



Technische Universität München

II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Abteilung für Nephrologie

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors Stat1 an der Pathogenese  
der Rapid Progressiven Glomerulonephritis**

Andrea Theresa Baumgartner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen  
Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. Marcus Baumann  
2. Prof. Dr. Dr. h.c. Uwe Heemann

Die Dissertation wurde am 21.11.2017 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.11.2018  
angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Rapid Progressive Glomerulonephritis .....	1
1.1.1	Übersicht.....	1
1.1.2	Typ I Anti-GBM-Ak Glomerulonephritis .....	1
1.1.3	Typ II Immunkomplex RPGN .....	2
1.1.4	Typ III Pauci-immune RPGN .....	2
1.2	Pathogenese der Halbmond-Bildung .....	2
1.2.1	T-Helferzellen.....	5
1.2.2	Interferon- $\gamma$ und der Jak/STAT1-Signalweg .....	6
1.2.3	Die Rolle von Th1 und Interferon- $\gamma$ .....	6
1.2.4	Die Chemokine MIG und IP-10 .....	7
1.3	Fragestellung.....	8
2	Material und Methoden .....	9
2.1	Patientenkollektiv .....	9
2.2	Datenerfassung .....	9
2.3	Biopsate.....	9
2.4	Immunhistochemische Färbung.....	9
2.4.1	Immunhistochemie .....	9
2.4.2	LSAB-Methode .....	10
2.4.3	Durchführung der LSAB-Methode .....	10
2.4.4	Verwendete Reagenzien .....	12
2.5	Beurteilung der gefärbten Schnitte .....	13
2.6	Statistische Auswertung.....	13
3	Ergebnisse.....	14
3.1	Patientenkollektiv .....	14
3.2	Zusammenhang zwischen MIG- Färbung und Schweregrad der Glomerulonephritis zum Diagnosezeitpunkt .....	16
3.2.1	Kreatinin und MIG-Anfärbbarkeit.....	17
3.2.2	Dialysepflichtigkeit und MIG-Anfärbbarkeit.....	20
3.2.3	Halbmondbildung und MIG-Anfärbbarkeit.....	20
3.3	Alter, Geschlecht und MIG-Anfärbbarkeit .....	23

3.4	Einflussfaktoren auf die Mig-Färbung.....	24
3.5	Krankheitsverlauf und MIG-Anfärbbarkeit .....	24
3.5.1	Kreatinin nach 90 Tagen und MIG-Färbung.....	24
3.5.2	Dialysepflicht nach 90 Tagen und MIG-Färbung.....	25
3.6	Einflussfaktoren für die Entwicklung einer Dialysepflicht .....	26
3.6.1	Kreatinin zum Diagnosezeitpunkt.....	26
3.6.2	Halbmondbildung .....	27
3.6.3	MIG-Färbung .....	27
3.7	Einflussfaktoren auf das Outcome der Nierenfunktion .....	28
3.7.1	Kreatinin zum Diagnosezeitpunkt.....	28
3.7.2	Halbmondbildung .....	28
3.7.3	MIG-Färbung.....	29
4	Diskussion .....	30
5	Zusammenfassung.....	34
	Literaturverzeichnis .....	35

# 1 Einleitung

## 1.1 Rapid Progressive Glomerulonephritis

### 1.1.1 Übersicht

Die Rapid Progressive Glomerulonephritis (RPGN) stellt eine seltene Form der Glomerulonephritis mit unterschiedlicher Ätiologie und akutem Verlauf dar. Die Inzidenz liegt bei  $<1/100.000/\text{Jahr}$  (Herold 2013, S. 610). Unbehandelt schreitet die Erkrankung rasch voran und führt innerhalb weniger Tage bis Wochen zu einem Funktionsverlust der Nieren. Klinisch präsentieren die Patienten oft Allgemeinsymptome wie Fieber, Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit (Koch und Anton 2000, S. 205), sowie Hypertonie und Ödeme aufgrund der Flüssigkeitsretention. Laborchemisch lassen sich eine Proteinurie, Hämaturie, ein Anstieg der Retentionsparameter (Kreatinin, Harnstoff), ein Abfall der Glomerulären Filtrationsrate (GFR), sowie erhöhte Entzündungsparameter (CRP, Leukozyten, BSG) nachweisen. Der Verdacht auf eine RPGN stellt eine absolute Indikation zur schnellstmöglichen Nierenbiopsie dar. Das hierbei gewonnene Material wird lichtmikroskopisch, immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch untersucht. Hier lässt sich die für die RPGN typische Halbmond-Bildung als morphologisches Korrelat der Nekrosen der glomerulären Kapillarschlingen, sowie extrakapillärer Proliferationen des parietalen Epithels der Bowmanschen Kapsel erkennen (Koch und Anton 2000, S. 202). Immunhistochemisch können drei Formen der RPGN unterschieden werden.

### 1.1.2 Typ I Anti-GBM-Ak Glomerulonephritis

Der Typ I ist mit einem Anteil von ca. 10% an allen Formen der seltenste. Hier finden sich Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran, weshalb er auch als Anti-Basalmembran-RPGN bezeichnet wird. Diese Antikörper können serologisch und mittels immunhistochemischer Färbung einer Nierenbiopsie nachgewiesen werden. Bei Letzterer erkennt man eine lineare Ablagerung von IgG und Komplementfaktor C3 an der Basalmembran (Herold 2013, S. 610). Dieser Typ der RPGN lässt sich in eine seltenere Form ohne Lungenbeteiligung und eine Form mit Lungenbeteiligung, dem Goodpasture-Syndrom, unterteilen. Die Lungenbeteiligung entsteht durch die Zerstörung von Alveolen durch die Anti-Basalmembran-Antikörper und äußert sich mit Husten, Dyspnoe und Hämoptysen.

### 1.1.3 Typ II Immunkomplex RPGN

Dem Typ II, der in ca. 40% der Fälle vorkommt, liegt eine granuläre Ablagerung von Immunkomplexen an der glomerulären Basalmembran zugrunde. Die Ätiologie dieser Immunkomplexe ist vielgestaltig. Die häufigsten zugrunde liegenden Erkrankungen sind eine postinfektiöse Genese, bspw. nach einer durch Streptokokken ausgelösten Erkrankung (Post-Streptokokken-Glomerulonephritis), eine IgA-Nephritis, sowie Systemerkrankungen wie ein systemischer Lupus Erythematodes oder eine Purpura Schönlein-Henoch.

### 1.1.4 Typ III Pauci-immune RPGN

In ca. 50% der Fälle liegt ein Typ III vor. Dieser beschreibt eine renale Beteiligung ANCA-assoziiierter Vaskulitiden und geht ohne Ablagerung von Immunkomplexen oder Immunglobulinen einher, weshalb er auch als „pauci-immune“ bezeichnet wird. Die zugrunde liegenden Vaskulitiden sind meist eine Wegener-Granulomatose, eine mikroskopische Polyangiitis oder ein Churg-Strauss-Syndrom.

## 1.2 Pathogenese der Halbmond-Bildung

Obwohl die Ätiologie sehr vielgestaltig ist, ist das typische histologische Bild der Halbmondbildung bei allen Formen nachweisbar und pathognomonisch für die RPGN. Im Zentrum der Pathogenese steht die Schädigung der glomerulären Kapillarschlinge, welche zellulären und humoralen Entzündungsmediatoren den Durchtritt in den Bowman-Raum ermöglicht. Wie es zu dieser Schädigung kommt, hängt vom Typ der RPGN ab.

### **Typ I Anti-GBM-Ak Glomerulonephritis**

Hier kommt es, wie bei Autoimmunerkrankungen typisch, zu einem Verlust der Selbsttoleranz des Immunsystems, in diesem Fall gegenüber der  $\alpha$ 3-Kette des Kollagen Typ IV, ein wichtiger Bestandteil von Basalmembranen, wodurch autoreaktive T-Lymphozyten entstehen. Diese führen via Interaktion mit B-Lymphozyten zur Produktion der Autoantikörper, meist vom Typ IgG, welche gegen die nicht kollagene Domäne (NC1) der  $\alpha$ 3-Kette des Kollagen Typ IV gerichtet sind (Borza 2007). Schon 1967 konnten Lerner et al. zeigen, dass diese Autoantikörper für die Entstehung der Glomerulonephritis von zentraler Bedeutung sind. Er injizierte aus den Seren erkrankter Patienten gewonnene Anti-GBM-Antikörper in Affen, welche daraufhin ebenfalls eine Anti-Basalmembran Glomerulonephritis entwickelten (Lerner et al. 1967). So weisen 87% der Patienten, die

eine histologisch gesicherte Anti-GBM Glomerulonephritis zeigen, Antikörper gegen die NC1-Domäne des Kollagen Typ IV auf (Jennette 2003). Die zirkulierenden Antikörper binden nun an die NC1-Domäne und lagern sich dort linear ab. Dass die Bindung nur an die glomeruläre und beim Goodpasture Syndrom zusätzlich an die alveoläre Basalmembran erfolgt, resultiert aus der Zugänglichkeit dieser Strukturen für die Antikörper. So nimmt man an, dass das Kapillarendothel der Glomeruli aufgrund seiner Fenestrierung für IgG durchlässig ist, welche dadurch die Basalmembran erreichen können. Das Endothel der Lungenkapillaren ist normalerweise nicht für Moleküle der Größe von IgG durchlässig, kann aber durch bestimmte Noxen, wie Zigarettenrauch oder Infekte durchlässiger werden (Borza 2007).

An der Basalmembran gebunden führen die Antikörper zur Aktivierung des Komplementsystems mit Bildung von aktiviertem C3 und C4, von Anaphylatoxinen C3a und C4a und C5b-9. C3 führt zur Aktivierung von Phagozyten und deren Wanderung in die Glomeruli (Koch und Anton 2000, S. 177–180). Die Anaphylatoxine bewirken eine Einwanderung von Granulozyten und Monozyten, welche beide über eine Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Proteasen zu einer Schädigung der glomerulären Basalmembran führen (Couser 1998). C5b-9 führt abhängig von seiner Konzentration am Glomerulum über zwei verschiedene Wege zu einer Schädigung der Basalmembran. Liegt es in hoher Konzentration vor, so bildet es den sogenannten Membranangriffskomplex (MAC), welcher durch Zelllyse eine glomeruläre Schädigung verursacht. In geringeren sublytischen Konzentrationen wiederum agiert C5b-9 als potenter Stimulus für die Produktion von Sauerstoffradikalen, Proteasen, Prostaglandinen und Zytokinen (Couser 1998).

