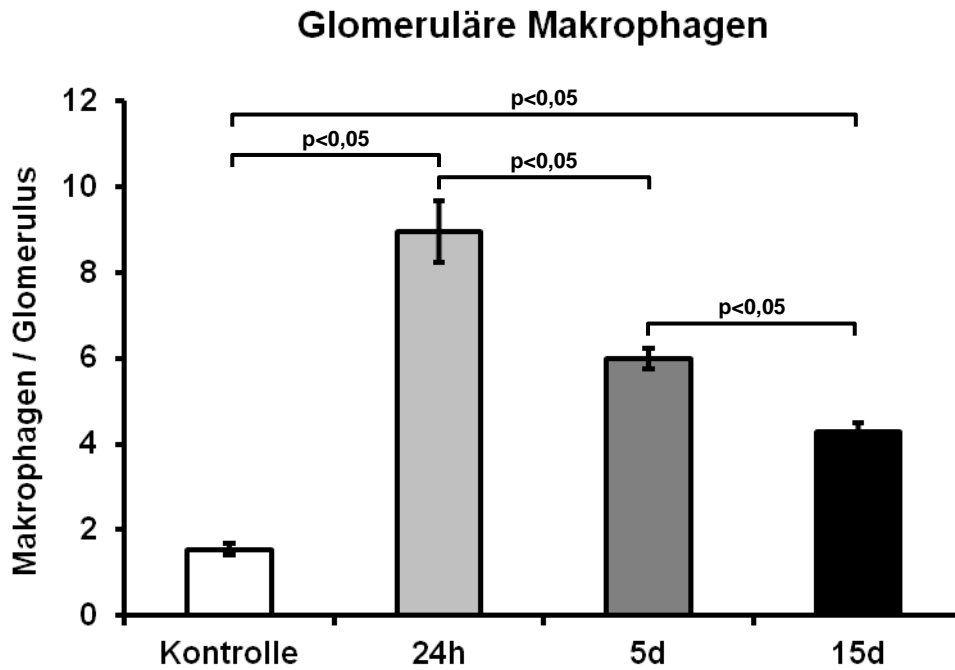


Abb. 8. Dynamik der glomerulären Makrophagen im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der glomerulären Makrophagen 24 Stunden nach Injektion des Antikörpers. Im weiteren Verlauf der Nephritis fällt die Anzahl der glomerulären Makrophagen stetig ab. 15 Tage nach Injektion befinden sich weiterhin signifikant mehr Makrophagen in den Glomeruli als in den Kontrolltieren. Verglichen mit den Zahlen nach 5 Tagen sind diese jedoch signifikant rückläufig. Die Auszählung erfolgte anhand der beschriebenen Färbung für ED1 in histologischen Präparaten.

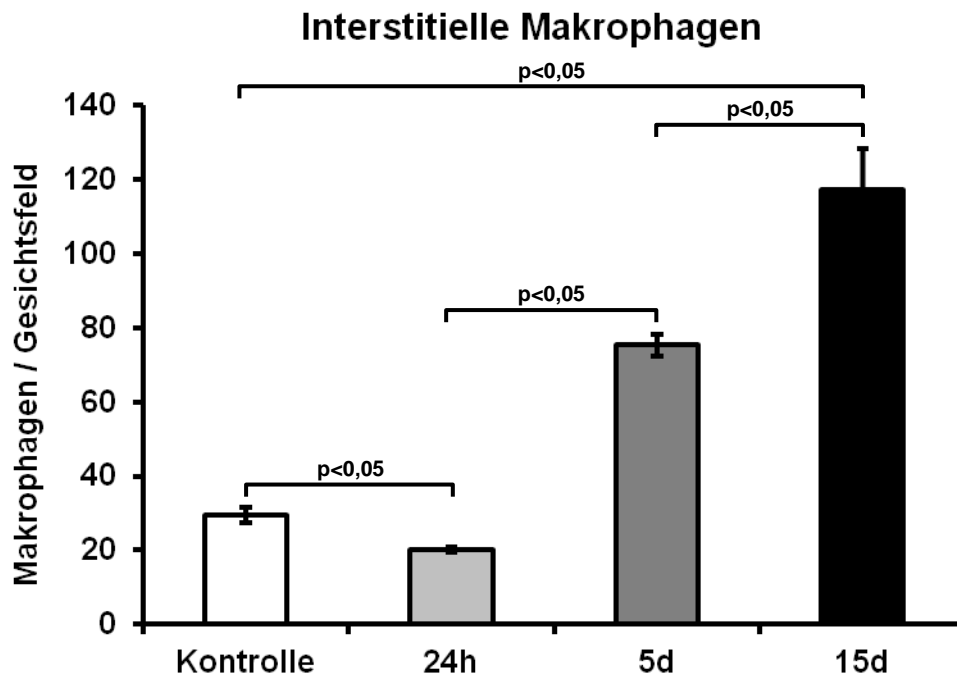


Abb. 9. Dynamik der interstitiellen Makrophagen (ED1-positiv) im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis. Bei den interstitiellen Makrophagen kommt es nach 24 Stunden zu einem signifikanten Rückgang. 5 Tage nach Injektion hingegen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Makrophagen. 15 Tage nach Induktion der Entzündung hat sich die Zahl der Makrophagen vervielfacht. Die Auszählung erfolgte anhand der Färbung für ED1 in histologischen Präparaten.

4.3.5 Annexin A1-Expression im Verlauf der Nephritis

Zur Analyse der Annexin A1-Expression erfolgten Färbungen für Annexin A1 im Verlauf der Nephritis (Abb. 10 und 11).

In den Kontrollen zeigten sich Annexin A1-Signale in den Podozyten, der Bowman'schen Kapsel, dem dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, den Maculae densae und den Sammelrohren. Zudem wies das Mesangium ein schwaches Signal auf. Nach 24 Stunden kam es zu einem Rückgang des Annexin A1-Signals im Mesangium der betroffenen Glomeruli. Die Annexin A1-Expression in den Podozyten zeigte sich als unverändert. Im weiteren Verlauf der Inflammation kam es nach 5 Tagen in den Glomeruli zu einem erneuten Anstieg des Annexin A1-Signals. Neben den Annexin A1-exprimierenden Podozyten wies nun auch das Mesangium ein deutliches Annexin A1-Signal auf. Nach 15 Tagen zeigte sich in den regenerierten Glomeruli eine weitestgehend normale Annexin A1-Expression verglichen mit den Kontrollen. In den Bereichen mit fortgeschrittener Entzündung und Degeneration, sowie in den Bereichen der Defektheilung blieb die erhöhte Annexin A1-Expression im Mesangium bestehen.

Im Tubulointerstitium konnte für die Mehrzahl der interstitiellen Zellen, vor allem Fibroblasten, eine Annexin A1-Expression nachgewiesen werden. Mit Beginn der Nephritis nach 24 Stunden zeigte sich keine Veränderung bezüglich des Annexin A1-Signals. Erst mit Beginn der inflammatorischen Affektion des Tubulointerstitiums nach 5 Tagen kam es zu einem Anstieg der Menge an Annexin A1 besonders in den pathologisch veränderten Bereichen mit den infiltrierenden Leukozyten. Auch in den Bereichen mit abgestorbenen Tubulusbestandteilen zeigte sich ein signifikantes Signal für Annexin A1. Nach 15 Tagen zeigten Bereiche mit parallel ablaufender Inflammation und *Resolution* weiterhin ein deutliches Signal für Annexin A1. Im Vergleich zu dem morphologischen Bild nach 5 Tagen war es nach 15 Tagen zu einer Zunahme dieser Annexin A1-positiven Areale gekommen. In den Bereichen mit abgeschlossener *Resolution* oder Defektheilung zeigten die interstitiellen Zellen ein Signal ähnlich der interstitiellen Zellen in den Kontrollen.

Neben der immunhistochemischen Darstellung der Annexin A1-Expression konnten durch die Bestimmung der Menge an Annexin A1-mRNA mittels TaqMan RT-PCR quantitative Aussagen zur Expression im Verlauf der Nephritis getroffen werden (Abb. 12). Dies erfolgte sowohl mit kortikalem als auch medullärem Gewebe.

Die Ergebnisse der kortikalen Proben zeigten innerhalb der ersten 24 Stunden eine signifikante Zunahme an Annexin A1-mRNA (Kontrolle: $1,5 \pm 0,1$; 24h: $2,9 \pm 0,2$; x-faches der Kontrollen; $p < 0,05$). Nach 5 Tagen zeigte sich eine weitere Zunahme der mRNA auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes der Kontrolltiere ($3,4 \pm 0,3$; x-faches der Kontrollen; $p < 0,05$). Nach 15 Tagen, mit Einsetzen der *Resolution*, zeigten sich erste Anzeichen eines leichten Absinkens dieser Werte im Vergleich zu den 5 Tagen ($2,6 \pm 0,5$; x-faches der Kontrollen; $p > 0,05$). Die Menge an mRNA blieb jedoch weiterhin signifikant erhöht, verglichen mit den Kontrollen ($p < 0,05$).

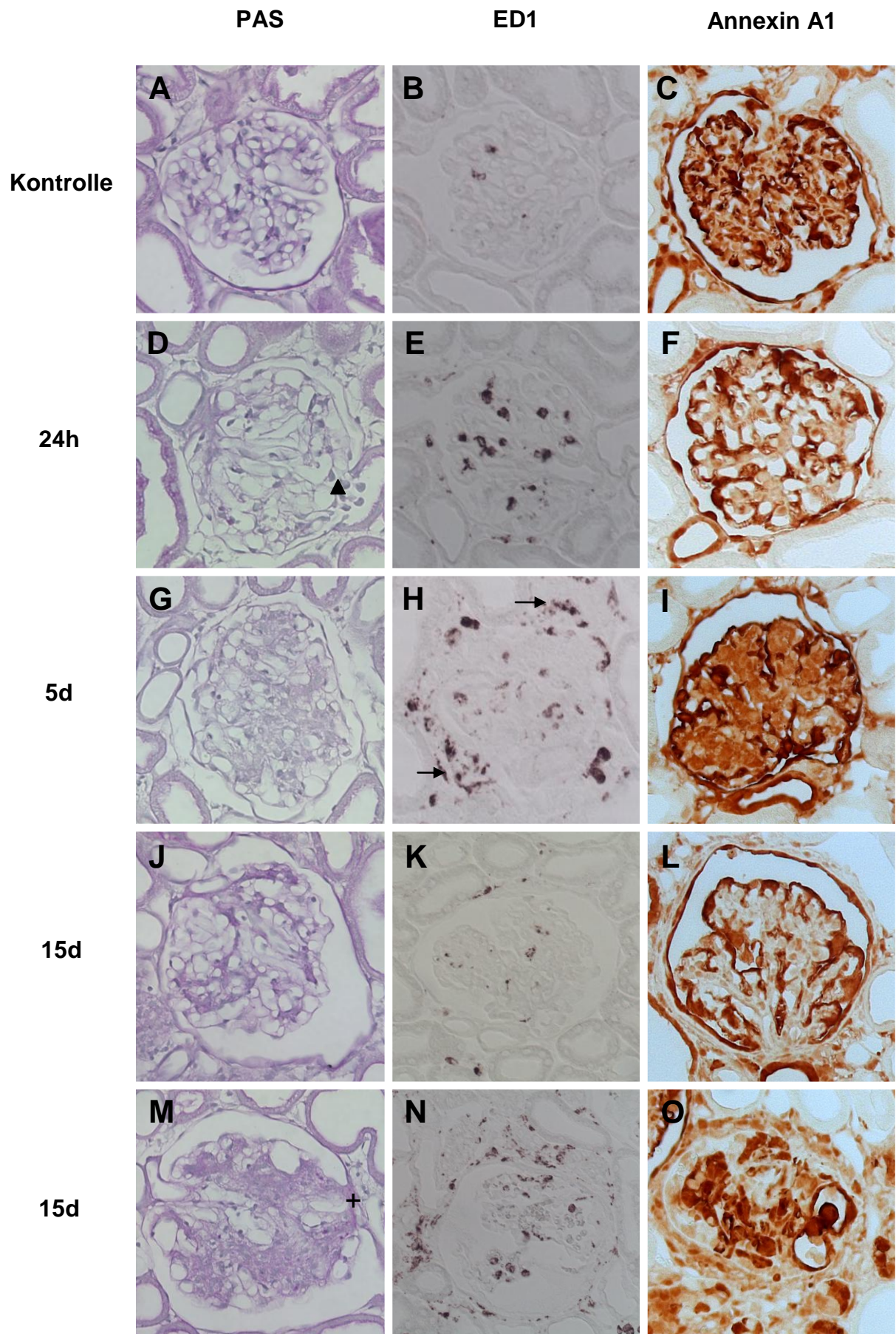


Abb. 10. Darstellung der Veränderungen der glomerulären Morphologie, der Makrophagenanzahl und der Annexin A1-Expression im Verlauf einer anti-Thy-1 Nephritis.