## **Typ II Immunkomplex RPGN**

Bei der Immunkomplex RPGN kommt es ähnlich der Anti-GBM Glomerulonephritis zur Ablagerung von Immunkomplexen an der Basalmembran. Anders als bei dieser Form kommt es aber nicht zur Bindung eines Antikörpers, der gegen die Basalmembran gerichtet ist, sondern zur Bindung eines Antigens an die glomeruläre Basalmembran. Diese Antigene sind abhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung. Beim systemischen Lupus beispielsweise wurden zahlreiche als Antigen wirkende Strukturen identifiziert. Izui et al konnten zeigen, dass DNA Bruchstücke, welche aus zerstörten Zellen frei werden können, eine hohe Bindungsaffinität zu Kollagen zeigen und so an die Basalmembran gebunden werden. Hier agieren sie als Antigen und bilden mit Anti-DNA-Antikörpern

Immunkomplexe (Izui et al. 1976). Weiterhin wurden Heparatsulfate (Faaber et al. 1986) Phospholipide und Histone (Koch und Anton 2000, S. 383) als Antigene identifiziert, mit welchen die Anti-DNA Antikörper eine Kreuzreaktivität aufweisen. Analog zur Anti-GBM Glomerulonephritis führt die Ablagerung von Immunkomplexen an der Basalmembran auch hier zu einer Komplementaktivierung mit konsekutiver Schädigung der Glomeruli.

### **Typ III Pauci-immune RPGN**

Die bei dieser Form der RPGN vorhandenen antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörper (ANCA) konnten als wichtiger Bestandteil in der Pathogenese identifiziert werden. Man unterscheidet cANCA, welche gegen die Proteinase 3 (PR3) gerichtet sind und pANCA, welche sich gegen die Myeloperoxidase (MPO) richten.

Folgende Hypothese zur Pathogenese der Pauci-immun RPGN wurde aufgestellt:

Im Rahmen eines Infektes werden proinflammatorische Zytokine ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-8) freigesetzt. Diese führen zur Translokation von Antigenen wie PR3 auf die Zelloberfläche von Monozyten und Granulozyten, wo sie für ANCA zugänglich sind. Die Zytokine bewirken zusätzlich die Bildung von Adhäsionsmolekülen, die zur Bindung von Monozyten und Granulozyten an den Endothelzellen führen. Die Bindung von ANCA an den Antigenen auf der Zelloberfläche führt nun zu einer Degranulation mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Proteasen, welche eine Schädigung der glomerulären Basalmembran hervorrufen (Gross et al. 1993).

Die weiteren Schritte in der Pathogenese der Halbmondbildung scheinen für alle Formen gleich zu verlaufen. Es lassen sich verschiedene Stadien der Halbmonde unterscheiden. Zelluläre Halbmonde stellen den ersten Schritt in der Pathogenese dar und bestehen hauptsächlich aus zellulären Bestandteilen. Sie können sich im weiteren Verlauf über eine fibröse Organisation zu fibrösen Halbmonden entwickeln.

Rich stellte 1956 die Hypothese auf, dass die Halbmonde aus proliferierenden Epithelzellen gebildet werden und durch die Schädigung der Kapillaren eingedrungene Gerinnungsfaktoren eine Rolle dabei spielen (RICH 1956). Dass die Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems an der Halbmondbildung beteiligt ist, konnte in weiteren Studien belegt werden. Vassalli et al. wiesen in den Halbmonden Fibrin nach und konnten ein Ausbleiben der Halbmondbildung durch Behandlung mit Warfarin im Tierexperiment beobachten (Vassalli und McCluskey 1964). Ähnliche Ergebnisse konnten auch durch

Gabe von Heparin beobachtet werden (Halpern et al. 1965). Ebenso führte die Defibrinierung des Plasmas im Tierexperiment zu einer Reduktion der Halbmondbildung (Naish et al. 1972). Durch einen Defekt in der glomerulären Kapillaren gelangen Gerinnungsfaktoren in den Bowmanschen Raum, wo sie über Kontakt mit Tissue Factor aktiviert werden und zur Produktion von Fibrin führen, eine erhöhte Aktivität von PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1) verhindert den Abbau des Fibrins (Grandaliano et al. 2000). Über eine chemotaktische Wirkung des Fibrins kommt es zur Einwanderung von Makrophagen in den Bowmanschen Raum (Atkins et al. 1996). Des Weiteren lösen eingewanderte aktivierte Gerinnungsfaktoren und inflammatorische Zytokine eine Zytokinfreisetzung durch glomeruläre Zellen und eingewanderte Leukozyten aus, welche wiederum zur Einwanderung von Makrophagen führt (Jennette 2003). Makrophagen können ebenfalls lokal im Bowmanschen Raum proliferieren. Sie exprimieren Adhäsionsmoleküle, welche die Adhäsion an glomeruläre Epithelzellen ermöglichen. Weitere Adhäsionsmoleküle führen zur Bindung an Fibrinogen und Fibronectin, welche in den frühen Stadien der Halbmondbildung nachweisbar sind (Atkins et al. 1996). Weiterhin kommt es, vermutlich über Freisetzung von Mitogenen, zur Proliferation der glomerulären parietalen Epithelzellen (Koch und Anton 2000, S. 203). Makrophagen und Epithelzellen sind die beiden vorherrschenden Zellarten in den Halbmonden, weiterhin sind auch T-Zellen nachweisbar.

Über eine Einwanderung interstitieller Fibroblasten, sowie die Produktion von Extrazellulärmatrix durch die proliferierenden parietalen Epithelzellen kommt es zum fibrösen Umbau der zellulären Halbmonde (Jennette 2003).

Neuere Studien beschäftigten sich mit der Rolle der T-Zellen in der Pathogenese der Halbmondbildung und deuten darauf hin, dass die Halbmondbildung die Folge einer Th1-vermittelten Reaktion ähnlich einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp ist (Holdsworth et al. 1999).

### 1.2.1 T-Helferzellen

CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen lassen sich anhand ihres Zytokinmusters in zwei Untergruppen einteilen, die Th1- und Th2-Zellen. So produzieren Th1-Zellen Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumor Nekrose Faktor  $\beta$  (TNF $\beta$ ). Außerdem bewirken sie die Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen und sind maßgeblich an der

Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV (Spättyp) und der Abwehr intrazellulärer Erreger beteiligt. Th2-Zellen produzieren andererseits die Interleukine (IL)- 4, IL-5 und IL-10 und sind für die IgE/Mastzell-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I) wichtig. Des Weiteren vermitteln sie über IL-4 die Aktivierung von B-Zellen und somit die Antikörperproduktion (Mosmann und Coffman 1989; Romagnani 1995).

### 1.2.2 Interferon- $\gamma$ und der Jak/STAT1-Signalweg

Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ist ein proinflammatorisch wirksames Zytokin aus der Gruppe der Interferone. Es wird vorwiegend von CD8+-T-Zellen, CD4+-Th1-Zellen und Natural Killer Zellen (Otani et al. 1999), aber auch von einigen anderen Zellarten wie Endothelzellen (Wei et al. 2000) und auch renalen, v.a. tubulären Zellen (Timoshanko et al. 2002) gebildet. Seine vielfältigen Effekte umfassen die Aktivierung von Makrophagen, die Hochregulierung der Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, sowie die Beeinflussung der Differenzierung von CD4+-T-Zellen hin zu einem Th1-Subtyp (Schroder et al. 2004). Diese Effekte entfaltet IFN- $\gamma$  über den sogenannten Jak/STAT-Pathway und beruhen auf der Aktivität des Transkriptionsfaktors signal transducer and activator of transcription (STAT)-1.

IFN- $\gamma$  bindet hierbei an seinen Rezeptor, welcher aus zwei Untereinheiten besteht (IFN- $\gamma$ R1 und IFN- $\gamma$ R2), an diesen gebunden sind jeweils eine Januskinase (Jak)-1 und -2. Die Bindung am Rezeptor verursacht eine Konformationsänderung dessen, welche die Jak2 aktiviert und zu einer Autophosphorylierung führt. Die aktivierte Jak2 wiederum löst die Phosphorylierung und Aktivierung der Jak1 aus. Die aktivierte Jak1 erzeugt über die Phosphorylierung von Tyrosinresten an den beiden IFN- $\gamma$ R1 zwei Andockungsstellen für Stat1. Durch Bindung von Stat1 an diesen Stellen, werden die Monomere phosphoryliert und zu Homodimeren, welche von der Bindungsstelle dissoziieren und in den Zellkern wandern. Hier binden sie an sogenannte Interferon- $\gamma$  Aktivierungsstellen (GAS), über die sie die Transkription IFN- $\gamma$ -abhängiger Gene regulieren (Darnell et al. 1994).

### 1.2.3 Die Rolle von Th1 und Interferon- $\gamma$

Huang et al. untersuchten die Rolle von Th1 und IFN- $\gamma$  an der experimentell ausgelösten Glomerulonephritis im Tiermodell. Sie konnten zeigen, dass Tiere, welche vorwiegend ein Th1-Reaktionsmuster aufwiesen, eine stärkere Halbmondbildung zeigten als diese mit Th2-Reaktionsmuster. In diesen Halbmonden fanden sich T-Zellen, Makrophagen und

Fibrin, alle Komponenten einer Th1-Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV. Die Tiere zeigten außerdem höhere IFN $\gamma$ -Titer und die Gabe von anti-IFN $\gamma$ -Antikörpern führte zu einer signifikanten Reduktion der glomerulären Schädigung, sowie der Halbmondbildung (Huang et al. 1997). Diese Erkenntnisse konnten in weiteren Studien bekräftigt werden. So entwickelten IFN $\gamma$ -defiziente Mäuse, bei denen experimentell eine Glomerulonephritis ausgelöst wurde, weniger Halbmonde, wiesen weniger CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, Makrophagen und Fibrin in den Glomeruli auf und zeigten einen weniger schweren Krankheitsverlauf als Mäuse vom Wildtyp (Kitching et al. 1999; Timoshanko et al. 2002). Die Halbmondbildung ist also Folge einer Th1-assoziierten Reaktion ähnlich der Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp und IFN- $\gamma$  ist das maßgeblich beteiligte Zytokin.

Ähnliche Ergebnisse brachten Studien zur Lupusnephritis. Tiere mit defizientem IFN- $\gamma$  Rezeptor zeigten ein verlängertes Überleben und bildeten keine Glomerulonephritis aus (Haas et al. 1997; Haas et al. 1998; Schwarting et al. 1998). Ebenso konnte durch Behandlung mit IFN- $\gamma$ -Antikörpern die Einwanderung von T-Zellen und Makrophagen in die Glomeruli verhindert und die Schwere der Glomerulonephritis herabgesetzt werden (Ozmen et al. 1995).