In den Kontrollen zeigt sich eine gesunde renale Architektur mit intakten Glomeruli (A). Die Zahl der glomerulären Makrophagen ist gering (B). Die Expression von Annexin A1 findet sich in Podozyten, der Macula densa und dem Mesangium (C). 24 Stunden nach Injektion erkennt man in das Lumen prolabierte tropfenförmige Podozyten (D, Dreieck). Es kommt zu einer massiven Zunahme der Makrophagenzahl (E). Es zeigt sich ein Rückgang der Signalintensität der Annexin A1-Expression im Mesangium, bei unveränderter Expression in den Podozyten (F). 5 Tage nach Injektion zeigen sich vermehrt inflammatorische Areale mit massiver Matrixansammlung (G). Die Zahl der glomerulären Makrophagen nimmt ab (H), es zeigen sich jedoch nun auch zunehmend Makrophagen im periglomerulären Bereich (Pfeile). In den betroffenen Glomeruli zeigt sich eine erhöhte Expression von Annexin A1 in den mesangialen Zellen (I). Am 15. Tag zeigen sich neben stark geschädigten Glomeruli (M) jetzt auch vermehrt solche mit annähernd normaler Architektur (J). In den stark degenerierten Glomeruli zeigt sich ein starkes Annexin A1-Signal (O), währenddessen es in den ausgeheilten zu einem Rückgang gekommen ist (L). Dies reflektiert sich auch in der Zahl der Makrophagen, deren Anzahl in den entzündeten Glomeruli weiterhin vermehrt ist (N), in den Gebieten der Regeneration jedoch stark zurückgeht (K). In M ist eine Adhäsionen zwischen Bowman'scher Kapsel und dem Schlingenkonvolut zu erkennen (+). PAS-Färbung (A, D, G, J, M) und immunhistochemische Färbung für ED1 (B, E, H, K, N) bzw. für Annexin A1 (C, F, I, L, O) an 4 µm dicken Paraffinschnitten, ursprüngliche Vergrößerung ca. x400.

Die Ergebnisse des äußeren und inneren Markes unterschieden sich stark voneinander. Nach 24 Stunden kam es im äußeren Mark zu einem signifikanten Anstieg der Annexin A1-mRNA, welcher über den gesamten gemessenen Zeitraum bis zum 15. Tag signifikant erhöht blieb (Kontrolle: $1,8 \pm 0,1$; 24h: $2,5 \pm 0,5$; 5d: $2,7 \pm 0,3$; 15d: $2,9 \pm 0,2$; x-faches der Kontrollen; $p < 0,05$). Das innere Mark zeigte keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Menge im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis (Kontrolle: $5,6 \pm 0,3$; 24h: $4,83 \pm 0,6$; 5d: $4,7 \pm 0,4$; 15d: $5,5 \pm 0,6$; x-faches der Kontrollen; $p > 0,05$).

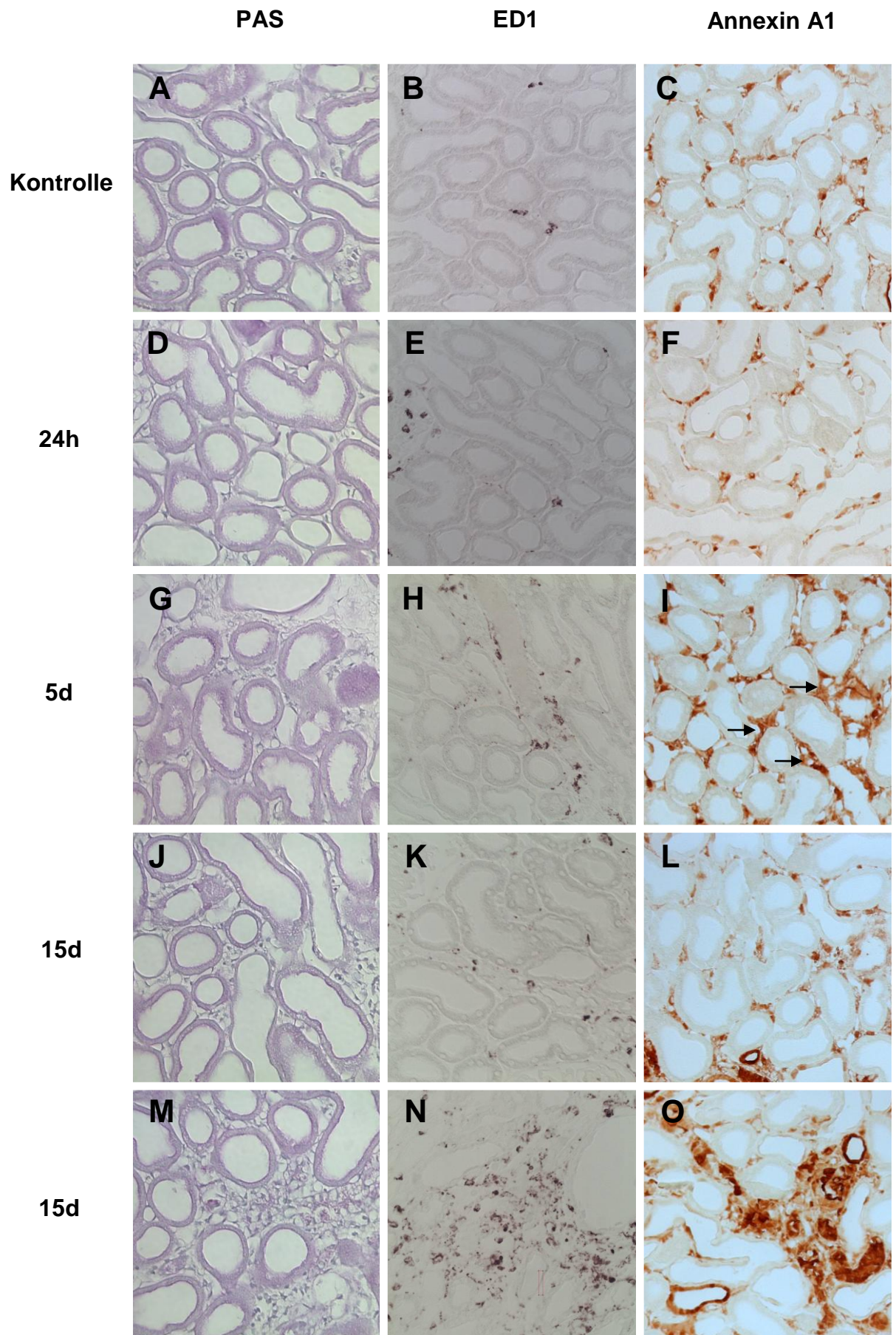


Abb. 11. Darstellung der Veränderungen der renalen Morphologie, der Makrophagenanzahl und der Annexin A1-Expression im Verlauf einer anti-Thy-1 Nephritis im renalen Tubulointerstitium.

Das Interstitium der Kontrolltiere zeigt eine gesunde Architektur (A). Auch die Zahl der ortsständigen Makrophagen ist gering (B). Es ist eine starke Annexin A1-Expression in den interstitiellen Zellen zu erkennen (C). Nach 24 Stunden zeigt sich ein weitestgehend unverändertes Tubulointerstitium (D). Es kommt zu einem signifikanten Rückgang der Makrophagenanzahl (E). Die Annexin A1-Expression erscheint unverändert (F). 5 Tage nach Injektion kommt es zu einer Erweiterung des interstitiellen Raumes durch Zunahme der dortigen Zellzahl (G). Es zeigt sich eine Zunahme der interstitiellen Makrophagenanzahl (H). In den Bereichen dieser Zunahme (I) zeigt sich nun auch eine erhöhte Annexin A1-Expression (Pfeile). Nach 15 Tagen zeigen sich neben den massiven interstitiellen Schäden, welche mit Nekrosen- und Fibrosebildung einhergehen (M) auch Bereiche, in denen ein Rückgang der Inflammation zu verzeichnen ist (J). In den stark geschädigten Bereichen finden sich weiterhin ein Vielzahl von Makrophagen (N), währenddessen in den regenerierten Arealen ein Rückgang dieser zu verzeichnen ist (K). In den Bereichen starker Inflammation zeigt sich zudem eine massiv gesteigerte Expression von Annexin A1 (O). In den schon regenerierten Arealen hingegen zeigt sich ein Signal vergleichbar mit den Kontrollen (L). PAS-Färbung (A, D, G, J, M) und immunhistochemische Färbung für ED1 (B, E, H, K, N) bzw. für Annexin A1 (C, F, I, L, O) an 4 µm dicken Paraffinschnitten, ursprüngliche Vergrößerung ca. x400.

4.3.6 Annexin A1-Expression in Makrophagen im Verlauf der Nephritis

Im Anbetracht der signifikanten Zunahme an Annexin A1 im Rahmen der Nephritis, sowie der Zunahme an Makrophagen, wurde die Zahl der Annexin A1-exprimierenden Makrophagen im Verlauf der Nephritis untersucht. Die obigen Ergebnisse bezüglich der Zunahme der Anzahl der Makrophagen, sowie die morphologischen Veränderung des Nierenparenchyms konnten in diesem Versuch bestätigt werden.

Die Expression von Annexin A1 in den Makrophagen der Glomeruli und des Interstitiums verhielt sich im Verlauf der Nephritis sehr verschieden. So wiesen die glomerulären Zellen zu keiner Zeit eine Annexin A1-Expression auf. Auch nach Zunahme der Zelldichte nach 24 Stunden oder der eintretenden *Resolution* nach 15 Tagen zeigte kein Makrophage ein Signal für Annexin A1.

Die interstitiellen Makrophagen hingegen wiesen im Verlauf der Nephritis eine dynamische Expression von Annexin A1 auf (Abb. 13 und 14). Wie oben beschrieben zeigten die Kontrolltiere nur wenige interstitielle Makrophagen. Weniger als die Hälfte dieser ($41,6\% \pm 1,5\%$) zeigten eine Expression für Annexin A1. 24 Stunden nach Injektion kam es zunächst zu einem nicht signifikanten Rückgang dieses Verhältnisses ($39,6\% \pm 4,4\%$; $p > 0,05$).

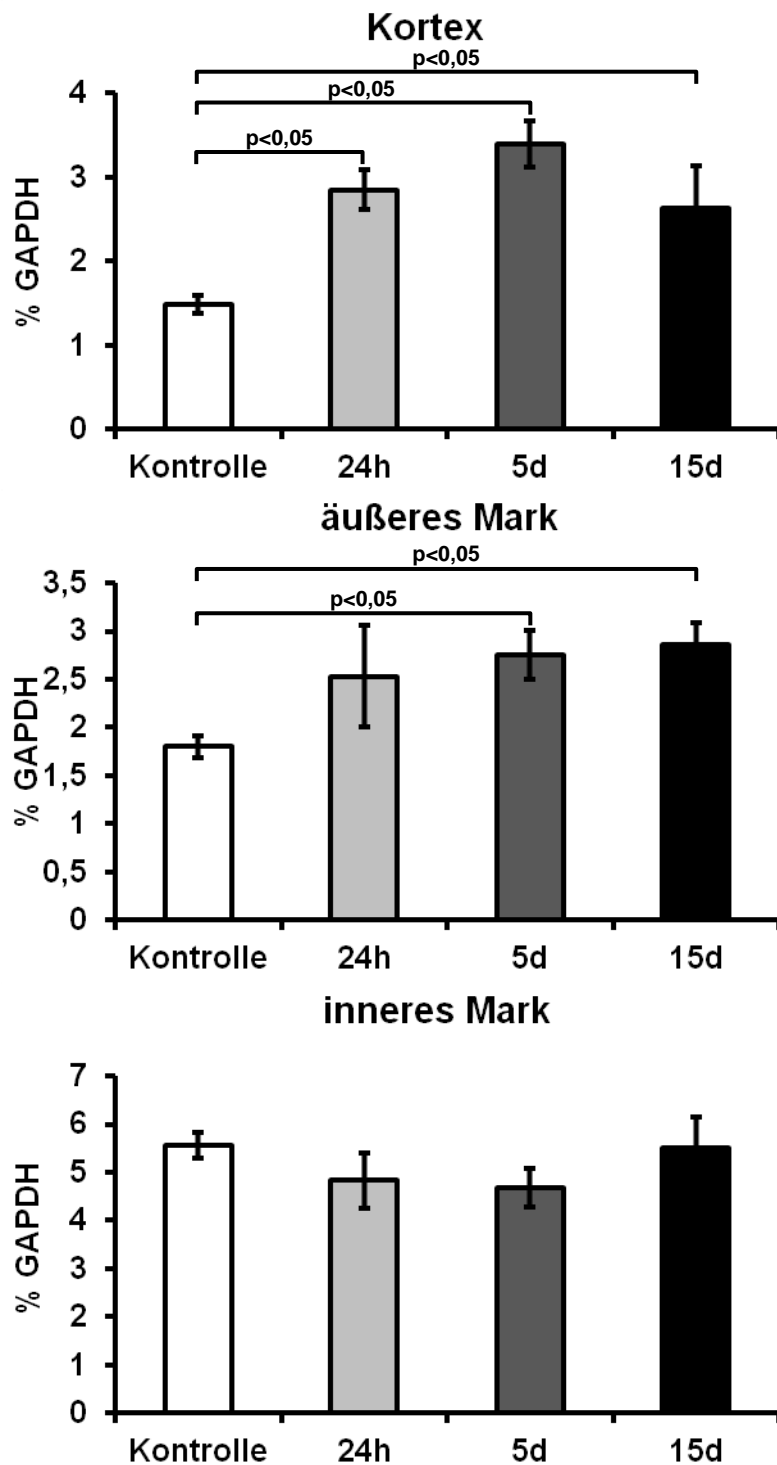


Abb. 12. TaqMan RT-PCR von Annexin A1-mRNA im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis. Im Verlauf der Nephritis kommt es im Kortex und dem äußeren Mark der Niere zu einer signifikanten Zunahme der Annexin A1-mRNA. Im inneren Mark hingegen zeigen sich keine signifikanten Veränderungen der Annexin A1-mRNA.