#### 1.2.4 Die Chemokine MIG und IP-10

Das Monokine induced by Interferon- $\gamma$  (MIG) und interferone-induced protein of 10kDa (IP-10), heutzutage auch als CXCL9 und CXCL10 bezeichnet, sind strukturell und funktionell verwandte Chemokine (chemotaktisch wirkende Zytokine). Sie entfalten ihre Wirkung über einen gemeinsamen Rezeptor, CXCR3 (Sgadari et al. 1997), welcher ausschließlich auf aktivierten T-Zellen und NK-Zellen vorhanden ist (Charles R. Mackay 1996). Wie aus ihrer ursprünglichen Bezeichnung schon hervorgeht, werden die beiden Chemokine IFN- $\gamma$ -abhängig via dem Jak/STAT-Pathway induziert (Farber 1990), ihre Produktion kann u.a. durch viszerale Epithelial- und Mesangialzellen erfolgen (Gómez-Chiari et al. 1993; Romagnani et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass CXCR3 und seinen Liganden MIG und IP-10 eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von aktivierten T-Zellen zu Orten Th1-vermittelter Entzündung zukommt. Campanella et al. entwickelten ein in vivo Modell, welches die Wanderung von ins Peritoneum von Mäusen eingebrachte aktivierte (und somit CXCR3-exprimierende) T-Zellen hin zu den Luftwegen, in welche IP-10 installiert wurde, beobachtete. Sie zeigten, dass die Wanderung der T-Zellen abhängig von der Interaktion zwischen CXCR3 und seinem Liganden verlief (Campanella

et al. 2008). Eine weitere Studie wies nach, dass die Blockade von CXCR3 mit einem anti-CXCR3-Antikörper die Migration von aktivierten T-Zellen zum Ort einer Entzündung hemmt (Xie 2003).

Eine verstärkte Expression von MIG und IP-10 wurde in verschiedenen Geweben mit entzündlicher Aktivität gefunden, darunter auch in Tiermodellen der Glomerulonephritis (Tang et al. 1995; Segerer und Alpers 2003). Ebenso zeigte sich ihr Rezeptor CXCR3 in glomerulären Strukturen, v.a. auf den Mesangialzellen von Patienten mit proliferativer Glomerulonephritis stark exprimiert. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass MIG und IP-10 eine Proliferation von Mesangialzellen bewirken. Daraus lässt sich schließen, dass die Chemokine nicht nur insofern an der Entstehung der Glomerulonephritis und der Halbmonde beteiligt sind, dass sie die Migration von aktivierten T-Zellen an den Ort der Entzündung bewirken, sondern auch direkt die Proliferation der Mesangialzellen induzieren (Romagnani et al. 1999).

### 1.3 Fragestellung

Da die biologischen Effekte von IFN- $\gamma$  auf der Aktivierung des Jak/STAT-Signalweg und der Aktivität von STAT1 beruhen, könnten die Daten aus den bisherigen Studien, die die Rolle einer Th1-gesteuerten, IFN- $\gamma$ -abhängigen Reaktion an der Entwicklung von Glomerulonephritiden mit Halbmondbildung bewiesen, ein Hinweis auf die Rolle des Jak/STAT- Pathways in der Pathogenese dieser Erkrankungen sein. Da bisherigen Daten zufolge dem Zytokins Mig eine maßgebliche Rolle in der Entwicklung von Glomerulonephritiden mit Halbmondbildung zukommt, und dieses über den Jak/Stat1-Signalweg exprimiert wird, wurde dessen Expression als Marker für die Stat1- Aktivität herangezogen. Es wurden 25 Nierenbiopsien von Patienten mit rapid progressiver Glomerulonephritis immunhistochemisch mit einem MIG-Antikörper angefärbt. Das Maß der Färbung der Glomeruli wurde dann mit klinischen und laborchemischen Befunden korreliert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv setzt sich aus 25 Patienten zusammen, welche im Zeitraum der Jahre 2009-2013 aufgrund einer Rapid progressiven Glomerulonephritis am Klinikum rechts der Isar behandelt wurden. Die Diagnose wurde mittels einer Nierenbiopsie gestellt, welche in der Abteilung für Nephropathologie am Universitätsklinikum Erlangen ausgewertet wurden.

### 2.2 Datenerfassung

Die für die Auswertung verwendeten klinischen und laborchemischen Daten wurden aus der klinikinternen Datenbank entnommen.

Die histologischen Befunde der Biopsien wurden aus den Akten der Patienten entnommen.

### 2.3 Biopsate

Die für diese Arbeit angefärbten und untersuchten Biopsate wurden in Form von Paraffinblöcken in der Pathologie des Univeritätsklinikums Erlangen aufbewahrt und zur Verfügung gestellt.

### 2.4 Immunhistochemische Färbung

#### 2.4.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit welcher spezifische Antigene in einem Gewebe mithilfe einer Antigen/Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden können.

Man unterscheidet eine direkte und eine indirekte Methode. Bei der direkten Methode wird ein Antikörper verwendet, an den ein Marker, beispielsweise eine Peroxidase gebunden ist. Dieser Antikörper bindet nun spezifisch an das Antigen von Interesse und löst durch den Marker eine Farbreaktion aus, welche unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden kann. Bei der indirekten Methode werden nun zwei Antikörper verwendet. Der erste Antikörper ist nicht markiert und bindet analog der direkten Methode spezifisch an das Antigen. Der zweite Antikörper ist markiert, bindet spezifisch an den ersten Antikörper und löst wiederum eine sichtbare Farbreaktion aus (Dabbs 2013, S. 1–6).

#### 2.4.2 LSAB-Methode

Für diese Arbeit wurde eine indirekte immunhistochemische Methode verwendet, die sogenannte labelled streptavidin-biotin (LSAB) Methode. Diese macht sich die Eigenschaft des Proteins Avidin zunutze, vier Bindungsstellen für Biotin mit hoher Affinität zu diesem zu besitzen. In einem ersten Schritt bindet ein Antikörper (hier ein anti-MIG/CLCX9-, bzw. IP-10/CLCX10-Antikörper) spezifisch an das zu untersuchende Antigen (hier MIG/CLCX9, bzw. IP-10/CLCX10) der Gewebeprobe. Als nächstes wird der zweite Antikörper, an welchen Biotin gebunden ist, hinzugegeben. Dieser bindet wiederum spezifisch an den ersten Antikörper und dient so als Brücke zwischen diesem und einem im nächsten Schritt hinzugegebenen Komplex aus einem Enzym (hier Horseradish-Peroxidase) und Streptavidin, welcher nun an die freien Bindungsstellen des Biotins binden kann. Als letzten Schritt wird zur Sichtbarmachung des so entstandenen Komplexes ein Substrat hinzugegeben, welches von dem Enzym in ein sichtbares Produkt umgewandelt wird (Guesdon et al. 1979).

#### 2.4.3 Durchführung der LSAB-Methode

Zunächst wurden aus den Paraffinblöcken die Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 37°C getrocknet. Als nächstes wurden die Objektträger auf einem Färbegestell zur Entfernung des Paraffins für 10 Minuten in einen Behälter mit Xylene getaucht, dieser Schritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Daraufhin wurden die Schnitte für jeweils 2 Minuten zuerst zweimal in eine 100%-ige, dann je einmal eine 96%-ige und eine 70%-ige Ethanollösung getaucht, um das Ethanol auszuwaschen und das Gewebe zu rehydrieren. Zur Entfernung des restlichen Ethanol wurden die Schnitte dann noch einmal 2 Minuten in destilliertes Wasser getaucht.

Als nächstes wurden 500ml Target retrieval solution 2x10 Minuten bei 750W in der Mikrowelle vorgewärmt und zusammen mit den Objektträgern in eine Plastikbox gegeben. Diese wurde wiederum für 3x5 Minuten bei 350W in der Mikrowelle erwärmt und anschließend bis zum Erreichen von Raumtemperatur mindestens 30 Minuten abkühlen lassen. Dann wurden die Schnitte in 1x TBS Puffer gewaschen und mit einem Pap Pen (Kisker) umfahren. Nun wurden die Schnitte in einer feuchte Kammer plaziert und 100µl Peroxidase und Alkaline Phosphatase blocking reagent hinzugegeben, um die endogene Peroxidase und alkalische Phosphatase zu blockieren. Die Schnitte wurden daraufhin für 10 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte das

Waschen der Schnitte für 3x5 Minuten in 1x TBS Puffer pH 7,6. Zur Blockade unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde jeweils ein Tropfen Proteinblock serum free auf jeden Objektträger gegeben und diese bei Raumtemperatur nochmals für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit aller Schnitte mit Ausnahme der Negativkontrolle mit Hilfe eines Papiertuches entfernt und 100µl des anti-MIG/CLCX9-IgG, bzw. anti-IP-10/CLCX10 Antikörpers aufgebracht und die Schnitte bei Raumtemperatur für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden diese (inklusive der Negativkontrolle) für 3x5 Minuten in 1xTBS Puffer gewaschen, 100µ des Horseradish-Peroxidase (HRP-POD) conjugated (mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert) biotinylated anti-rabbit IgG aufgebracht und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Danach erfolgte erneut das Waschen für 3x5 Minuten in 1xTBS Puffer. Nun wurden 100µl Horseradish-Peroxidase Streptavidin auf alle Schnitte inkl. Der Negativkontrolle hinzugegeben und diese für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Nun wurden 100µl ImmPACT DAB peroxidase substrate hinzugegeben und die Schnitte nochmals 5 Minuten inkubiert. Als nächstes wurden die Objektträger wieder auf dem Färbegestell plaziert und für 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden die Zellkerne gegengefärbt. Hierzu wurden die Schnitte für 2 Minuten in Meyers Hämalaun gegeben, anschließend für 5 Minuten unter laufendes Leitungswasser gehalten um die Färbung zu stabilisieren, hierbei erfolgte die Farbänderung von dunkelrot zu blau. Dann wurden die Schnitte mittels jeweils 2x2 minütigem Bad in zunächst 70%-igem, dann 96%-igem und 100%-igem Ethanol dehydriert und mit Ethanol versetzt. Dieser wurde daraufhin in einem Bad mit Xylene für 3x5 Minuten wieder entfernt. Die Schnitte wurden nun mit Roti-Histokitt bedeckt und über Nacht getrocknet.

Diese Methode färbt die MIG/CLCX9-, bzw. IP-10/CLCX10-positiven Bereiche braun und die Zellkerne blau an.