Nach 5 Tagen, mit dem Beginn der Migration von Makrophagen in das renale Tubulointerstitium, konnten erste Hinweise auf eine beginnende Zunahme von Annexin A1-positiven Zellen/Gesamtmakrophagen gezeigt werden ($45,6\% \pm 1,7\%$; $p > 0,05$). 15

Tage nach Injektion des Antikörpers zeigte sich im Rahmen der nun bestehenden ausgeprägten *Resolution* eine signifikante Zunahme der Annexin A1-exprimierenden interstitiellen Makrophagen/Gesamtmakrophagen ($64,7\% \pm 2,7\%$; $p < 0,05$). Zu diesem Zeitpunkt ergab sich in den Bereichen stärkster Inflammation mit abgestorbenen Parenchymanteilen und Narbenbildung die Schwierigkeit der Quantifizierung der Makrophagen und deren Abgrenzung zu Zelldebris und apoptotischen Zellen, sodass für die Auszählung nur morphologisch klar zu erkennende, intakte Zellen in die Auswertung aufgenommen wurden. Hierdurch ist möglicherweise eine leicht niedrigere Anzahl der Annexin A1-positiven Makrophagen gemessen worden, als tatsächlich vorhanden war.

Die Ergebnisse zeigen, dass es im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis zu einem signifikanten Einstrom von Makrophagen, sowie einer deutlichen Zunahme der Expression von Annexin A1 in kortikalen, interstitiellen Makrophagen kommt.

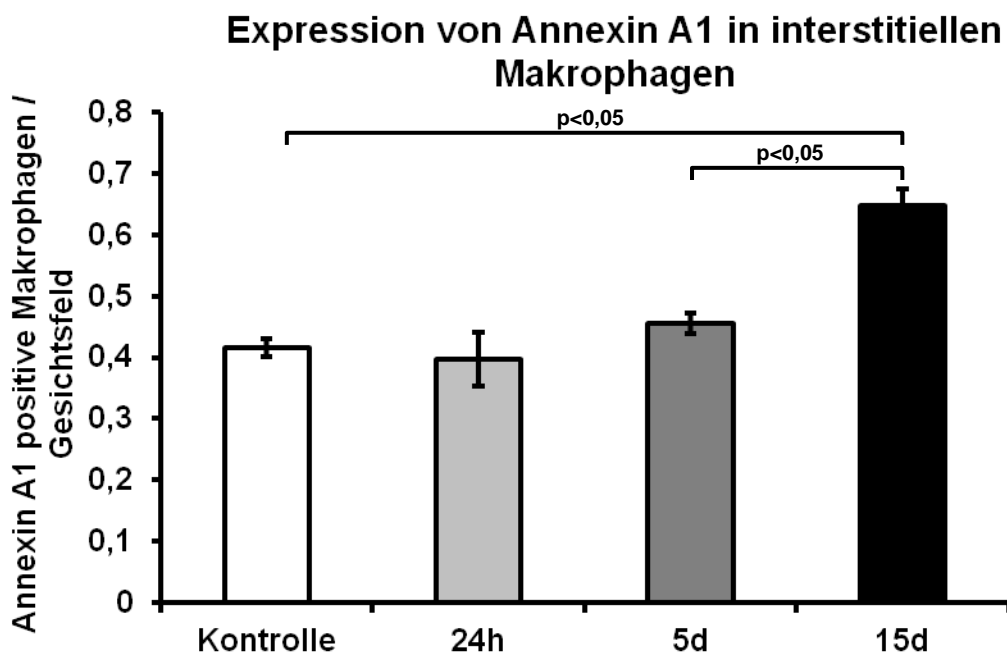


Abb. 13. Expression von Annexin A1 in den interstitiellen Makrophagen im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis.

Im Verlauf der Nephritis kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Annexin A1-exprimierenden interstitiellen Makrophagen. Nach 24 Stunden ist es zu keiner Änderung gekommen. Am 5. Tag zeigt sich eine fokale Zunahme an Annexin A1-exprimierenden Makrophagen, welche sich jedoch als nicht signifikant im Rahmen der Gesamtauswertung darstellt. Eine signifikante Zunahme zeigt sich erst am 15. Tag.

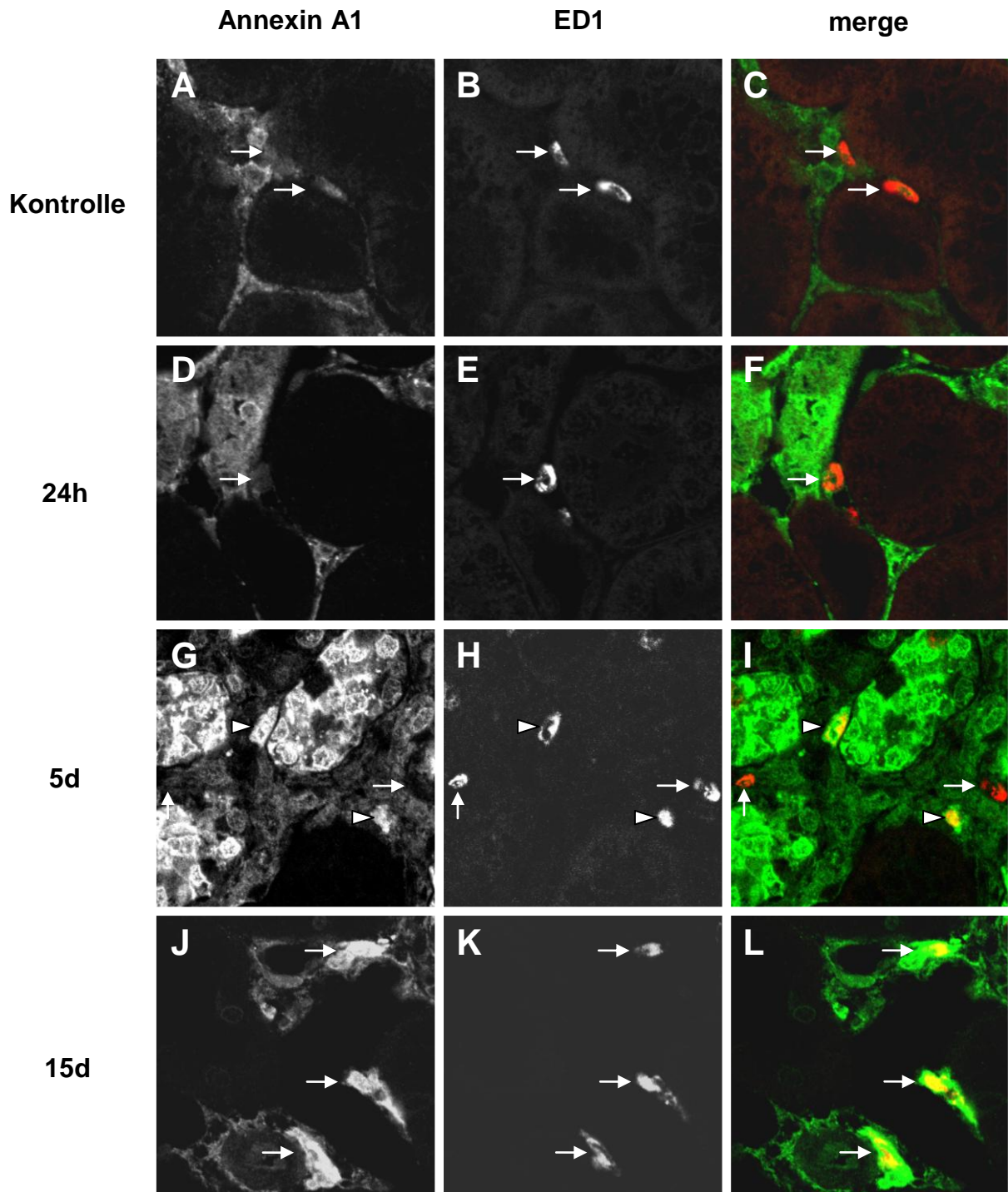


Abb. 14. Doppelmarkierung für Annexin A1 und ED1 des Tubulointerstitium der Niere im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis.

In den Kontrolltieren (A-C) zeigen sich wenige interstitielle, meist Annexin A1-negative, Makrophagen (Pfeile). Nach 24 Stunden (D-F) kommt es im Interstitium zu einem signifikanten Rückgang der Makrophagenanzahl. Die Mehrzahl dieser zeigt weiterhin keine Expression von Annexin A1 (Pfeil). 5 Tage nach Induktion kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Makrophagenanzahl (G-I). Neben Annexin A1-negativen Makrophagen (Pfeile), nehmen Annexin A1-positive Makrophagen (Dreieck) an Zahl zu. Nach 15 Tagen befindet sich weiterhin eine große Anzahl von Makrophagen im Interstitium (J-L). Die Anteil der Annexin A1-positiven Makrophagen (Pfeile) steigt weiter. Doppelfärbung an 4 µm dicken Cryostatschnitten. Ursprüngliche Vergrößerung ca. 400x.

4.4 chronisch fibrosierende Nierenerkrankung

Im Rahmen der Charakterisierung der Annexin A1-exprimierenden interstitiellen Zellen der Niere konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten in der gesunden Niere Annexin A1 exprimieren. In den folgenden Versuchen wurden die Veränderungen der Annexin A1-Expression dieser Zellen im Rahmen einer ausgeprägten Hypertonie-induzierten Nephrosklerose untersucht. Hierzu wurden dTGR verwendet. Hier kommt es durch eine maligne Hypertonie zu fibrotischen und sklerotischen Veränderungen des Parenchyms (Pilz 2005, Luft 1999).

4.4.1 Kollagen 1a2 in doppelt transgenen Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR)

Zur Charakterisierung des Modells der dTGR erfolgte in einem ersten Schritt eine in-situ-Hybridisierung für Kollagen 1a2, welches in großen Mengen in Myofibroblasten produziert wird (Abb. 15).

In den Kontrolltieren zeigte sich kein Signal für Kollagen 1a2. Zudem zeigte sich ein normales Interstitium mit geringer Zelldichte. Im Modell der dTGR hingegen zeigte sich eine Zunahme des tubulointerstitiellen Raumes. Hier kam es in Fibroblasten in der Adventitia arterieller Gefäße zu einer signifikanten Zunahme von Kollagen 1a2. Zudem kam es gehäuft zu zystischen Degeneration der Tubuli. Dies führte hier zu einem Verlust der normalen Struktur und ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme an Kollagen 1a2 in diesen Bereichen. Die Zunahme des tubulointerstitiellen Raumes sowie von Kollagen 1a2 in den Fibroblasten bestätigte unser Modell der dTGR und war mit einer Zunahme der Kollagen 1a2 exprimierenden Myofibroblasten vereinbar.

4.4.2 Expression von Annexin A1 in doppelt transgenen Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR)

Um einen besseren Überblick über die interstitielle Expression von Annexin A1 in den Kontrollen im Vergleich zu den dTGR zu bekommen, folgte eine immunhistochemische Färbung für Annexin A1 in diesen Tieren (Abb. 16). Hierbei zeigte sich eine Zunahme des Annexin A1-Signals in den dTGR, insbesondere in den stark pathologisch veränderten Gebieten des Tubulointerstitiums.

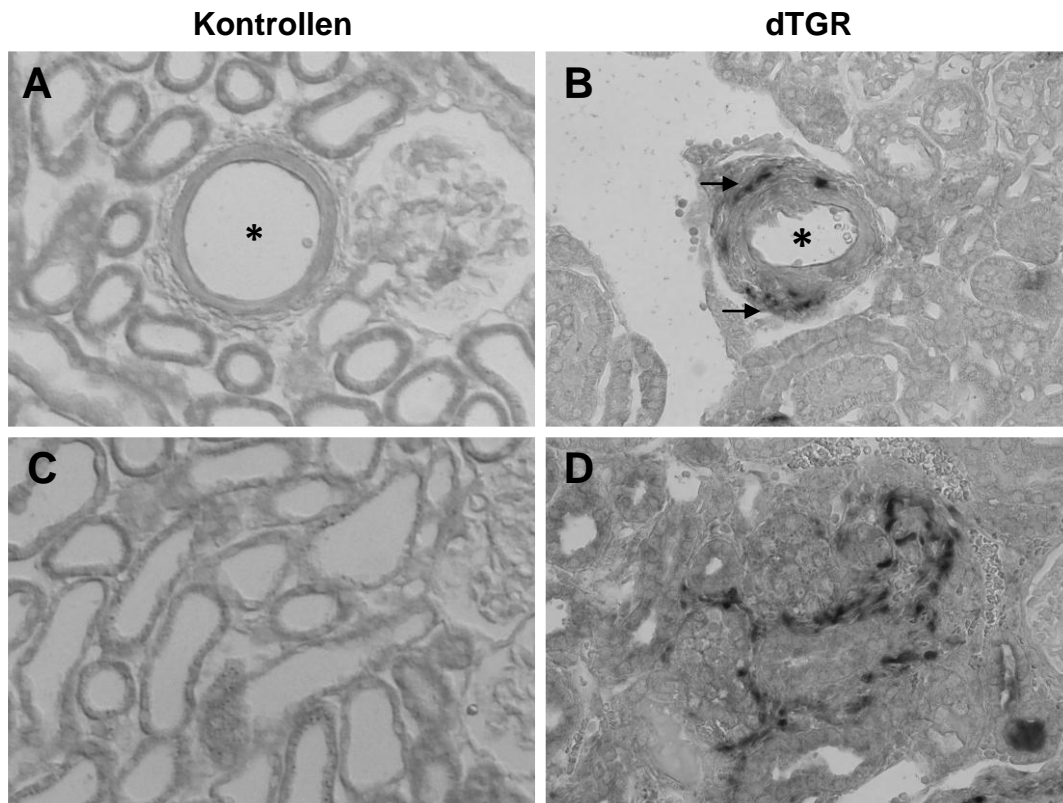


Abb. 15. Darstellung von aktivierten, Kollagen 1a2-exprimierenden Fibroblasten in doppelt transgenen Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR). In den Kontrollen stellen sich die Strukturen des renalen Parenchyms ohne jegliche Schädigungen dar (A, C). Insbesondere die Arteriolen stellen sich unauffällig dar (* in A). Es zeigt sich kein Vorkommen von Kollagen 1a2 in den Zellen des Interstitiums. In den dTGR hingegen zeigt sich eine pathologisch alterierte Architektur mit einem starken Signal für Kollagen 1a2 in fibrotischen Bereichen (B, D). Dies zeigt sich insbesondere perivaskulär (Pfeile in B; * markiert das Lumen des Gefäßes). In-situ-Hybridisierung an 4µm dicken Paraffinschnitten; ursprüngliche Vergrößerung ca. 400x.