#### 2.4.4 Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Verdünnung
Peroxidase and Alkaline Phosphatase Blocking Reagent	DAKO	Ready to use
10x Target Retrieval Solution Citrate pH6	DAKO	100ml mit 900ml aqua dest. verdünnt
Biotin Blocking System Avidin Solution	DAKO	Ready to use
Biotin Blocking System Biotin Solution	DAKO	Ready to use
Proteinblock Serum free	DAKO	Ready to use
10x TBS Puffer: 24,2g Tris (Roth) und 80g Natriumchlorid (Sigma)		Bis pH 7,6 erreicht mit aqua dest. (bis zu 1000ml) auffüllen
1x TBS Puffer		100ml 10x TBS Puffer in 900ml aqua dest. verdünnt
rabbit anti-MIG/CLCX9 IgG	Genetex	1:200 in 1x TBS verdünnt
rabbit anti-IP10/CLCX10	Abcam	1:50 in 1x TBS verdünnt
Biotinylated anti rabbit IgG, HRP –POD conjgated	Vector	1:50 in 1x TBS verdünnt
Horseradish Peroxidase (HRP –POD) Streptavidin	Vector	1:100 in 1x TBS verdünnt
ImmPACT DAB peroxidase substrate	Vector	1ml ImmPACT Diluent + 1 Tropfen ImmPACT DAB Chromogen concentrate, gut vermischt
Xylene		Ready to use
Mayers Häkalaun		Ready to use
70% Ethanol		Ready to use
96% Ethanol		Ready to use
100% Ethanol		Ready to use
Rotihistokitt	Roth	Ready to use

Tab. 1: Verwendete Reagenzien

## 2.5 Beurteilung der gefärbten Schnitte

Die angefärbten Nierenschnitte wurden unter einem Lichtmikroskop der Firma OLYMPUS, Modell BX40 mit 10- und 40-facher Vergrößerung betrachtet. Die Expression von MIG, bzw. IP-10 in den Glomeruli wurde semiquantitativ in vier Grade eingeteilt:

Grad I: < 25% Anfärbbarkeit (schwache Expression)

Grad II: 25-50% Anfärbbarkeit (geringe Expression)

Grad III: 50-75% Anfärbbarkeit (mittlere Expression)

Grad IV: 75-100% Anfärbbarkeit (starke Expression).

Diese Einteilung bezieht sich auf eine Positivkontrolle, welche 100% Anfärbbarkeit entspricht.

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels IBM SPSS Statistics 20 für Windows. Die Beschreibung des Patientenkollektivs erfolgte mittels Methoden der deskriptiven Statistik. Der Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen erfolgte mittels T-Test bei unabhängigen Stichproben, wurden mehr als zwei Gruppen betrachtet mittels einfaktorieller ANOVA. Unter Zuhilfenahme der Post-Hoc-Analyse wurde im Anschluss die Signifikanz von Abweichungen in den Mittelwerten untersucht.

Zur Überprüfung einfacher Zusammenhänge wurde die Korrelation verwendet. Die Analyse erfolgte zum einen bivariat, um die Korrelation zwischen zwei Variablen zu untersuchen und partiell, um zudem den Effekt einer oder mehrerer zusätzlichen Variablen zu untersuchen.

Um festzustellen, welche Variablen einen Einfluss auf die MIG-Färbung aufwiesen, wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt.

Zuletzt erfolgte mittels Cox-Analyse die Untersuchung des Einflusses unabhängiger Faktoren auf den Eintritt der Dialysepflicht, bzw. schlechter Nierenfunktion (Kreatinin  $\geq$  2mg/dl) nach 90 Tagen.

Das Signifikanzniveau wurde auf  $< 0,05$  festgelegt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv setzt sich aus 25 Patienten zusammen, die im Zeitraum von 2009 bis 2013 am Klinikum rechts der Isar mithilfe einer Nierenbiopsie die Diagnose Rapid Progressive Glomerulonephritis erhielten. Von diesen 25 Patienten waren 13 weiblich und 12 männlich. Die Altersverteilung ist annähernd normalverteilt, der Mittelwert des Alters zum Zeitpunkt der Diagnose beträgt 52,3 Jahre mit einer Standardabweichung von 17,2. Die Altersverteilung bei den weiblichen und männlichen Patienten war sehr ähnlich, bei den weiblichen Patienten betrug der Mittelwert 52,6 Jahre mit einer Standardabweichung von 16,3 und bei den männlichen Patienten 51,9 Jahre mit einer Standardabweichung von 18,8.

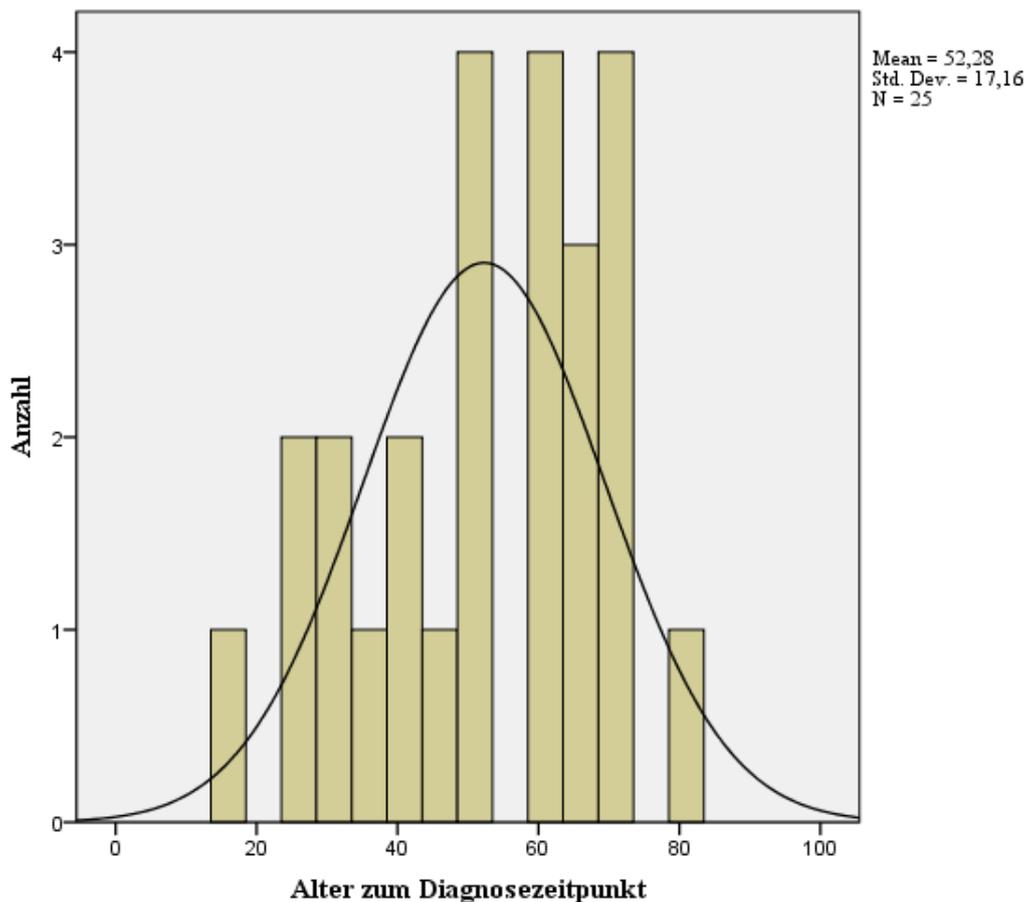


Abb 1: Altersverteilung des Patientenkollektivs

	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
<i>männlich</i>	12	51,9	18,8	16	73
<i>weiblich</i>	13	52,6	16,3	28	79
<i>gesamt</i>	25	52,3	17,2	16	79

Tab.2: Altersverteilung des Patientenkollektivs nach Geschlecht

Die Patienten konnten anhand der Biopsien in die unterschiedlichen Grunderkrankungen, welche der Rapid Progressiven Glomerulonephritis zugrunde liegen, eingeteilt werden. Kein Patient wies eine Anti-Glomeruläre-Basalmembran-Antikörper Glomerulonephritis (Typ I) auf, bei 9 Patienten wurde eine Immunkomplexablagerung (Typ II) und bei 16 Patienten eine Pauci-Immune Glomerulonephritis (Typ III) festgestellt. Bei den männlichen Patienten wiesen jeweils 6 einen Typ II, sowie 6 einen Typ III auf. Die weiblichen Patienten zeigten in nur 4 Fällen einen Typ II, in 9 einen Typ III. Auch beim Alter zeigten sich Unterschiede in der Grunderkrankung. Zum Diagnosezeitpunkt betrug das mittlere Alter bei Typ II 39,4 Jahre und bei Typ III 59,5 Jahre.

	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
<i>Typ II Immunkomplex- Ablagerungen</i>	9	39,4	12,8	16	52
<i>Typ III pauci- immune</i>	16	59,5	15,2	28	79
<i>gesamt</i>	25	52,3	17,2	16	79

Tab. 3: Verteilung der Grunderkrankung nach Alter zum Diagnosezeitpunkt

Zur Beurteilung der Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Diagnose wurde der Kreatininwert herangezogen. Hierbei zeigte sich ein Mittelwert von 5,1 mg/dl mit einer Standardabweichung von 3,9. Bei den weiblichen Patienten betrug der Mittelwert 4,4 mg/dl und bei den männlichen Patienten 5,8 mg/dl. Beim Alter zeigten sich kaum Unterschiede in der Verteilung des Kreatininwerts. Größere Unterschiede waren bei der Grunderkrankung zu erkennen, hier zeigte sich ein Mittelwert von 3,2 mg/dl bei Typ II und von 6,1 mg/dl bei Typ III.

	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
<i>Typ II Immunkomplex- Ablagerungen</i>	9	3,2	3,0	0,6	10,2
<i>Typ III pauci- immune</i>	16	6,1	4,1	0,7	15,1
<i>gesamt</i>	25	5,1	3,9	0,6	15,1

Tab. 4: Kreatinin in Abhängigkeit von der Grunderkrankung

Um beurteilen zu können, welche Qualität die untersuchten Biopsate aufwiesen, wurden die Anzahl der angeschnittenen Glomeruli, sowie die Anzahl der angeschnittenen Glomeruli mit Halbmondbildung als Parameter herangezogen. Im Mittel waren 16,4 Glomeruli angeschnitten, nur in 4 Fällen wurden weniger als 10 Glomeruli getroffen, davon einmal 6 in dreimal 9. Eine Zahl größer/gleich 10-15 Glomeruli gilt als ein gutes Präparat, jedoch können meist auch 6-10 Glomeruli ausreichen (Amann und Haas 2006). Daher wiesen alle untersuchten Biopsate eine gute bis ausreichende Qualität auf.

### 3.2 Zusammenhang zwischen MIG- Färbung und Schweregrad der Glomerulonephritis zum Diagnosezeitpunkt

Zur Beurteilung, inwieweit das Ausmaß der immunhistochemischen MIG-Färbung mit dem Schweregrad der RPGN korrelierte, wurde die Anfärbbarkeit der Glomeruli mit Halbmondbildung betrachtet und diese in vier Gruppen eingeteilt:

Grad 0: keine Anfärbbarkeit

Grad I: < 25% Anfärbbarkeit

Grad II: 25-50% Anfärbbarkeit

Grad III: 50-75% Anfärbbarkeit

Grad IV: 75-100% Anfärbbarkeit

Die Angaben beziehen sich auf eine Positivkontrolle, welche der Anfärbbarkeit von 100% entspricht.

Anschließend wurde der Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Anfärbbarkeit und dem Kreatininwert zum Diagnosezeitpunkt, der Notwendigkeit einer Dialyse zum Diagnosezeitpunkt, sowie dem prozentualen Anteil der Glomeruli mit Halbmondbildung

an der Gesamtzahl der Glomeruli im untersuchten Biopsat als Faktoren für die Schwere der Erkrankung betrachtet.

### 3.2.1 Kreatinin und MIG-Anfärbbarkeit

Es wurde zuerst der Zusammenhang zwischen MIG-Anfärbbarkeit und Kreatininwert betrachtet. Hier zeigten sich die in Tabelle 5 dargestellten Mittelwerte für Kreatinin nach MIG-Anfärbbarkeit aufgetrennt.

<i>Anfärbbarkeit</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
<25%	11	3,2	3,0	0,6	10,8
25-50%	9	7,1	4,9	0,8	15,1
50-75%	2	7,1	1,0	6,4	7,8
<i>gesamt</i>	22	5,1	4,2	0,6	15,1

Tab. 5: Zusammenhang zwischen Kreatinin zum Diagnosezeitpunkt und MIG-Anfärbbarkeit

Da auffiel, dass sich die Werte für Kreatinin bei einer Anfärbbarkeit < 25% stark von denen  $\geq 25\%$  unterschieden, die Werte zwischen 25-50% und 50-75% aber kaum, wurde zusätzlich ein T-Test auf unabhängige Variablen für Anfärbbarkeiten < 25% und  $\geq 25\%$  durchgeführt.

	<i>MIG-Färbung</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>
	<i>Halbmonde</i>			
<i>Kreatinin zum</i>	<25%	11	3,2	3,0
<i>Diagnosezeitpunkt</i>	$\geq 25\%$	11	7,1	4,4

Tab. 6: T-Test zum Vergleich des mittleren Kreatinin-Wertes nach MIG-Anfärbbarkeit

Hierbei zeigte sich eine Signifikanz (p-Wert) von 0,03, d.h. die Mittelwerte der Kreatininkonzentration zum Diagnosezeitpunkt unterscheiden sich signifikant zwischen den beiden Gruppen MIG-Anfärbbarkeit < 25% und  $\geq 25\%$ . Daraus lässt sich schließen, dass eine stärkere MIG-Anfärbbarkeit mit einem hohen initialen Kreatinin korreliert. Dies bestätigte sich ebenso in der Korrelationsanalyse nach Spearman. Hierbei zeigte sich eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen der MIG-Färbung und dem

Kreatinin-Wert. Um zu ermitteln, ob dieser Zusammenhang unabhängig von Geschlecht und Alter bestand, wurde zusätzlich die partielle Korrelation unter Berücksichtigung dieser Faktoren durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Korrelation unabhängig vom Geschlecht weiterhin statistisch signifikant bestand. Wurde das Alter mit einbezogen, war der Zusammenhang knapp nicht mehr signifikant, bestand aber weiterhin noch.

<i>Korrelation</i>	<i>Korrelationskoeffizient nach Spearman</i>	<i>p-Wert</i>
<i>MIG-Färbung und Kreatinin</i>	0,52	0,01
<i>Unter Berücksichtigung des Geschlechts</i>	0,44	0,04
<i>Unter Berücksichtigung des Alters</i>	0,42	0,06

Tab. 7: Korrelation zwischen Kreatinin und MIG-Färbung

Zur Darstellung dieses Zusammenhangs wurde ein Streudiagramm (s. Abb.2) angefertigt. Hier war ein positiver Zusammenhang zwischen dem Kreatinin-Wert bei Diagnosestellung und der MIG-Färbung zu sehen.

Da in der Korrelationsanalyse ein Einfluss des Alters bei Diagnose auf den Zusammenhang zwischen der MIG-Färbung und dem Kreatinin zu bestehen schien, wurden zur weiteren Überprüfung, ob die Korrelation ein Effekt des Alters war, jeweils ein Streudiagramm für den Zusammenhang zwischen Alter und Kreatinin, bzw. der MIG-Färbung angefertigt, s. Abb. 3. Es fällt ein positiver Zusammenhang zwischen Alter und Kreatinin, bzw. der MIG-Färbung auf, jedoch ist dieser mit einem  $R^2 = 0,02$  gering ausgeprägt. Daraus lässt sich schließen, dass das Alter zwar zu der positiven Korrelation zwischen Kreatinin und MIG-Färbung beiträgt, aber nicht ausschlaggebend dafür verantwortlich ist.