4.4.3 Annexin A1-Expression in Fibroblasten in doppelt transgenen Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR)

Zur Analyse der Expression von Annexin A1 in Fibroblasten in den dTGR erfolgten Doppelfärbungen für Annexin A1, α -SMA und CD73.

In der Doppelfärbung für Annexin A1 und CD73 in den dTGR zeigte sich wie auch schon in den Kontrolltieren ein starkes Signal für Annexin A1 in der weit überwiegenden Mehrzahl der Fibroblasten, auch in den fibrotischen Arealen (Abb. 17). Es konnten generell mehr Fibroblasten im peritubulären Raum als in den gesunden Tieren identifiziert werden, welches durch die generell erhöhte peritubuläre Zelldichte in den dTGR zu erklären ist.

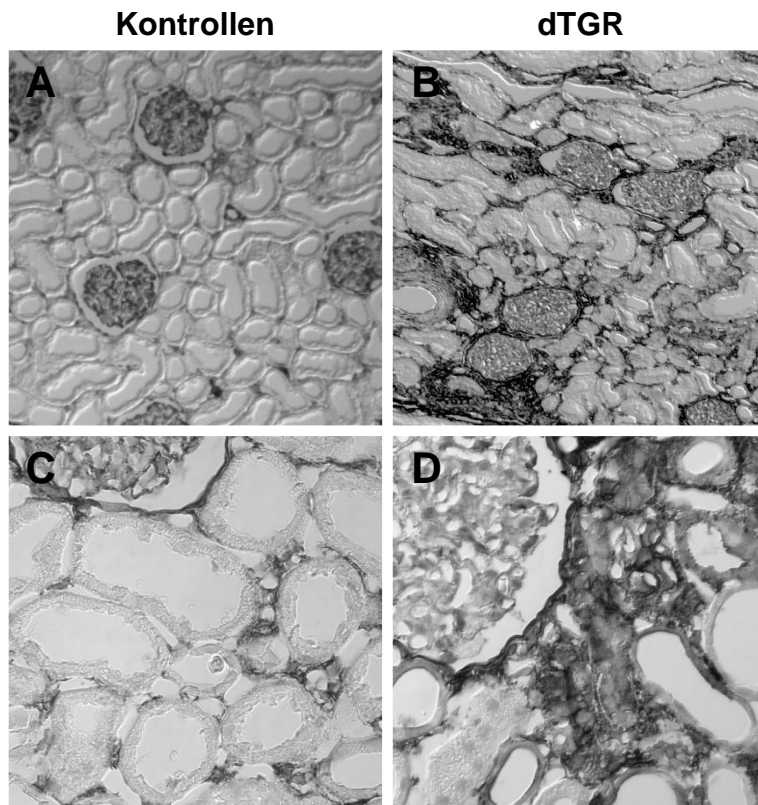


Abb. 16. Darstellung der Annexin A1-Expression im renalen Kortex in doppelt transgenen Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR). In den Kontrolltieren zeigt sich in den interstitiellen Zellen sowie Teilen der Glomeruli das bekannte Annexin A1-Signal (A, C). In den dTGR hingegen zeigt sich, besonders in Bereichen massiver Fibrose, eine deutliche Zunahme der Annexin A1-Expression (B, D). Immunhistochemie an 4 µm dicken Paraffinschnitten. A, B ursprüngliche Vergrößerung 100 x; C, D ursprüngliche Vergrößerung 400x.

Zur Identifizierung der Myofibroblasten erfolgte eine Färbung für α -SMA, welches einen etablierten Marker dieser Zellen darstellt (Kaissling 2008). Im Rahmen der Auswertung zeigten vor allem Zellen in den fibrotisch veränderten Arealen ein kräftiges Signal. Inwieweit Annexin A1 von Myofibroblasten exprimiert wird und diese zu einem gesteigerten Vorkommen von Annexin A1 in den dTGR beisteuern, wurde mittels einer Doppelfärbung für Annexin A1 und α -SMA untersucht (Abb. 18). Es zeigte sich ein starkes Signal für Annexin A1 sowie für α -SMA, insbesondere in fibrotisch umgewandelten Arealen. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle konnte hier jedoch keine Kolo-kalisation der beiden Signale gezeigt werden.

So zeigen diese Ergebnisse, dass Myofibroblasten deutlich weniger Annexin A1 als ruhende Fibroblasten exprimieren. Fibroblasten hingegen weisen auch nach einem fibrotischen Stimulus weiterhin eine hohe Annexin A1-Expression auf.

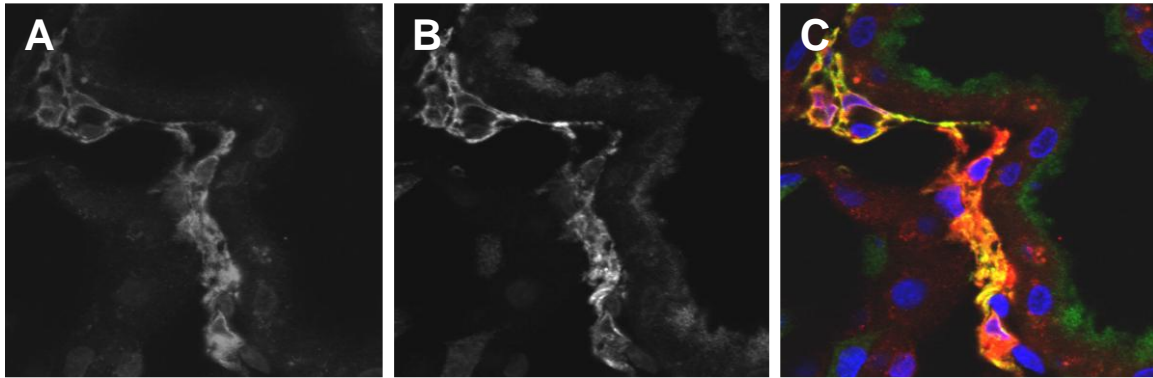


Abb. 17. Doppelmarkierung für Annexin A1 und CD73 im fibrotisch veränderten Interstitium in doppelt transgenen Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR). Tubulointerstitielle Zellen zeigen ein deutliches Annexin A1-Signal (A). Durch die Färbung für CD73 (B) werden die Fibroblasten in den dTGR dargestellt. Bei der direkten Überlagerung der beiden Signale (C) wird deutlich, dass die große Mehrzahl der CD73-positiven Fibroblasten (grün) ein starkes Signal für Annexin A1 (rot) aufweisen. Doppelmarkierung an 4 μm dicken Cryostatschnitten. Ursprüngliche Vergrößerung 400x, Kernfärbung mit DAPI.

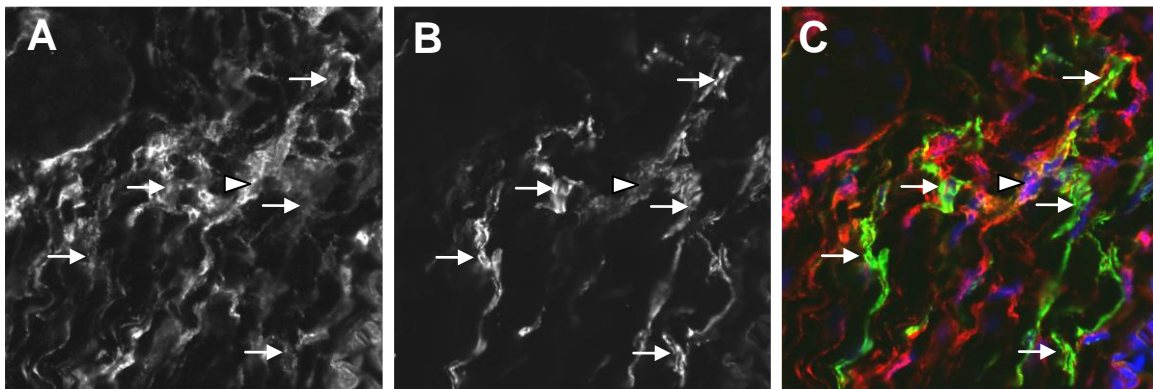


Abb. 18. Doppelmarkierung für Annexin A1 und alpha smooth muscle actin (α -SMA) im fibrotisch veränderten Interstitium in doppelt transgenen Ratten für humanes Renin und humanes Angiotensinogen (dTGR). Tubulointerstitielle Zellen zeigen ein deutliches Annexin A1-Signal (A). Durch die Färbung für α -SMA (B) werden die Myofibroblasten in den dTGR dargestellt. Bei der direkten Überlagerung der beiden Signale (C) wird deutlich, dass die große Mehrzahl der α -SMA-positiven Myofibroblasten (grün) kein Signal für Annexin A1 (rot) aufweist (Pfeile). Nur selten zeigt sich eine Kolokalisation (Dreieck). Doppelfärbung an 4 μm dicken Cryostatschnitten. Ursprüngliche Vergrößerung 400x, Kernfärbung mit DAPI.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war eine Charakterisierung der Annexin A1-Expression im Tubulointerstitium der gesunden Niere sowie im Rahmen einer akuten Nephritis und einer chronisch fibrotischen Nierenerkrankung. Als Modell einer akuten Nephritis, bei welcher es im weiteren Verlauf zu einer *Resolution* und Wiederherstellung der renalen Funktionen und Architektur kommt, wurde die anti-Thy-1 Nephritis als ein etabliertes Modell gewählt. Eine Persistenz der Inflammation und ein Ausbleiben der *Resolution* führt hingegen zu einer weiteren Schädigung des renalen Parenchyms. Als ein Modell solch einer chronisch fibrotischen Nierenschädigung wurde das Modell der dTGR gewählt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen als Grundlage für weitere Forschungen dienen, die Annexin A1 als Kandidat für Therapien entzündlicher Nierenerkrankungen beleuchten.

5.1 Annexin A1-Expression in der gesunden Niere

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass Annexin A1 in der gesunden Niere in Teilen des Nephrons sowie im Tubulointerstitium exprimiert wird.

Die Daten zur epithelialen Annexin A1-Expression bestätigen Ergebnisse einer Arbeit von McKanna et al., die das Vorkommen von Annexin A1 in glomerulären und tubulären Strukturen, d.h. der Bowman'schen Kapsel, den Podozyten, der Macula densa, dem dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und dem Sammelrohr der gesunden Niere beschrieben (McKanna 1992). In deren Arbeit bestanden zudem Hinweise auf eine mögliche Expression von Annexin A1 in den Zellen des renalen Interstitiums, welche jedoch nicht weiter untersucht wurden. In anderen Arbeitsgruppen zeigten sich ebenfalls weitere Hinweise auf eine Expression von Annexin A1 in tubulointerstitiellen Zellen, ohne dass eine konkrete Identifizierung vorgenommen wurde (Araujo 2010, 2012, Ka 2014).

In dieser Arbeit wurde daher eine Charakterisierung von Annexin A1-exprimierenden Zellen im renalen Interstitium durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Mehrzahl dieser interstitiellen Zellen in den gesunden Tieren Annexin A1-positiv war. Den größten Teil dieser Zellen machten, wie durch Neymeyer et al. bestätigt werden konnte, Fibroblasten aus (Neymeyer 2013). Sowohl perivaskuläre als auch peritubuläre Fibroblasten

exprimierten Annexin A1. Auch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zu Fibroblasten in anderen Organen (perivaskulär, pulmonal) zeigten eine starke konstitutive Expression von Annexin A1 in diesen Zellen, wodurch die Eigenschaft von Fibroblasten, Annexin A1 zu exprimieren, bestätigt wurde (Guo 2010, Bizzarro 2012, Jia 2013).

Makrophagen der gesunden Nieren kamen in dieser Arbeit vor allem perivaskulär und periglomerulär vor. Dies bestätigt Daten von Kaissling et al. (Kaissling 1996, 2008). Im Gegensatz zu den renalen Fibroblasten zeigte jedoch nur ein Teil dieser Zellen eine Annexin A1-Expression. Diese Ergebnisse sind mit den Daten anderer Arbeitsgruppen vereinbar, in denen eine Annexin A1-Expression von Makrophagen auch in anderen Organen, wie der Lunge, dem Peritoneum (Damazo 2006) oder dem Knochenmark (Dalli 2012), und in Blutmakrophagen (Perretti 1996) nachgewiesen werden konnte. Blutmakrophagen zeigten hierbei eine geringere Annexin A1-Expression als ortsständige Gewebemakrophagen (Perretti 1996).

Renale dendritische Zellen zeigten in der vorliegenden Arbeit nur vereinzelt eine Expression von Annexin A1. Hierzu finden sich in der Literatur unterschiedliche Resultate. Es wird angenommen, dass Annexin A1 abhängig von dem Reifestadium der dendritischen Zellen eine Rolle spielt und dementsprechend exprimiert wird (Huggins 2009). Eine gesteigerte Annexin A1-Expression kann hierbei eine Hemmung der Zellaktivität und -ausreifung bewirken (Min 2011). Eine genauere Charakterisierung der Annexin A1-Expression dendritischer Zellen in pathologischen Modellen wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen. Es sind daher zum besseren Verständnis in Zukunft hier weitere Studien notwendig.