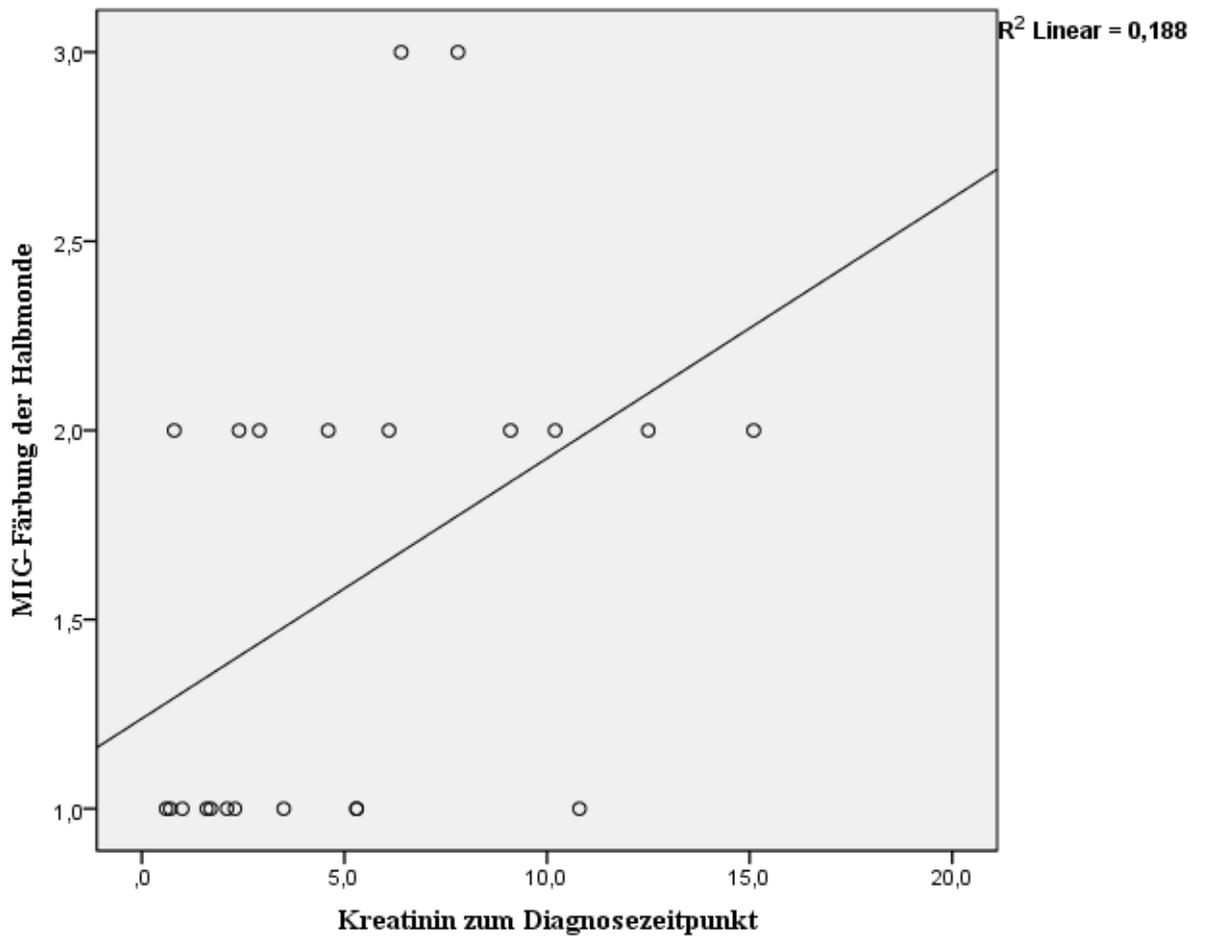


Abb. 2: Zusammenhang zwischen Kreatinin und MIG-Färbung

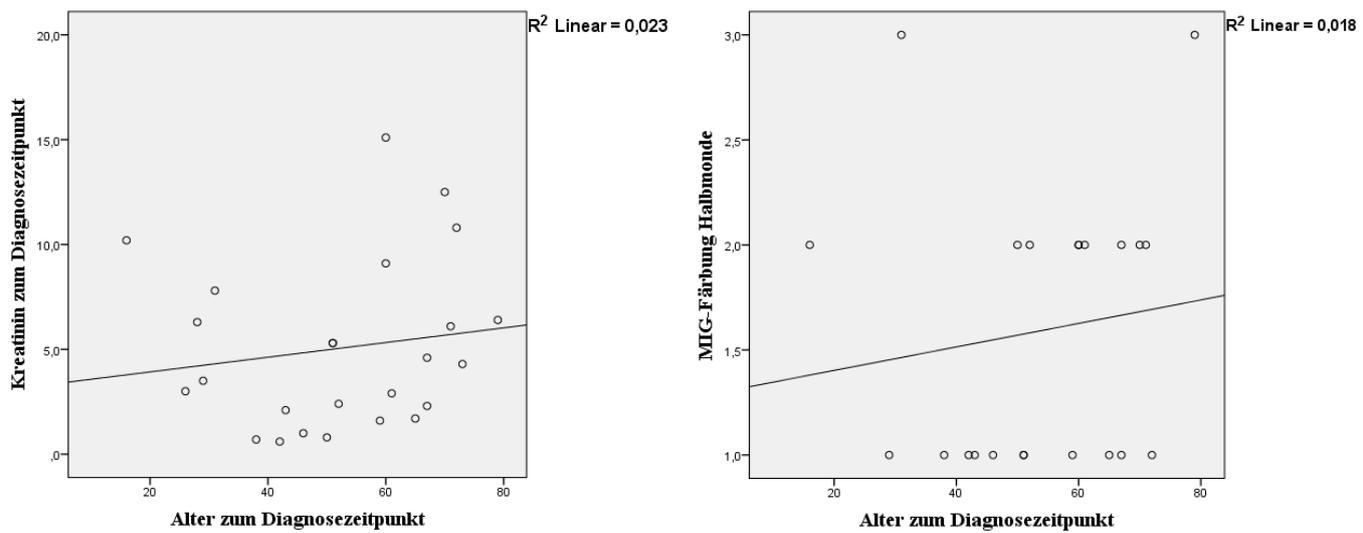


Abb. 3: Korrelation zwischen Alter und Kreatinin, bzw. MIG-Färbung

### 3.2.2 Dialysepflichtigkeit und MIG-Anfärbarkeit

Als Nächstes wurde der Zusammenhang zwischen der Notwendigkeit einer Dialysebehandlung und des Grades der MIG-Färbung betrachtet. Zum Diagnosezeitpunkt waren 7 Patienten dialysepflichtig und 15 nicht dialysepflichtig. Bei den dialysepflichtigen Patienten waren in einem Fall im gefärbten Schnitt keine Halbmonde zu erkennen. Die übrigen sechs Schnitte zeigten eine mittlere Anfärbarkeit von 2,17. Die nicht dialysepflichtigen Patienten wiesen in zwei Fällen keine Halbmonde im gefärbten Schnitt auf, die übrigen 16 Schnitte zeigten eine mittlere Anfärbarkeit von 1,28.

	<i>Dialysepflichtigkeit</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>
<i>Färbung</i>	Ja	6	2,2	0,8
	Nein	16	1,4	0,5

Tab. 8: T-Test zum Vergleich der mittleren Anfärbarkeit nach Dialysepflicht zum Diagnosezeitpunkt

Mit einem p-Wert von 0,09 zeigte sich der Unterschied in der Anfärbarkeit zwischen den Schnitten der dialysepflichtigen und nicht dialysepflichtigen Patienten nicht statistisch signifikant.

### 3.2.3 Halbmondbildung und MIG-Anfärbarkeit

#### **Glomeruli mit Halbmondbildung**

Weiterhin wurde untersucht, ob das Ausmaß der Bildung von Halbmonden in den Glomeruli mit der MIG-Anfärbarkeit korrelierte. Hierfür wurde der prozentuale Anteil der Glomeruli mit Halbmondbildung an allen angeschnittenen Glomeruli im MIG gefärbten Präparat herangezogen.

<i>Färbung</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
<25%	11	0,3	0,3	0,1	1
25-50%	9	0,6	0,3	0,2	1
50-75%	2	0,4	0,1	0,3	0,4
<i>gesamt</i>	22	0,4	0,3	0,1	1

Tab. 9: Zusammenhang zwischen Halbmondbildung und MIG-Anfärbarkeit

Hierbei zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert 0,03) zwischen der Gruppe mit einer Anfärbarkeit <25%, in welcher durchschnittlich 25,36% der angeschnittenen Glomeruli eine Halbmondbildung zeigte, und der Gruppe mit einer Anfärbarkeit von 25-50%, in welcher durchschnittlich 55,67% der angeschnittenen Glomeruli eine Halbmondbildung aufwies.

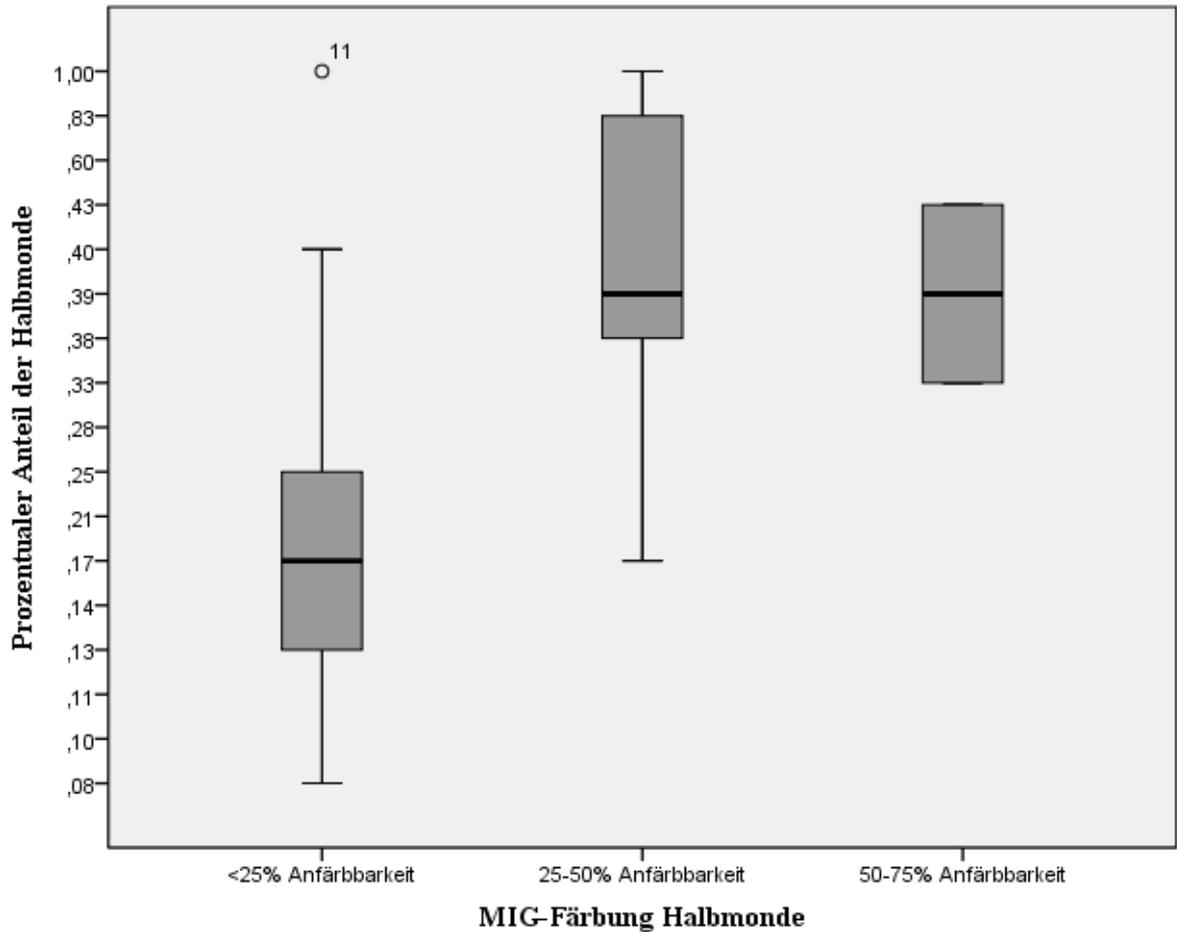


Abb. 4: Zusammenhang zwischen Halbmondbildung und MIG-Anfärbarkeit

### **Glomeruli ohne Halbmondbildung**

Ebenso wurde für die Glomeruli, welche keine Halbmonde ausgebildet hatten verfahren. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen. Eine geringer ausgeprägte Färbung korrelierte demzufolge nicht mit einem höheren Anteil an Glomeruli ohne Halbmondbildung.

<i>Färbung</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
<25%	11	0,8	0,2	0,4	0,9
25-50%	8	0,7	0,3	0,2	1
50-75%	3	0,7	0,1	0,6	0,8
<i>gesamt</i>	22	0,73	0,2	0,2	1

Tab. 10: Zusammenhang zwischen Anteil der Glomeruli ohne Halbmondbildung und deren MIG-Anfärbbarkeit

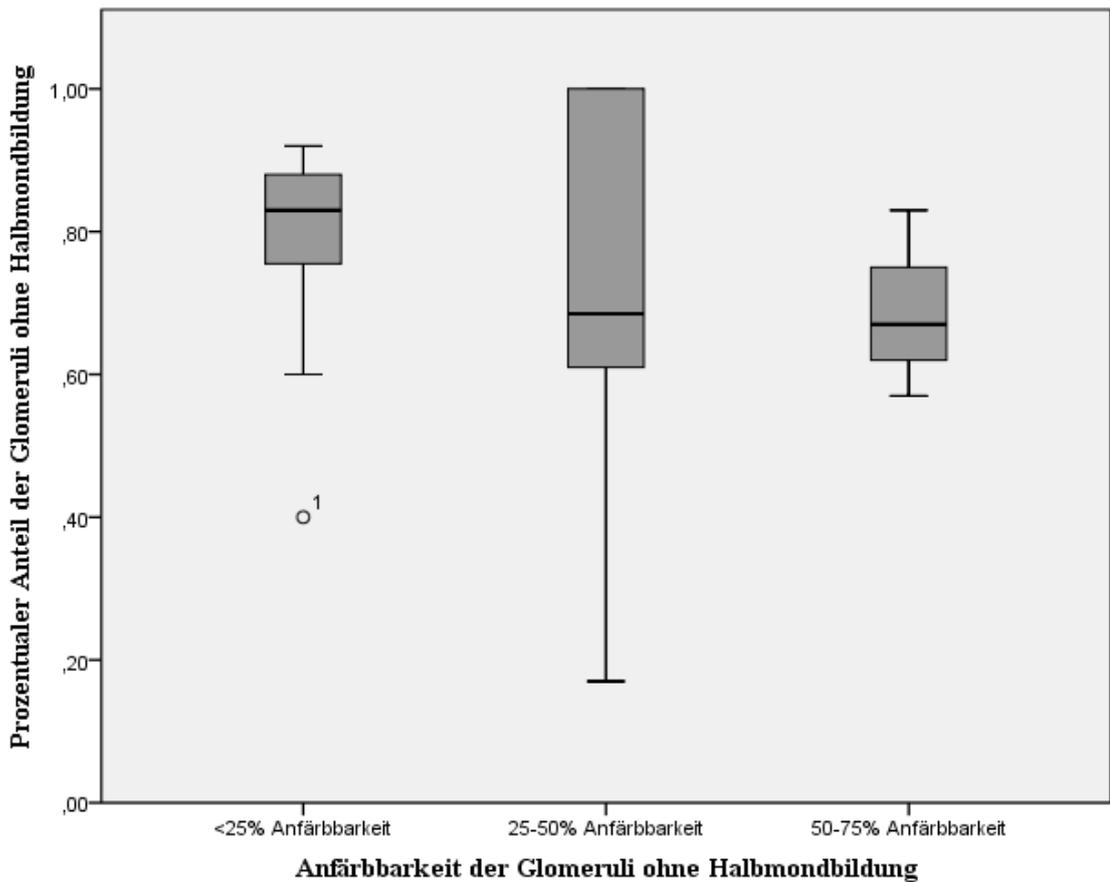


Abb. 5: Zusammenhang zwischen Anteil der Glomeruli ohne Halbmondbildung und deren MIG- Anfärbbarkeit

### 3.3 Alter, Geschlecht und MIG-Anfärbbarkeit

Zwischen dem Alter zum Diagnosezeitpunkt und des Ausmaßes der MIG-Anfärbbarkeit wurde kein signifikanter Zusammenhang gefunden. Zwar wiesen die Patienten mit einer Anfärbbarkeit < 25% tendenziell ein geringeres Durchschnittsalter von 51,2 Jahren auf als diese mit einer Anfärbbarkeit  $\geq$  25%, hier betrug das Durchschnittsalter 56,1 Jahre, jedoch war dieser Unterschied mit einem p-Wert von 0,48 nicht statistisch signifikant.

Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Patienten in der MIG-Färbung gefunden werden.

### 3.4 Einflussfaktoren auf die Mig-Färbung

Zur Überprüfung, inwieweit der Kreatinin-Wert, das Alter, das Geschlecht und die Grunderkrankung einen Einfluss auf die Ausprägung der MIG-Färbung haben, wurde für jede dieser unabhängigen Variablen eine einfache lineare Regressionsanalyse durchgeführt.

	<i>Regressionskoeffizient</i> <i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Signifikanz</i>	<i>R<sup>2</sup></i>
<i>Kreatinin</i>	0,07	0,03	0,04	0,2
<i>Alter</i>	0,01	0,01	0,6	0,02
<i>Geschlecht</i>	-0,02	0,3	0,9	0,0
<i>Grunderkrankung</i>	0,34	0,3	0,3	0,06

Tab. 11: lineare Regressionsanalyse

Hier zeigte sich nur der Kreatinin-Wert signifikant. Das heißt, dass von den hier gewählten unabhängigen Variablen Kreatinin, Alter, Geschlecht und Grunderkrankung nur der Kreatinin-Wert einen Einfluss auf die Ausprägung der MIG-Färbung hat. Statistisch betrachtet steigt pro Anstieg des Kreatinins um 1 mg/dl die Färbung um 0,07. Anhand des korrigierten  $R^2$  sieht man außerdem, dass 20% der Varianz in der MIG-Färbung durch den Kreatinin-Wert erklärt werden kann.

### 3.5 Krankheitsverlauf und MIG-Anfärbbarkeit

Zur Beurteilung des Zusammenhangs zwischen dem Ausmaß der MIG-Färbung und dem Krankheitsverlauf wurden je 90 Tage nach Diagnose der Kreatinin-Wert, sowie die Notwendigkeit einer Dialysebehandlung betrachtet.

#### 3.5.1 Kreatinin nach 90 Tagen und MIG-Färbung

Wie auch schon bei den Werten zum Diagnosezeitpunkt zeigten sich höhere Kreatininwerte bei den Patienten mit einer Anfärbbarkeit von  $\geq 25\%$  im Gegensatz zu denen  $< 25\%$ . Die Werte bei 25-50% und 50-75% unterschieden sich kaum.

<i>Färbung</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
<25%	11	1,7	1,2	0,6	4,8
25-50%	9	3,7	3,2	0,8	9,4
50-75%	2	3,7	1,7	2,5	4,9
<i>Gesamt</i>	22	2,7	2,4	0,6	9,4

Tab. 12: Kreatinin nach MIG-Anfärbbarkeit

Auch hier wurde daher ein T-Test durchgeführt, der in eine Gruppe mit Anfärbbarkeit <25% und  $\geq 25\%$  unterschied.

	<i>MIG-Färbung Halbmonde</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>
<i>Kreatinin nach 90 Tagen</i>	<25%	11	1,7	1,2
	$\geq 25\%$	11	3,7	3,0

Tab. 13: T-Test zum Vergleich des Kreatinins nach MIG-Anfärbbarkeit

Es zeigte sich auch hier mit einem p-Wert von 0,05 knapp nicht statistisch signifikant höhere Werte für Kreatinin in der Gruppe mit stärkerer Anfärbbarkeit.

### 3.5.2 Dialysepflicht nach 90 Tagen und MIG-Färbung

Zusätzlich wurde betrachtet, bei wie vielen Patienten 90 Tage nach Diagnosezeitpunkt eine Dialysepflicht bestand. Dies war bei fünf Patienten der Fall. Von diesen Fünf war in einem gefärbten Biopsat kein Halbmond zu erkennen, die übrigen Vier wiesen eine mittlere Anfärbbarkeit von 1,75 auf. In der nicht-dialysepflichtigen Patientengruppe waren in zwei der Fälle keine Halbmonde sichtbar, die übrigen 18 Schnitte wiesen eine mittlere Anfärbbarkeit von 1,56 auf.

	<i>Dialysepflicht nach 90 Tagen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>
<i>MIG-Färbung Halbmonde</i>	Ja	4	1,8	0,5
	Nein	18	1,6	0,7

Tab. 14: T-Test zum Vergleich der MIG-Anfärbbarkeit nach Dialysepflichtigkeit

Mit einem p-Wert von 0,61 war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

### 3.6 Einflussfaktoren für die Entwicklung einer Dialysepflicht

Um festzustellen, welche Faktoren in der Entwicklung einer Dialysepflichtigkeit eine Rolle spielen, wurde für verschiedene mögliche Einflussfaktoren eine Cox-Regression durchgeführt.

#### 3.6.1 Kreatinin zum Diagnosezeitpunkt

	<i>Signifikanz</i>	<i>Exp(B)</i>	<i>95% Konfidenzintervall für Exp(B)</i>
<i>Kreatinin zum Diagnosezeitpunkt</i>	0,01	1,4	1,1; 1,7

Tab. 15: Cox-Regression Ausgangs-Kreatinin

Es zeigte sich mit einem p-Wert von 0,01 ein signifikanter Einfluss des Ausgangswertes für Kreatinin auf die Entwicklung einer Dialysepflicht.

Zusätzlich wurde ein Cut-off des Kreatininwertes festgelegt und der Test ebenso hierfür durchgeführt. Der Cut-off wurde analog der MEPEX-Studie auf 5,8 mg/dl, bzw. 500 µmol/l festgelegt (Jayne et al. 2007).

	<i>Signifikanz</i>	<i>Exp(B)</i>	<i>95%-Konfidenzintervall für Exp(B)</i>
<i>Kreatinin &gt;5,8mg/dl</i>	0,27	134,1	0,02; 797739,4

Tab. 16: Cox-Regression Kreatinin >5,8mg/dl

Dieses Ergebnis erwies sich nicht als statistisch signifikant.

### 3.6.2 Halbmondbildung

Zur Überprüfung, ob die Anzahl der Halbmonde in der entnommenen Nierenbiopsie einen Einfluss haben könnte, wurde die Cox-Regression mit dem Faktor des prozentualen Anteils der Glomeruli mit Halbmonden an den gesamten angeschnittenen Glomeruli untersucht.

	<i>Signifikanz</i>	<i>Exp(B)</i>	<i>95%-Konfidenzintervall für Exp(B)</i>
<i>Prozentualer Anteil der Glomeruli mit Halbmondbildung</i>	0,14	13,2	0,4; 426,4

Tab. 17: Cox-Regression Halbmondbildung

Auch hier zeigte sich kein signifikantes Ergebnis.

### 3.6.3 MIG-Färbung

	<i>Signifikanz</i>	<i>Exp(B)</i>	<i>95%-Konfidenzintervall für Exp(B)</i>
<i>MIG positive Halbmonde</i>	0,08	1,3	0,9; 1,9

Tab. 18: Cox-Regression MIG-positive Halbmonde

Die MIG-Anfärbbarkeit wurde weiterhin in eine Gruppe mit schwacher (Grad I) und eine Gruppe mit starker (Grad II und III) Anfärbbarkeit eingeteilt.

	<i>Signifikanz</i>	<i>Exp(B)</i>	<i>95%-Konfidenzintervall für Exp(B)</i>
<i>MIG-Färbung <math>\geq</math> 50%</i>	0,6	1,8	0,2; 19,9

Tab. 19: Cox-Regression Grad der MIG-Färbung

### 3.7 Einflussfaktoren auf das Outcome der Nierenfunktion

Ebenso wie für die Entwicklung einer Dialysepflicht wurden Faktoren überprüft, welche für das Outcome der Nierenfunktion eine Rolle spielen könnten. Die Nierenfunktion wurde anhand des Kreatinin-Wertes nach 90 Tagen beurteilt. Es wurden zwei Gruppen gebildet, eine Gruppe mit guter Erholung der Nierenfunktion nach 90 Tagen und eine Gruppe, welche nach 90 Tagen eine schlechte Nierenfunktion aufwies. Der Cut-off wurde auf einen Kreatinin-Wert von 2,0 mg/dl festgelegt. Die Patienten, welche zum Zeitpunkt der Bestimmung des zweiten Kreatinin-Wertes eine Dialyse erhielten, wurden in der Analyse nicht berücksichtigt.

#### 3.7.1 Kreatinin zum Diagnosezeitpunkt

	<i>Signifikanz</i>	<i>Exp(B)</i>	<i>95%-Konfidenzintervall für Exp(B)</i>
<i>Kreatinin zum Diagnosezeitpunkt</i>	0,2	1,2	0,9; 1,5

Tab. 20: Cox-Regression: Kreatinin zum Diagnosezeitpunkt

#### 3.7.2 Halbmondbildung

Ebenso wie oben auch wurde für die Analyse der prozentuale Anteil der Glomeruli mit Halbmondbildung an allen angeschnittenen Glomeruli herangezogen.