Renale Endothelzellen zeigten in der vorliegenden Arbeit ein variables Bild der Annexin A1-Expression. So waren Endothelzellen in den peritubulären Kapillaren, kleineren Arteriolen, Vasa recta und venösen Gefäßen Annexin A1-negativ. In den größeren arteriellen Gefäßen (z.B. Aa. arcuatae) hingegen zeigte sich ein deutliches Signal für Annexin A1. Diese Ergebnisse zur Expression von Annexin A1 in peritubulären Kapillaren und venösen Gefäßen sind mit den Daten in der Literatur vereinbar (Dreier 1998, Damazo 2006). Im Gegensatz dazu beschreiben Dreier et al. auch die Endothelzellen größerer Gefäße in anderen Organen, unabhängig ihrer Lokalisation, als Annexin A1-negativ (Dreier 1998). Auch Yi et al. bestätigten, dass Annexin A1 auf der Zelloberfläche gesunder Endothelzellen nicht exprimiert wird (Yi 2009). Eine weitere Charakterisierung der Annexin A1-Expression in Endothelzellen wurde in dieser Arbeit

nicht vorgenommen. Zum weiteren Verständnis sind hier daher auch hier weitere Arbeiten notwendig.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Makrophagen und Fibroblasten die primären Annexin A1-exprimierenden Zellen im gesunden renalen Interstitium sind und damit eine Quelle für antiinflammatorische und antifibrotische Signale darstellen könnten. Zur besseren Charakterisierung der Expression von Annexin A1 in diesen Zellen wurden Studien an Tiermodellen für humane Nierenerkrankungen durchgeführt.

5.2 Annexin A1 im akuten Nephritismodell

Zur Validierung der Kinetik der induzierten anti-Thy-1 Nephritis erfolgten eine Quantifizierung der Proteinurie, der Nachweis des mesangial gebundenen THY1-Antikörpers sowie die Auswertung der morphologischen Veränderungen des renalen Kortex. Hierbei zeigte sich im Verlauf der Nephritis initial eine Zunahme der Proteinurie, des mesangial gebundenen Antikörpers und der mesangialen Zellularität als Zeichen der akuten glomerulären Inflammation. Morphologisch zeigte sich eine Zunahme der mesangialen Matrix in Folge der Inflammationsreaktion. Im weiteren Verlauf folgte die Elimination des Antikörpers im Rahmen der *Resolution* sowie ein Rückgang der Proteinurie. Morphologisch zeigte sich ein zunehmend inhomogenes Bild von vollständig zerstörten Glomeruli bis hin zu Glomeruli mit stattgefundener Defektheilung. Dieser Ablauf der anti-Thy-1-Nephritis ist mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vereinbar (Peters 2000, Anders 2003, Kriz 2003, 2005).

Im Tubulointerstitium zeigte sich im Verlauf der Nephritis eine zunehmende Mitbeteiligung mit deutlicher Expansion des tubulointerstitiellen Raumes, vornehmlich bedingt durch die Infiltration proinflammatorischer Zellen, sowie eine starke Zunahme der extrazellulären Matrix. Zudem zeigten sich zunehmend Areale mit abgestorbenen Nephronbestandteilen. 15 Tage nach Injektion zeigte sich wie bei den Glomeruli ein inhomogenes Bild von inflammatorisch veränderten Arealen neben solchen mit komplett oder inkompletter Regeneration der Parenchymstrukturen. Diese Mitbeteiligung des Tubulointerstitiums der initial rein glomerulären Nephritis ist mit den Daten von Kriz et al vereinbar (Kriz 2005). Die Mitbeteiligung ist demnach fließend und entsteht zum einen wahrscheinlich durch die direkte Schädigung des Tubulointerstitiums durch glomeruläre extrakapilläre Läsionen. Zum anderen können geschädigte Nephrone eine Infiltration

von proinflammatorischen Zellen in das Tubulointerstitium auslösen. Auch würde der Rückgang gesunder Nephrone im weiteren Verlauf zu einem Überstrapazieren und einer Schädigung der anderen noch funktionierenden Nephrone führen. Mit zunehmender Dauer stiege somit die Anzahl der zerstörten Nephrone und es würde konsekutiv zu einer Zunahme der Infiltration proinflammatorischer Zellen und der renalen Schädigung kommen (Kriz 2005). Dies würde die starke inflammatorische Mitbeteiligung des gesamten Interstitiums und die Zunahme der interstitiellen Zellularität im Verlauf der Nephritis erklären.

Es folgte die Untersuchung der Makrophagen im Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis. Die höchste Anzahl an glomerulären Makrophagen war 24 Stunden nach Antikörperinjektion im Rahmen der Initiationsphase zu verzeichnen. Mit Elimination des mesangialen Antikörpers und beginnender tubulointerstitiellen Entzündung zeigte sich ein Rückgang der glomerulären Makrophagen. Diese Beobachtung ist am ehesten auf deren Apoptose oder Migration in Lymphknoten zurückzuführen.

Tubulointerstitielle Makrophagen zeigten 24 Stunden nach Antikörperinjektion einen Rückgang der Anzahl. Die Abnahme ist vermutlich durch deren Migration zu den lokalen Lymphknoten und der dortigen Antigenpräsentation zu erklären. Dieser Rückgang konnte durch andere Arbeitsgruppen ebenfalls beschrieben werden (persönliche Kommunikation Prof. Stahl, UKE Hamburg). Im weiteren Verlauf der anti-Thy-1 Nephritis zeigte sich jedoch eine stetige Zunahme der interstitiellen Makrophagenanzahl. Das Ergebnis bestätigt Daten anderer Arbeitsgruppen diesbezüglich (Westerhuis 2000, Kriz 2003, 2005).

Die Zunahme der Anzahl an Makrophagen spielt für den Verlauf einer Nephritis eine entscheidende Rolle. Zum einen gewährleisten sie eine effiziente Immunantwort auf den pathologischen Stimulus (Mosser 2008, Martinez 2011, Mikita 2011). Zum anderen besitzen Makrophagen durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose von Zelldebris und Neutrophilen einen antiinflammatorischen und proregenerativen Effekt (Kawanishi 2010, Martinez 2011, Mikita 2011). Die Ingestion von apoptotischen Zellen und Neutrophilen stellt für Makrophagen u. a. einen starken biologischen Stimulus dar, der eine Differenzierung zu dem antiinflammatorischen Phänotyp bewirkt (Ferenbach 2007). Zudem beschrieb Ferenbach et al., dass renale Makrophagen zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Entzündung verschiedene Rollen einnehmen. Die Depletion von

renalen Makrophagen in der Phase der Schädigung hatte einen protektiven Effekt und führte zu einer verbesserten renalen Morphologie und Funktion. In der *Resolution* hingegen führte eine Depletion zu einem fehlerhaften Gewebsumbau und der Persistenz von fibrotischem Material. Gegen Ende der *Resolution* werden die Makrophagen entweder durch Migration zu den drainierenden Lymphknoten oder durch Apoptose aus dem Gewebe eliminiert (Ferenbach 2007). Demnach spielen infiltrierende Makrophagen zu Beginn einer renalen Entzündungsreaktion eine starke Rolle in der Zerstörung des Gewebes, nehmen jedoch im weiteren Verlauf eine Schlüsselrolle in der *Resolution* ein. Westerhuis et al. konnten diese Beobachtung im Rahmen der anti-Thy-1 Nephritis bestätigen. Sie zeigten, dass ein verminderter Influx von Makrophagen in die Glomeruli im Rahmen der Elimination apoptotischer Zellen und des THY1-Antikörpers zu einer prolongierten Inflammation führt (Westerhuis 2000).

Die oben beschriebenen pro- als auch antiinflammatorischen Eigenschaften können durch die Variabilität der Makrophagen erklärt werden. In einem vereinfachten Modell, in dem die verschiedenen Polarisierungen der Makrophagen beschrieben werden, wird der Phänotyp der Makrophagen als Kontinuum angesehen. Im Rahmen dieses Kontinuums kommen zum einen Makrophagen mit einem proinflammatorischen M1-Phänotyp (M1-Makrophage) und zum anderen Makrophagen mit einem antiinflammatorischen M2-Phänotyp (M2a-, M2b-, M2c-Makrophage) vor (Martinez 2011, Stout 2005, 2004). Die genauen Funktionen der Subpopulationen und deren Verbindung zueinander sind jedoch noch wenig erforscht. Alle drei M2-Phänotypen (M2a, M2b, M2c) stellen antiinflammatorische Makrophagen dar, welche u. a. über eine gesteigerte Phagozytoseaktivität eine Inflammation eindämmen und die *Resolution* fördern zu können. So erbrachte die Transfusion von M2-Makrophagen im Rahmen von Nephritiden einen Rückgang der pathologischen renalen Veränderungen und eine Regeneration der Funktionen (Ferenbach 2007, Wang 2011). Die M2c-Makrophagen zeigten hierbei eine größere protektive und *Resolutions*-fördernde Potenz als M2a-Makrophagen (Wang 2011). Zhang et al. konnten demonstrieren, dass im Rahmen der Ausheilung die Polarisierung von Makrophagen in Richtung M2-Makrophagen essentiell für den Regenerationsprozess ist. Eine Depletion dieser Makrophagen in der Regenerationsphase führte zu einer Verzögerung der Heilung (Zhang 2012).

Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf den M2c-Makrophagen, da diese u. a. durch Glukokortikoide in ihrer Differenzierung gefördert werden. Da Glukokortikoide

zudem die Expression von Annexin A1 in Zellen induzieren, wäre eine Beeinflussung der M2c-Makrophagen durch Annexin A1 denkbar. Hierdurch könnte Annexin A1 durch die Polarisierung der Makrophagen zu einem M2c-Phänotyp einen antiinflammatorischen Effekt ausüben.

Es folgte die Untersuchung der Annexin A1-mRNA sowie -Expression im Verlauf der Nephritis. In positiver Korrelation mit der Makrophagenzahl kam es im Verlauf der Nephritis zu einer Zunahme der Menge an Annexin A1-mRNA sowie einer zunehmenden Expression von Annexin A1 in den kortikalen tubulointerstitiellen Zellen. Die frühzeitige Zunahme der Annexin A1-mRNA ist wahrscheinlich durch infiltrierende Leukozyten bedingt. Die Daten dieser Arbeit zeigten hierdurch, dass das antiinflammatorische und *Resolutions*-fördernde Protein Annexin A1 demnach schon frühzeitig im Rahmen einer Inflammationsreaktion produziert wird. Eine gesteigerte interstitielle Expression des Proteins wurde 5 Tage nach Antikörperinjektion nachgewiesen. Auch zeigte sich besonders in den entzündeten Bereichen eine erhöhte Annexin A1-Expression. Die Menge an Annexin A1-mRNA sowie das Vorkommen des exprimierten Annexin A1-Proteins blieben im gesamten Verlauf des Versuches erhöht. In der inneren Medulla zeigte sich hingegen keine Veränderung der Annexin A1-mRNA. Dieser Befund reflektiert die Abwesenheit des THY1-Antigens in diesem Bereich der Niere.

Eine mögliche Beeinflussung der Annexin A1-Expression der Niere im Rahmen eines akuten inflammatorischen Stimulus wird durch McKanna et al. in Teilen des Nephrons beschrieben. Nach einer induzierten renalen Ischämie und einer Reperusionszeit von 48 Stunden zeigte sich in deren Arbeit eine gesteigerte Expression von Annexin A1 in dem dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife verglichen mit der Kontrollgruppe. Die renale Gesamtproteinmenge von Annexin A1 in der Niere verdreifachte sich zum Ausgangswert (McKanna 1992). Diese Daten zeigten zum ersten Mal eine mögliche Beteiligung von Annexin A1 während einer pathophysiologischen Veränderung in dem tubulären System der Niere. Araujo et al. demonstrierten, dass es im Rahmen von medikamentös induzierten Nierenschäden (Tacrolimus, Ciclosporin) ebenfalls zu einer Zunahmen der endogenen Annexin A1-Expression in der Bowman'schen Kapsel, der Macula densa sowie dem Sammelrohr kommt (Araujo 2010, 2012). Des Weiteren führte die Gabe von exogenem Annexin A1 zu einem Rückgang der tubulären Schädigung

sowie zur Hemmung der Infiltration inflammatorischer Zellen (Araujo 2010, 2012). Ka et al. konnten zudem zeigen, dass die Menge an Annexin A1 im Urin im Verlauf einer Nephritis sowie im Rahmen der diabetischen Nephropathie zunimmt und mit dem Grad der Schädigung korreliert (Ka 2014). Auch in anderen Organen wie der Lunge konnte diese Zunahme der Annexin A1-Expression nach Induktion einer Inflammation nachgewiesen werden (Damazo 2011).

Kretz et al. konnten demonstrieren, dass eine Inhibition von Annexin A1 durch antagonisierende Antikörper, wie dies beim Krankheitsbild des diskoiden Lupus erythematodes der Fall ist, zu einer Verlängerung der Entzündungsreaktion führt (Kretz 2010).

Im Anschluss erfolgte die Analyse der Annexin A1-Expression in Makrophagen im Verlauf der Nephritis. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Antikörperinjektion zeigten interstitielle Makrophagen keine Veränderung der Annexin A1-Expression. Diese Beobachtung ist mit Ergebnissen zur unveränderten Annexin A1-Expression in Makrophagen im frühen Verlauf einer Peritonitis vereinbar (Perretti 1996). Erst im weiteren Verlauf der Inflammation kam es mit steigender interstitieller Annexin A1-Expression zu einer Zunahme von Annexin A1-positiven Makrophagen im renalen Tubulointerstitium. Zu diesem Zeitpunkt ergab sich in den Bereichen ausgeprägter inflammatorischer Veränderungen mit einhergehender Nekrose und Narbenbildung die Schwierigkeit einer Quantifizierung der Makrophagen und einer Abgrenzung zu Zelldebris und apoptotischen Zellen. Es wurden daher für die Auszählung nur morphologisch klar zu erkennende und intakte Zellen in die Auswertung aufgenommen. Hierdurch ist möglicherweise eine etwas niedrigere Anzahl an Annexin A1-positiven Makrophagen gemessen worden, als tatsächlich vorhanden war.

Glomeruläre Makrophagen stellten sich im Gegensatz zu den interstitiellen Makrophagen im gesamten Verlauf der Nephritis als Annexin A1-negativ dar. Diese Beobachtung ist mit Ergebnissen vereinbar, dass Blutmakrophagen weniger Annexin A1 exprimieren als Gewebsmakrophagen (Perretti 1996, Damazo 2011). Somit tragen interstitielle Makrophagen einen signifikanten Teil zur gesteigerten Annexin A1-Expression in der Ausheilungsphase der Nephritis bei.

Eine mögliche Zunahme der Annexin A1-Expression in Makrophagen ist mit Ergebnissen anderer Arbeiten vereinbar. In einer Untersuchung von Damazo et al.

wurde die Änderung der Expression von Annexin A1 nach Induktion einer Peritonitis in Gewebsmakrophagen überprüft (Damazo 2006). In diesen Makrophagen konnte unter normalen Bedingungen eine Expression von Annexin A1 gezeigt werden. Nach Induktion der Entzündung wurde ein drastischer Anstieg der Expression festgestellt. Die gesteigerte Expression von Annexin A1 führt den Autoren zufolge zu einer gesteigerten Phagozytose von abgestorbenen Zellen und auch Neutrophilen. Zudem wirkt sie inhibierend auf die Infiltration weiterer proinflammatorischer Zellen in das Entzündungsgebiet sowie auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine (Damazo 2006). Die Bedeutung des antiinflammatorischen Effekts von Annexin A1 konnte von Damazo et al. in der gleichen Arbeit mit Annexin A1-defizienten Tieren beschrieben werden. Hier zeigte sich eine gesteigerte Infiltration proinflammatorischer Zellen in das Gewebe. Proinflammatorische Zytokine blieben in ihrer Produktion unbeeinflusst gesteigert, sodass es zu einem protrahierten Entzündungsverlauf kam (Damazo 2006). Die Störung der Phagozytosefähigkeit von Makrophagen bei Fehlen von Annexin A1 wurde durch andere Arbeitsgruppen bestätigt. Sie beschrieben eine Veränderung der Oberflächenstruktur der Phagozyten, welche in einem veränderten Phagozytoseverhalten dieser Zellen resultierte (La 2001, Yona 2005). Auch die Aktivierung der Makrophagen war hierdurch gestört (Bist 2013).

In einer weiteren Arbeit induzierten Damazo et al. nach intraperitonealer Injektion von bakteriellem Lipopolysaccharid ein *Systemic inflammatory response syndrome* (Damazo 2005). Sie konnten demonstrieren, dass residente peritoneale Makrophagen im Verlauf der so initiierten Inflammationsreaktion hierbei zu den ersten Zellen mit einer gesteigerten Aktivierung des Annexin A1-Gens zählten. Kurz darauf zeigten jedoch auch in das Peritoneum infiltrierende Makrophagen eine erhöhte Annexin A1-Biosynthese. Die Analyse von Gewebsmakrophagen in anderen Organen wie der Lunge und von Blutmakrophagen erbrachte den Nachweis, dass das Auslösen eines *Systemic inflammatory response syndrome* durch eine intraperitoneale Gabe einer Noxe auch in diesen Makrophagen zu einer signifikanten Steigerung der Annexin A1-Genaktivität führte (Damazo 2005). Des Weiteren wurde in Arbeiten zu einer durch Bleomycin verursachten Lungenschädigung in alveolären Makrophagen ebenfalls eine stark erhöhte Annexin A1-Expression im Verlauf der Schädigung nachgewiesen (Damazo 2011). Die Abwesenheit von Annexin A1 resultierte in diesem Modell in der bereits beschriebenen erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen,

wie IFN- γ und TNF- α , und einer Zunahme der Gewebeschädigung. Die Behandlung mit einem Teilpeptid von Annexin A1 (Ac2-26) führte hier jedoch zu einer erneuten Zunahme der Expression von Annexin A1 in der Lunge sowie den dortigen Makrophagen und Epithelzellen im Rahmen eines positiven Feedbacks (Damazo 2011). Generell zeigt sich also auch in anderen Organen eine gesteigerte Expression von Annexin A1 in Makrophagen nach einem inflammatorischen Stimulus (Damazo 2005, 2006, 2011). Die Autoren der oben zitierten Arbeiten zeigten, dass die Steigerung der Expression von Annexin A1 in Makrophagen im Verlauf einer akuten Entzündung einem antiinflammatorischen und *Resolutions*-fördernden Zweck dient. Es kommt durch Makrophagen zu einem direkten Einfluss auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie auch auf die Migration und Apoptose von neutrophilen Granulozyten sowie deren Phagozytose (Goulding 1998, Damazo 2006, Lim 2007).

Annexin A1 kann zudem sezerniert werden und auch extrazellulär vorkommen (Lim 2007). Der genaue Mechanismus der Freisetzung ist aktuell jedoch nicht geklärt (Coméra 1995, Castro-Caldas 2002, Solito 2003). Im extrazellulären Raum erfolgt durch eine partielle Proteolyse die Abspaltung des N-Terminus des Proteins. Sowohl das Gesamtmolekül als auch die N-terminalen Fragmente können über die Rezeptoren der FPR wirken (Vergnolle 1995, Migeotte 2006, Rescher 2006). Makrophagen exprimieren in diesem Zusammenhang FPR2, über deren Aktivierung extrazelluläres Annexin A1 antiinflammatorisch wirken kann (Migeotte 2006, Ye 2009, Dalli 2012). Eine Aktivierung dieser Rezeptoren inhibiert die Migration der Leukozyten durch Endothelzellverbände (Migeotte 2006, Lim 2007). Zudem wird die Produktion proinflammatorischer Prostaglandine durch Inhibition der Expression von Schlüsselenzymen wie der Phospholipase A2 und der Cyclooxygenase 2 effektiv gehemmt (Migeotte 2006, Lim 2007). Durch Pupjalis et al. konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass neben der aktiven Sekretion von Annexin A1 durch Makrophagen zudem apoptotische Zellen Annexin A1 freisetzen. Diese Sekretion von Annexin A1 ist Bestandteil der antiinflammatorischen Effekte apoptotischer Zellen und ermöglicht die entzündungsfreie Eliminierung von abgestorbenem Zellmaterial. Die Phagozytose Annexin A1-haltiger apoptotischer Zellbestandteile führt über FPRs auf den Makrophagen zu einer signifikant verminderten Produktion von IL-6 und TNF- α . Hierdurch wird die Inflammation eingedämmt und die *Resolution* unterstützt (Pupjalis 2011).

Wie bereits erwähnt wirken Glukokortikoide stark antiinflammatorisch und führen zu einer vermehrten Expression und Sekretion von Annexin A1 in Makrophagen (Perretti 1996, Castro-Caldas 2002, Solito 2003, Damazo 2006). Zudem kann die Ausrichtung von Makrophagen zu antiinflammatorischen M2c-Makrophagen durch Glukokortikoide induziert werden (Wang 2011). Annexin A1 könnte daher in den verschiedenen Phänotypen der Makrophagen differentiell exprimiert werden und zu deren Polarisierung beitragen. Dies wäre vereinbar mit der Möglichkeit einer direkten Beeinflussung des Makrophagenphänotyps und dessen Eigenschaften durch Annexin A1. So wäre es möglich, dass die Mehrzahl der Makrophagen 24 Stunden und teils auch noch 5 Tage nach Antikörperinjektion in unserem Modell der anti-Thy-1 Nephritis dem Phänotyp der M1-Makrophagen entsprechen. Diese proinflammatorischen Zellen würden nur wenig Annexin A1 exprimieren. Mit dem Einsetzen der *Resolution* 15 Tage nach Antikörperinjektion würde mit der steigenden Anzahl der Gesamtmakrophagen und dem steigenden Verhältnis von Annexin A1-exprimierenden interstitiellen Makrophagen zu Gesamtmakrophagen die Anzahl an M2-Makrophagen zunehmen. Durch eine erhöhte Expression von Annexin A1 könnten diese Makrophagen antiinflammatorisch und *Resolutions*-fördernd wirken.

Durch Li et al. wurde ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Vorkommen von Annexin A1 und einer vermehrten Anzahl von M2-Makrophagen in Tumorgewebe des hepatozellulären Karzinoms beschrieben (Li 2011). Sie konnten zeigen, dass extrazelluläres Annexin A1 über den FPR2 durch die Modulation intrazellulärer Signalkaskaden die Polarisierung von Makrophagen zu M2-Makrophagen positiv beeinflusst (Li 2011). Dies wird von den Ergebnissen von Wang et al. unterstützt. Seine Arbeitsgruppe konnte demonstrieren, dass speziell M2c-Makrophagen an der Regulation der *Resolution* beteiligt sind (Wang 2011). Es könnte daher sein, dass die gesteigerte Expression von Annexin A1 in einer Subpopulation von Makrophagen eine wichtige Rolle im Erhalt der Homöostase und der Begrenzung des inflammatorischen Schadens spielt (Damazo 2005, 2006). Zum besseren Verständnis sind diesbezüglich in Zukunft weitere Studien notwendig.

Neben der ausführlich beschriebenen antiinflammatorischen Wirkung scheint Annexin A1 jedoch auch proinflammatorisch wirken zu können (Tagoe 2008, D'Acquisto 2013).

Diese proinflammatorischen Effekte werden vermutlich durch das C-terminale Peptid nach Proteolyse des N-Terminus ausgelöst (Williams 2010). Die N-terminalen Peptide und das gesamte Protein sind dagegen für die antiinflammatorische Wirkung verantwortlich (Vergnolle 1995, Migeotte 2006, Perretti 2009). Inwiefern diese proinflammatorischen Effekte als eine "schlechte Seite" von Annexin A1 gewertet werden müssen, ist abhängig von der Inflammationsreaktion zu werten. Ähnlich wie Fibroblasten und Makrophagen proinflammatorisch wirken und hierdurch die effektive Elimination eines Pathogens bewirken können, könnte Annexin A1 durch seine teils proinflammatorischen Eigenschaften eine ähnliche Wirkung im Rahmen einer Entzündungsreaktion spielen.

Mit diesen Experimenten konnte erstmalig gezeigt werden, dass interstitielle Makrophagen einen signifikanten Teil zur gesteigerten Annexin A1-Expression in der Ausheilungsphase einer renalen Inflammation beitragen können. Die Expression von Annexin A1 korreliert wahrscheinlich mit dem Phänotyp der Makrophagen und könnte hierdurch eine entscheidende Rolle in der *Resolution* spielen. In Zukunft sind hierzu weitere Studien notwendig, um diese funktionelle Relevanz weiter untersuchen und effektiv Therapien etablieren zu können. Auch die Rolle der FPRs sollte in diesem Kontext weiter erforscht werden. Neben der Expression von Annexin A1 in Makrophagen, müssen ebenfalls zur Expression in den Fibroblasten, dendritischen Zellen, Granulozyten und Endothelzellen in Zukunft weitere Arbeiten erfolgen.

5.4 Annexin A1 im Modell einer chronischen Nierenerkrankung

Zur Validierung des Modells erfolgte eine in-situ-Hybridisierung für Kollagen 1a2. Im Rahmen der in-situ-Hybridisierung zeigten sich eine ausgeprägte Fibrosierung und konsekutive Zerstörung der normalen renalen Gewebsarchitektur mit Zunahme der extrazellulären Matrix bei den dTGR im Vergleich zu Kontrolltieren. Diese Veränderungen bestätigen Arbeiten von Luft et al., welche starke Endorganschäden in den Nieren sowie auch den Gefäßen und dem Herz solcher Tieren beschrieben (Luft 1999). Zudem beschrieben Luft et al., dass es neben einer stark ausgeprägten Nephrosklerose und Schädigung der Gefäße, zu einem myointimalen Rearrangement mit konsekutiver Fibrosierung kommt. Dieses geht mit der Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten einher (Luft 1999). Die Aktivierung der Perizyten mit der darauffolgenden tubulointerstitiellen Gefäßrarefizierung unterstützt die Ausbildung narbiger Areale im Rahmen einer chronischen Fibrosierung (Fligny 2013). Im Gegensatz zu der chronischen Fibrosierung, stellt ein fibrotischer renaler Umbau im Rahmen einer akuten Nephritis jedoch eher eine Stabilisierung und Schutz des renalen Parenchyms dar (Kaissling 2013). Mittels der in-situ-Hybridisierung für Kollagen 1a2 konnte des Weiteren gezeigt werden, dass es bei den dTGR mit dem fibrotischen Umbau des Nierenparenchyms zu einer Zunahme der extrazellulären Matrix vor allem in den geschädigten Bereichen, also insbesondere perivaskulär, kommt. Auch in anderen Versuchsmodellen wird diese Zunahme der extrazellulären Matrix im Rahmen des fibrotischen Umbaus des Nierenparenchyms beschrieben (Kaissling 1996, Ts'ao 1997, Terashima 2010). Zudem konnten Terashima et al. im Rahmen eines fibrotischen Modells demonstrieren, dass es schon frühzeitig zu einer Aktivierung der Fibroblasten mit gesteigerter Transkription des Kollagen 1a2-Gens kommt (Terashima 2010).

Es folgte die Untersuchung der Fibroblasten in den dTGR. Hierbei konnte eine generelle Zunahme der Fibroblasten und Myofibroblasten (aktivierte Fibroblasten, α -SMA-positiv) in den dTGR nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse demonstrieren des Weiteren die positive Korrelation zwischen der Anzahl der Myofibroblasten und dem Vorkommen an Kollagen 1a2 sowie den fibrotischen Veränderungen in den dTGR. Diese Korrelation ist mit den Ergebnissen zu aktivierten Fibroblasten von Kaissling et. al zu vereinbaren (Kaissling 2008). Zudem konnten gezeigt werden, dass Myofibroblasten

im Vergleich zu ruhenden Fibroblasten eine geringere Expression von CD73 und Annexin A1 aufweisen. Diese verminderte Expression von CD73 in Myofibroblasten wird ebenfalls durch Kaissling et al. bestätigt (Kaissling 2008).

Hiernach folgte die Analyse der Annexin A1-Expression in Fibroblasten in den dTGR. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Annexin A1-Expression insbesondere in den fibrotischen Arealen. Diese Ergebnisse sind mit denen von Neymeyer et al. zu vereinbaren, welche eine signifikante Zunahme der Annexin A1-mRNA sowie Expression im Rahmen einer chronischen Nierenschädigung nachwies (Neymeyer 2013).

Des Weiteren konnte eine ubiquitäre Expression von Annexin A1 in den Fibroblasten, auch in den fibrotisch veränderten Arealen, beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind mit denen zur Expression von Annexin A1 in der gesunden Niere in dieser Arbeit vereinbar. Hierdurch konnte demonstriert werden, dass Fibroblasten an der Zunahme der Expression von Annexin A1 in den dTGR beitragen. Myofibroblasten hingegen zeigten in der überwiegenden Mehrzahl kein Annexin A1-Signal.

Diese Ergebnisse sind mit denen anderer Arbeitsgruppen vereinbar. So konnte gezeigt werden, dass in alten oder hypertensiven Tieren aktivierte Fibroblasten vornehmlich in der Adventitia der Gefäße vorkommen (Hultström 2012, Skogstrand 2013). In einer anderen Arbeit konnten Guo et al. demonstrieren, dass insbesondere perivaskuläre Fibroblasten in spontan hypertensiven Tieren, verglichen mit Fibroblasten in Kontrolltieren, eine signifikant geringere Annexin A1-Expression aufwiesen. Eine spezifische Identifikation der Myofibroblasten erfolgte durch sie jedoch nicht (Guo 2010). Werden die obigen Aussagen zusammengefasst, ergibt sich im Analogieschluss die Aussage, dass aktivierte Fibroblasten, also Myofibroblasten, welche vornehmlich perivaskulär gelegen sind, eine verminderte Annexin A1-Expression aufweisen.

Neymeyer et al. beschrieben in diesem Zusammenhang, dass renale Fibroblasten Annexin A1-defizienter Tiere ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau von α -SMA und Kollagen 1a1 im Vergleich zu Kontrolltieren aufwiesen. Zudem ähnelten diese Fibroblasten stärker dem myofibroblastischen Phänotyp mit einer gesteigerten Syntheseleistung an Kollagenen (Neymeyer 2013). Des Weiteren konnten sie zeigen, dass auch die Hemmung des FPR2 auf Fibroblasten die Differenzierung zum Myofibroblastenphänotyp mit einer gesteigerter Biosynthese von α -SMA fördert. Selbst

ein vermehrtes Angebot an extrazellulärem Annexin A1 konnte nach Blockierung des FPR2 die verstärkte α -SMA-Biosynthese nicht mehr beeinflussen (Neymeyer 2013). Somit konnten sie demonstrieren, dass Annexin A1 über den FPR2 die Aktivierung von Fibroblasten modulieren kann.

Der inhibitorische Effekt von endogenem Annexin A1 auf die Differenzierung von ruhenden Fibroblasten zu Myofibroblasten konnte des Weiteren durch Arbeiten zu perivaskulären (Guo 2010) und pulmonalen Fibroblasten (Jia 2013) demonstriert werden. Auch Kamal et al. beschreiben, dass es durch Annexin A1 zu einer Suppression der phänotypischen Veränderung von Fibroblasten in Richtung Myofibroblasten und deren Zellproliferation kommt (Kamal 2005). Fehlte Annexin A1 in pulmonalen Fibroblasten oder wurde es in seiner Expression gehemmt (small-interfering-RNA gegen Annexin A1), zeigte sich eine schnellere Aktivierung zu Myofibroblasten mit einer Zunahme der Produktion proinflammatorischer Mediatoren sowie eine verminderten antiinflammatorischen Wirkung von Glukokortikoiden (Damazo 2005, Jia 2013). Zudem wurde in solchen Fibroblasten eine gesteigerte Aktivierung der ERK- und NF- κ B-Signalkaskaden, welche eine wichtige Rolle in der Aktivierung zu Myofibroblasten spielen, beschrieben (Jia 2013). Auch zeigte sich eine vermehrte Deposition extrazellulärer Matrix und Ausbildung von Fibrose (Damazo 2011). Durch Luft et al. konnte eine Zunahme der Produktion von proinflammatorischen Substanzen durch renale aktivierte Fibroblasten in den dTGR bestätigt werden (Luft 1999).

Durch Jia et al. konnte des Weiteren gezeigt werden, dass auch eine Überexpression von Annexin A1 in pulmonalen Fibroblasten deren Aktivierung entgegenwirkte (Jia 2013). Durch Neymeyer et al. wurde dieser inhibitorische Effekt von Annexin A1 auch in renalen Fibroblasten beobachtet, obwohl diese zuvor mit dem profibrotischen Zytokin TGF- β behandelt worden waren (Neymeyer 2013).

Die zentrale Rolle von TGF- β in der Induktion fibrotischer Nierenschäden und hierdurch dem Ausbilden eines chronischen Nierenversagens wurde durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (Isaka 1993, Liu 2006, Terashima 2010). Durch Neymeyer et al. konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass eine Behandlung mit TGF- β in Kontrolltieren in einem signifikanten Anstieg von α -SMA sowie einer gesteigerten Produktion von Kollagenen resultierte. Jedoch wiesen diese mit TGF- β behandelten Fibroblasten ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression von Annexin A1 auf (Neymeyer 2013). Diese Induktion der Annexin A1-Expression könnte die teils

antiinflammatorischen Effekte von TGF- β erklären, welche die Hemmung der Proliferation und Extravasation von Makrophagen und Lymphozyten sowie die Inhibition derer Zytokinantwort darstellen (Kehrl 1986a, 1986b). Zudem wird durch TGF- β die *Resolution* von Inflammationsprozessen und Ausbildung der Immuntoleranz unterstützt (Li 2006). Zum genaueren Verständnis des Zusammenhangs zwischen Annexin A1 und TGF- β sind in Zukunft weitere Arbeiten notwendig.

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Myofibroblasten stellt ihre Kalzium-abhängige kontraktile Eigenschaft durch α -SMA dar, mit dessen Hilfe sie sich aktiv in Zellverbänden bewegen können (Follonier Castella 2010). Eine ausgeprägte Expression von Annexin A1 in Myofibroblasten, welches die Fähigkeit besitzt Kalzium zu binden und zu puffern, könnte zu einer Reduktion der Kontraktilität dieser Zellen führen. Dies würde den inhibitorischen Effekt von intrazellulärem Annexin A1 auf den myofibroblastischen Phänotyp unterstreichen.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Zunahme der Annexin A1-Produktion in den fibrotischen Gebieten nicht durch Myofibroblasten erfolgt. Vielmehr liegt die Ursache in den ruhenden renalen Fibroblasten und den infiltrierenden interstitiellen Makrophagen, welche jeweils im Rahmen eines chronischen Reizes wie in den dTGR an Zahl zunehmen. In Zusammenschau der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse und den Studien durch andere Arbeitsgruppen an anderen Organen, kann angenommen werden, dass Annexin A1 eine hemmende Wirkung auf renale Myofibroblasten ausübt.

Zusammenfassend ist durch die Charakterisierung der Annexin A1-Expression in der gesunden Niere, sowie in Makrophagen und Fibroblasten im Rahmen von Nierenerkrankungen der Grundstein für weitere Forschung auf diesem Gebiet gelegt worden. Insbesondere zum therapeutischen Einsatz von Annexin A1 zur Verhinderung und Behandlung terminaler Nierenschäden sind zum besseren Verständnis der Funktion von Annexin A1 in der Niere in Zukunft daher weitere Studien notwendig.

Literaturverzeichnis

Anders HJ, Vielhauer V, Schlöndorff D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int.* 2003;63(2):401-15.

Araujo LP, Truzzi RR, Mendes GE, Luz MA, Burdmann EA, Oliani SM. Annexin A1 protein attenuates cyclosporine-induced renal hemodynamics changes and macrophage infiltration in rats. *Inflamm Res.* 2012;61(3):189-96.

Araujo LP, Truzzi RR, Mendes GE, Luz MA, Burdmann EA, Oliani SM. Interaction of the anti-inflammatory annexin A1 protein and tacrolimus immunosuppressant in the renal function of rats. *Am J Nephrol.* 2010;31(6):527-33.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-52.

Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int.* 2011;79(9):944-56.

Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;57(4):376-9.

Bist P, Shu S, Lee H, Arora S, Nair S, Lim JY, Dayalan J, Gasser S, Biswas SK, Fairhurst AM, Lim LH. Annexin-A1 regulates TLR-mediated IFN- β production through an interaction with TANK-binding kinase 1. *J Immunol.* 2013;191(8):4375-82.

Bizzarro V, Fontanella B, Carratù A, Belvedere R, Marfella R, Parente L, Petrella A. Annexin A1 N-terminal derived peptide Ac2-26 stimulates fibroblast migration in high glucose conditions. *PLoS One.* 2012;7(9):e45639.

Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie.* 3. Auflage. München: Elsevier GmbH; 2004. 1290 p.

Campean V, Theilig F, Paliege A, Breyer M, Bachmann S. Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(1):F19-32.

Castro-Caldas M, Duarte CB, Carvalho AP, Lopes MC. Dexamethasone induces the secretion of annexin I in immature lymphoblastic cells by a calcium-dependent mechanism. *Mol Cell Biochem*. 2002;237(1-2):31-8.

Coméra C, Russo-Marie F. Glucocorticoid-induced annexin 1 secretion by monocytes and peritoneal leukocytes. *Br J Pharmacol*. 1995;115(6):1043-7.

Coskey RJ. Adverse effects of corticosteroids: I. Topical and intralesional. *Clin Dermatol*. 1986;4(1):155-60.

D'Acquisto F, Piras G, Rattazzi L. Pro-inflammatory and pathogenic properties of Annexin-A1: the whole is greater than the sum of its parts. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(9):1213-8.

Dahl R. Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *Respir Med*. 2006;100(8):1307-17.

Dalli J, Jones CP, Cavalcanti DM, Farsky SH, Perretti M, Rankin SM. Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. *FASEB J*. 2012;26(1):387-96.

Damazo AS, Sampaio AL, Nakata CM, Flower RJ, Perretti M, Oliani SM. Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. *BMC Immunol*. 2011;12:59.

Damazo AS, Yona S, D'Acquisto F, Flower RJ, Oliani SM, Perretti M. Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. *Am J Pathol*. 2005;166:1607–1617.

Damazo AS, Yona S, Flower RJ, Perretti M, Oliani SM. Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. *J Immunol* 2006;176:4410-4418.

de la Paz NG, D'Amore PA. Arterial versus venous endothelial cells. *Cell Tissue Res.* 2009;335(1):5-16.

Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology.* 1985;54(3):589-99.

Dreier R, Schmid KW, Gerke V, Riehemann K. Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol.* 1998;110(2):137-48.

Duijvestijn AM, van Goor H, Klatter F, Majoor GD, van Bussel E, van Breda Vriesman PJ. Antibodies defining rat endothelial cells: RECA-1, a pan-endothelial cell-specific monoclonal antibody. *Lab Invest.* 1992;66(4):459-66.

Fassett RG, Gobe GC, Peake JM, Coombes JS. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2010;56(4):728-42.

Ferenbach D, Kluth DC, Hughes J. Inflammatory cells in renal injury and repair. *Semin Nephrol.* 2007;27(3):250-9.

Fligny C, Duffield JS. Activation of pericytes: recent insights into kidney fibrosis and microvascular rarefaction. *Curr Opin Rheumatol.* 2013;25(1):78-86.

Flower RJ, Blackwell GJ. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature.* 1979;278:456-459.

Follonier Castella L, Gabbiani G, McCulloch CA, Hinz B. Regulation of myofibroblast activities: calcium pulls some strings behind the scene. *Exp Cell Res.* 2010;316(15):2390-401.

Frei U, Schober-Halstenberg HJ. Nierenersatztherapie in Deutschland: Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. Berlin: QuaSi-Niere gGmbH; 2008. 60 p.

Ganten D, Wagner J, Zeh K, Bader M, Michel JB, Paul M, Zimmermann F, Ruf P, Hilgenfeldt U, Ganten U, et al. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(16):7806-10.

Gavins FN, Dalli J, Flower RJ, Granger DN, Perretti M. Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. *FASEB J.* 2007;21(8):1751-8.

Gavins FN, Kamal AM, D'Amico M, Oliani SM, Perretti M. Formylpeptide receptor is not involved in the protection afforded by annexin 1 in murine acute myocardial infarct. *FASEB J.* 2005;19:100-102.

Goulding NJ, Euzger HS, Butt SK, Perretti M. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. *Inflamm Res* 1998;47 Suppl 3:S158-65.

Grgic I, Duffield JS, Humphreys BD. The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(2):183-93

Guo SJ, Wang TR, Chen J, Wu LY, Gao PJ, Zhu DL. Dynamic expression of proteins associated with adventitial remodeling in adventitial fibroblasts from spontaneously hypertensive rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31(10):1312-8.

Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood.* 1993;81(6):1607-13.

Huggins A, Paschalidis N, Flower RJ, Perretti M, D'Acquisto F. Annexin-1-deficient dendritic cells acquire a mature phenotype during differentiation. *FASEB J*. 2009;23(4):985-96.

Hultström M, Leh S, Paliege A, Bachmann S, Skogstrand T, Iversen BM. Collagen-binding proteins in age-dependent changes in renal collagen turnover: microarray analysis of mRNA expression. *Physiol Genomics*. 2012;44(10):576-86.

Hume DA, Gordon S. Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtaglomerular complex. *J Exp Med*. 1983;157(5):1704-9.

Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest*. 1993;92(6):2597-601.

Jia Y, Morand EF, Song W, Cheng Q, Stewart A, Yang YH. Regulation of lung fibroblast activation by annexin A1. *J Cell Physiol*. 2013;228(2):476-84.

John CD, Gavins FN, Buss NA, Cover PO, Buckingham JC. Annexin A1 and the formyl peptide receptor family: neuroendocrine and metabolic aspects. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(6):765-76.

Ka SM, Tsai PY, Chao TK, Yang SM, Hung YJ, Chen JS, Shui HA, Chen A. Urine annexin A1 as an index for glomerular injury in patients. *Dis Markers*. 2014;2014:854163.

Kaissling B, Hegyi I, Loffing J, Le Hir M. Morphology of interstitial cells in the healthy kidney. *Anat Embryol (Berl)*. 1996;193(4):303-18.

Kaissling B, Le Hir M. Characterization and distribution of interstitial cell types in the renal cortex of rats. *Kidney Int.* 1994;45(3):709-20.

Kaissling B, Lehir M, Kriz W. Renal epithelial injury and fibrosis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(7):931-9.

Kaissling B, Le Hir M. The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol.* 2008;130:247-262.

Kamal AM, Flower RJ, Perretti M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100 Suppl 1:39-47.

Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev.* 2010;16:105-18.

Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol.* 1986a;137(12):3855-60.

Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med.* 1986b;163(5):1037-50.

Kis K, Liu X, Hagood JS. Myofibroblast differentiation and survival in fibrotic disease. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e27.

Klinger M. [Modern nephrology--new methods, new treatments and still numerous difficult challenges]. *Pol Arch Med Wewn.* 2007;117(3):35-41.

Koesters R, Kaissling B, Lehir M, Picard N, Theilig F, Gebhardt R, Glick AB, Hähnel B, Hosser H, Gröne HJ, Kriz W. Tubular overexpression of transforming growth factor-beta1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *Am J Pathol.* 2010;177(2):632-43.

Kretz CC, Norpo M, Abeler-Dörner L, Linke B, Haust M, Edler L, Krammer PH, Kuhn A. Anti-annexin 1 antibodies: a new diagnostic marker in the serum of patients with discoid lupus erythematosus. *Exp Dermatol.* 2010;19(10):919-21.

Kriz W, Hähnel B, Hosser H, Ostendorf T, Gaertner S, Kränzlin B, Gretz N, Shimizu F, Floege J. Pathways to recovery and loss of nephrons in anti-Thy-1 nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(7):1904-26.

Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int.* 2005;67(2):404-19.

La M, Tailor A, D'Amico M, Flower RJ, Perretti M. Analysis of the protection afforded by annexin 1 in ischaemia-reperfusion injury: focus on neutrophil recruitment. *Eur J Pharmacol.* 2001;429(1-3):263-78.

Lemley KV, Kriz W. Anatomy of the renal interstitium. *Kidney Int.* 1991;39(3):370-81.

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:99-146.

Li Y, Cai L, Wang H, Wu P, Gu W, Chen Y, Hao H, Tang K, Yi P, Liu M, Miao S, Ye D. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene.* 2011;30(36):3887-99.

Lim LH, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J.* 2007;21(4):968-75.

Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int.* 2006;69(2):213-7.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

Luft FC, Mervaala E, Müller DN, Gross V, Schmidt F, Park JK, Schmitz C, Lippoldt A, Breu V, Dechend R, Dragun D, Schneider W, Ganten D, Haller H. Hypertension-induced end-organ damage: A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension.* 1999;33(1 Pt 2):212-8.

Mariotto S, Suzuki Y, Persichini T, Colasanti M, Suzuki H, Cantoni O. Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. *Curr Med Chem.* 2007;14(18):1940-4.

Martinez FO. Regulators of macrophage activation. *Eur J Immunol.* 2011;41(6):1531-4.

McKanna JA, Chuncharunee A, Munger KA, Breyer JA, Cohen S, Harris RC. Localization of p35 (annexin I, lipocortin I) in normal adult rat kidney and during recovery from ischemia. *J Cell Physiol.* 1992;153(3):467-76.

Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 2011;92(3):158-67.

Migeotte I, Communi D, Parmentier M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(6):501-19.

Mikita J, Dubourdieu-Cassagno N, Deloire MS, Vekris A, Biran M, Raffard G, Brochet B, Canron MH, Franconi JM, Boiziau C, Petry KG. Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Mult Scler.* 2011;17(1):2-15.

Min Y, Han D, Fu Z, Wang H, Liu L, Tian Y. α -MSH inhibits TNF- α -induced maturation of human dendritic cells in vitro through the up-regulation of Annexin A1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2011;43(1):61-8.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69.

Mou H, Li Z, Kong Y, Deng B, Qian L, Wang JM, Le Y. Proinflammatory stimulants promote the expression of a promiscuous G protein-coupled receptor, mFPR2, in microvascular endothelial cells. *Inflammation*. 2012;35(2):656-64.

Mutig K, Paliege A, Kahl T, Jöns T, Müller-Esterl W, Bachmann S. Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(4):F1166-77.

Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, García-Pérez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(6):327-40.

Neymeyer H. Annexin A1 im chronischen Nierenversagen [Promotion]. [Potsdam]: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam; 2013. 98 p.

Parente L, Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res*. 2004;53(4):125-32.

Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(1):62-70.

Perretti M, Flower RJ. Cytokines, glucocorticoids and lipocortins in the control of neutrophil migration. *Pharmacol Res*. 1994;30(1):53-9.

Perretti M, Flower RJ. Measurement of lipocortin 1 levels in murine peripheral blood leukocytes by flow cytometry: modulation by glucocorticoids and inflammation. *Br J Pharmacol.* 1996;118(3):605-10.

Peters H. Wirkungen der L-Arginingabe bei immun-vermittelter akuter und chronischer Glomerulofibrose [Habilitation]. [Berlin]: Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin; 2000. 111 p.

Philip JG, Flower RJ, Buckingham JC. Glucocorticoids modulate the cellular disposition of lipocortin 1 in the rat brain in vivo and in vitro. *Neuroreport.* 1997;8(8):1871-6.

Pilz B, Shagdarsuren E, Wellner M, Fiebeler A, Dechend R, Grätze P, Meiners S, Feldman DL, Webb RL, Garrelds IM, Jan Danser AH, Luft FC, Müller DN. Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. *Hypertension.* 2005;46(3):569-76.

Pupjalis D, Goetsch J, Kottas DJ, Gerke V, Rescher U. Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling. *EMBO Mol Med.* 2011;3(2):102-14.

Relton JK, Strijbos PJ, O'Shaughnessy CT, Carey F, Forder RA, Tilders FJ, Rothwell NJ. Lipocortin-1 is an endogenous inhibitor of ischemic damage in the rat brain. *J Exp Med.* 1991;174:305-310.

Rescher U, Goebeler V, Wilbers A, Gerke V. Proteolytic cleavage of annexin 1 by human leukocyte elastase. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763(11):1320-4.

Ringseis R, Eder K. Fatty acids and signalling in endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010;82(4-6):189-98.

Rosengarth A, Luecke H. A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1. *J Mol Biol.* 2003;326:1317-1325

Sarrazy V, Billet F, Micallef L, Coulomb B, Desmoulière A. Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments. *Wound Repair Regen.* 2011;19 Suppl 1:s10-5.

Scannell M, Maderna P. Lipoxins and annexin-1: resolution of inflammation and regulation of phagocytosis of apoptotic cells. *ScientificWorldJournal.* 2006;6:1555-73.

Sean Eardley K, Cockwell P. Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney Int.* 2005;68(2):437-55.

Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Valette G, Garcia G, Pascal M, Maffrand JP, Le Fur G. Nonpeptide vasopressin receptor antagonists: development of selective and orally active V1a, V2 and V1b receptor ligands. *Prog Brain Res.* 2002;139:197-210.

Siegmund-Schultze N. Die Verteilung des Mangels. *Deutsches Ärzteblatt.* 2014;45:C1588-89

Skogstrand T, Leh S, Paliege A, Reed RK, Vikse BE, Bachmann S, Iversen BM, Hultström M. Arterial damage precedes the development of interstitial damage in the nonclipped kidney of two-kidney, one-clip hypertensive rats. *J Hypertens.* 2013;31(1):152-9.

Solito E, Mulla A, Morris JF, Christian HC, Flower RJ, Buckingham JC. Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology.* 2003;144(4):1164-74.

Solito E, Nuti S, Parente L. Dexamethasone-induced translocation of lipocortin (annexin) 1 to the cell membrane of U-937 cells. *Br J Pharmacol.* 1994;112(2):347-8.

Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol.* 2005;175(1):342-9.

Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 2004;76(3):509-13.

Tagoe CE, Marjanovic N, Park JY, Chan ES, Abeles AM, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH. Annexin-1 mediates TNF-alpha-stimulated matrix metalloproteinase secretion from rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol.* 2008;181(4):2813-20.

Terashima H, Kato M, Yasumo H, Tsuchida H, Mizuno M, Sada T. A sensitive short-term evaluation of antifibrotic effects using newly established type I collagen reporter transgenic rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(4):F792-801.

Ts'ao C, Ward WF, Tsao FH, Taylor JM, Molteni A. Annexin I in fibrotic rat lung and cultured lung fibroblasts following irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1997;72(2):227-34.

Ulger H, Karabulut AK, Pratten MK. Labelling of rat endothelial cells with antibodies to vWF, RECA-1, PECAM-1, ICAM-1, OX-43 and ZO-1. *Anat Histol Embryol.* 2002;31(1):31-5.

Vergnolle N, Coméra C, Buéno L. Annexin 1 is overexpressed and specifically secreted during experimentally induced colitis in rats. *Eur J Biochem.* 1995;232(2):603-10.

Vinen CS, Oliveira DB. Acute glomerulonephritis. *Postgrad Med J.* 2003;79(930):206-13; quiz 212-3.

Wang Y, Harris DC. Macrophages in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(1):21-7.

Wang Y, Krämer S, Loof T, Martini S, Kron S, Kawachi H, Shimizu F, Neumayer HH, Peters H. Stimulation of soluble guanylate cyclase slows progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2005;68(1):47-61.

Weichert W, Paliege A, Provoost AP, Bachmann S. Upregulation of juxtaglomerular NOS1 and COX-2 precedes glomerulosclerosis in fawn-hooded hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280(4): F706-714.

Westerhuis R, van Straaten SC, van Dixhoorn MG, van Rooijen N, Verhagen NA, Dijkstra CD, de Heer E, Daha MR. Distinctive roles of neutrophils and monocytes in anti-thy-1 nephritis. *Am J Pathol.* 2000;156(1):303-10.

Weyd H, Abeler-Dörner L, Linke B, Mahr A, Jahndel V, Pfrang S, Schnölzer M, Falk CS, Krammer PH. Annexin A1 on the surface of early apoptotic cells suppresses CD8+ T cell immunity. *PLoS One.* 2013;8(4):e62449.

Williams SL, Milne IR, Bagley CJ, Gamble JR, Vadas MA, Pitson SM, Khew-Goodall Y. A proinflammatory role for proteolytically cleaved annexin A1 in neutrophil transendothelial migration. *J Immunol.* 2010;185(5):3057-63.

Yang YH, Morand EF, Getting SJ, Paul-Clark M, Liu DL, Yona S, Hannon R, Buckingham JC, Perretti M, Flower RJ. Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:976-984.

Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, Serhan CN, Murphy PM. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev.* 2009;61(2):119-61.

Yi M, Schnitzer JE. Impaired tumor growth, metastasis, angiogenesis and wound healing in annexin A1-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(42):17886-91.

Yona S, Ward B, Buckingham JC, Perretti M, Flower RJ. Macrophage biology in the Anx-A1^{-/-} mouse. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;72(2):95-103.

Zhang MZ, Yao B, Yang S, Jiang L, Wang S, Fan X, Yin H, Wong K, Miyazawa T, Chen J, Chang I, Singh A, Harris RC. CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4519-32.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Frank-Stephan Hohberger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchungen zur Expression des antiinflammatorischen Proteins Annexin A1 in der Niere, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Frank-Stephan Hohberger hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Neymeyer H, Labes R, Reverte V, Saez F, Stroh T, Dathe C, Hohberger S, Zeisberg M, Müller GA, Salazar J, Bachmann S, Paliege A. Activation of annexin A1 signalling in renal fibroblasts exerts antifibrotic effects. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015;215(3):144-58.

Beitrag im Einzelnen: Charakterisierung von Annexin A1 in der gesunden Niere und in den Fibroblasten.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Tabellarischer Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Das Gelingen dieser Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Menschen nicht möglich gewesen. Ich möchte mich daher an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Bachmann und Dr. Alexander Paliege für die Bereitstellung des Themas und die stetige Betreuung und Unterstützung beim Fertigstellen dieser Arbeit danken.

Besonders danke ich auch Frau Kerstin Riskowsky und Frau Frauke Grams, die mich während meiner ersten Schritte im Labor und auch darüber hinaus geduldig beraten und unterstützt hat.

Für die nette Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor möchte ich mich zudem bei Dr. Kerim Mutig, Aljona Borschewski, Christin Dathe, Hanna Neymeyer und Elisabeth Schindler bedanken.

Ein besonderer Dank gilt hier auch meiner Familie, meinen Eltern Dr. Dr. Dieter und Dr. Michaela Hohberger, meinem Bruder Arnim Hohberger sowie Dr. Carolin Hohberger und Dr. Julia Leonhardt, die mich die Jahre über in allen Bereichen unterstützt haben und mir bei der endgültigen Fertigstellung dieses Manuskriptes geholfen haben.