	<i>Signifikanz</i>	<i>Exp(B)</i>	<i>95%-Konfidenzintervall für Exp(B)</i>
<i>Prozentualer Anteil der Glomeruli mit Halbmondbildung</i>	0,8	1,5	0,1; 17,1

Tab. 21: Cox-Regression: Halbmondbildung

### 3.7.3 MIG-Färbung

	<i>Signifikanz</i>	<i>Exp(B)</i>	<i>95%-Konfidenzintervall für Exp(B)</i>
<i>MIG-positive Halbmonde</i>	1,0	1,0	0,7; 1,5

Tab. 22: Cox-Regression MIG-positive Halbmonde

Die MIG-Anfärbbarkeit wurde wieder in eine Gruppe mit schwacher (Grad I) und eine Gruppe mit starker (Grad II und III) Anfärbbarkeit eingeteilt und hierfür die Cox-Regression bestimmt.

	<i>Signifikanz</i>	<i>Exp(B)</i>	<i>95%-Konfidenzintervall für Exp(B)</i>
<i>MIG Färbung <math>\geq</math> 50%</i>	0,3	2,5	0,5; 12,9

Tab. 23: Cox-Regression Grad der MIG-Färbung

Es erwiesen sich alle untersuchten Faktoren als nicht statistisch signifikant für die Entwicklung einer schlechten Nierenfunktion nach 90 Tagen.

## 4 Diskussion

Das morphologische Korrelat der rapid progressiven Glomerulonephritis ist die Ausbildung von glomerulären Halbmonden. Zahlreiche Studien konnten belegen, dass der Halbmondbildung eine Th1-vermittelte Reaktion zugrunde liegt und IFN- $\gamma$  hierbei maßgeblich beteiligt ist (Huang et al. 1994; Holdsworth et al. 1999; Kitching et al. 1999). Für das Chemokin Mig, dessen Produktion IFN- $\gamma$ -abhängig über den Jak/Stat1-Signalweg induziert wird, konnte gezeigt werden, dass es in den Glomeruli von Patienten mit Halbmondbildung vorhanden war (Tang et al. 1995; Segerer und Alpers 2003), von glomerulären Zellen produziert werden konnte und vermutlich an der Ausbildung der Halbmonde direkt beteiligt war (Romagnani et al. 2002).

Über den Zusammenhang dieser beiden Signalwege in der Entwicklung des realen Schadens in der rapid progressiven Glomerulonephritis ist bisher wenig bekannt. Diese Arbeit untersucht anhand des Expressionsmusters des Chemokins Mig in Nierenbiopsien erkrankter Patienten, inwieweit dieses mit der Krankheitsaktivität korreliert und ob daraus Rückschlüsse auf die Beteiligung des Jak/Stat1-Signalwegs gezogen werden können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Mig in Glomeruli von Patienten mit rapid progressiver Glomerulonephritis unterschiedlicher Ätiologie vorhanden war. Zum Vergleich wurden nach dem gleichen Färbeprotokoll angefärbte Biopsien von nierengesunden Patienten betrachtet. Hier zeigte sich keine Anfärbbarkeit. Diese Ergebnisse stehen in Einklang zu Studien, welche eine erhöhte Expression von Mig in Glomeruli von Patienten mit proliferativer Glomerulonephritis (Romagnani et al. 2002) und experimentell ausgelöster Glomerulonephritis im Tiermodell (Tang et al. 1995; Segerer und Alpers 2003) zeigten. Der Grad der Färbung wurde semiquantitativ eingeteilt und mit klinischen, laborchemischen und histologischen Parametern korreliert. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Färbung und der Krankheitsaktivität zum Diagnosezeitpunkt, sowie teilweise zum Krankheitsverlauf. Ein zwar nicht statistisch signifikanter, aber erwähnenswerter Zusammenhang zeigte sich für die Zahl Mig-positiver Halbmonde als Faktor für die Entwicklung einer Dialysepflicht nach 90 Tagen.

### ***Zusammenhang zwischen Mig-Färbung und Krankheitsaktivität zum Diagnosezeitpunkt***

Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen der immunhistochemischen MIG-Färbung und dem Schweregrad der Erkrankung zum Diagnosezeitpunkt betrachtet. Als Faktoren zur Einschätzung des Schweregrades wurden der Ausgangswert für Kreatinin, die Notwendigkeit einer Dialysebehandlung, sowie die Anzahl der Glomeruli mit Halbmondbildung in der jeweiligen entnommenen Biopsie herangezogen. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied für den Kreatinin-Wert in den Gruppen mit einer MIG-Anfärbbarkeit  $< 25\%$  und  $\geq 25\%$ . Ein hoher Ausgangswert von Kreatinin korrelierte mit einer stärkeren MIG-Anfärbbarkeit. Dieser Zusammenhang bestand unabhängig von Alter und Geschlecht. Er konnte in der linearen Regressionsanalyse ebenfalls bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass der Kreatinin-Wert ein Einflussfaktor auf die Ausprägung der Mig-Färbung zu sein schien.

Zwischen den Patienten mit und ohne initiale Dialysepflicht zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied (p-Wert=0,09), aber ein Trend in die Richtung, dass eine initiale Dialysepflicht mit einer stärkeren MIG-Färbung einherging, war durchaus beobachtbar. Hierbei ist zu beachten, dass zum Diagnosezeitpunkt nur sieben Patienten dialysepflichtig waren und von diesen einer im gefärbten Schnitt keine Halbmonde aufwies und somit nicht in die Auswertung miteinbezogen wurde. Daher wäre es nötig, die Analyse mit einem größeren Patientenkollektiv zu wiederholen, um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten. Betrachtet man die Halbmondbildung der Glomeruli, so zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Biopsaten mit einer MIG-Anfärbbarkeit  $< 25\%$  und  $\geq 25\%$ . Patienten, welche viele Halbmonde aufwiesen, zeigten demnach eine stärkere Färbung.

Die Expression von Mig zeigte sich also zusammenfassend umso ausgeprägter, je höher die Krankheitsaktivität war. Dies spricht für einen Zusammenhang zwischen der Produktion von Mig und der Krankheitsaktivität. Die Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse von Romagnani et. al, welche eine verstärkte Expression des CXCR3-Rezeptors, über welchen Mig seine Wirkung entfaltet auf Mesangialzellen von Patienten mit proliferativer Glomerulonephritis zeigten (Romagnani et al. 1999). Hier trägt Mig zur inflammatorischen Reaktion bei, indem es T-Zellen, insbesondere des Subtyps Th1 zum Ort der Entzündung lockt ( Xie et al. 2003; Campanella et al. 2006). Es wurde weiterhin gezeigt, dass Mig nicht nur als Lockstoff für T-Zellen zum Ort der Entzündung dient, sondern auch eine Proliferation von Mesangialzellen in vitro auslösen kann (Romagnani et al. 2002; Wörnle et al. 2004).

### ***Mig Färbung und Krankheitsverlauf***

Als nächstes wurde der Schweregrad der Erkrankung 90 Tage nach Diagnose betrachtet und dieser in Zusammenhang mit der Ausprägung der MIG-Färbung zum Diagnosezeitpunkt gesetzt. Als Parameter für den Schweregrad wurden wie oben der Kreatinin-Wert und die Notwendigkeit einer Dialysebehandlung je 90 Tage nach Diagnose herangezogen. Hierbei zeigte sich ein an der Grenze des Signifikanzniveaus liegender (p-Wert 0,05) Zusammenhang zwischen einem hohen Kreatinin und einer starken MIG-Färbung. Kein signifikanter Zusammenhang war zwischen Dialysepflicht und starker Anfärbbarkeit zu erkennen. Hierzu sollte man jedoch beachten, dass nur fünf Patienten nach 90 Tagen dialysepflichtig waren, von welchen einer keine Halbmonde im untersuchten Präparat aufwies und daher nicht in die Analyse miteinbezogen wurde. Hier bräuchte man ein größeres Patientenkollektiv, um aussagekräftigere Werte erheben zu können.

Zuletzt wurde der Einfluss mehrerer Faktoren auf das Eintreten einer Dialysepflicht, und einer schlechten Nierenfunktion nach 90 Tagen untersucht.

#### ***Dialysepflicht***

Es zeigte sich, dass ein hoher initialer Wert des Serum-Kreatinins ein statistisch signifikanter Einflussfaktor auf die Entwicklung einer Dialysepflicht war. Ein nahe an der Signifikanzgrenze liegendes Ergebnis (p-Wert=0,08) konnte bei der Anzahl der MIG-positiven Halbmonde als Einflussfaktor beobachtet werden. Keinen Einfluss auf die Entwicklung einer Dialysepflicht zeigten laut der statistischen Auswertung die Anzahl der Halbmonde im untersuchten Präparat, sowie die Stärke der Mig-Färbung. Auch hier muss wieder beachtet werden, dass nur fünf Patienten nach 90 Tagen dialysepflichtig waren. Daher kann man die Ergebnisse zwar als Anhaltspunkt nehmen, in welche Richtung der Trend gehen könnte, jedoch müsste man die Analyse mit einem größeren Patientenkollektiv wiederholen, um dies zu bestätigen.

#### ***Kreatinin***

Hier wurden ebenso der Wert für Kreatinin zum Diagnosezeitpunkt, die Anzahl der Halbmonde im Präparat, die Anzahl der Mig-positiven Halbmonde, sowie der Grad der Anfärbbarkeit als Einflussfaktoren auf die Entwicklung einer schlechten Nierenfunktion mit Kreatinin  $\geq 2$  mg/dl untersucht. Diese Faktoren erwiesen sich allesamt als nicht signifikant.

### ***Schlussfolgerungen***

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass Mig zumindest teilweise an der Pathogenese der glomerulären Schädigung bei der rapid progressiven Glomerulonephritis beteiligt ist und ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von Mig in den Glomeruli und der Krankheitsaktivität besteht.

Da die Produktion von Mig über die Aktivierung des Jak/Stat1-Signalweges erfolgt, lässt sich aus der Expression von Mig eine Beteiligung dieses Signalweges schließen.

Dies steht in Einklang zu Ergebnissen anderer Studien, welche zeigten, dass die glomerulären Schäden auf einer Entzündungsreaktion beruhen, bei welcher vor allem T-Zellen des Typs Th1 beteiligt sind. Diese Zellen produzieren das Zytokin IFN- $\gamma$ , welchem ebenso eine zentrale Rolle in der Pathogenese zukommt (Huang et al. 1997; Kitching et al. 1999). IFN- $\gamma$  wiederum entfaltet seine Wirkungen über den Jak/Stat1-Signalweg und könnte im Fall der rapid progressiven Glomerulonephritis eine vermehrte Produktion von Mig und weiteren Zytokinen auslösen. Möglicherweise kommt es hierdurch zu einem Kreislauf, welcher die Entzündungsreaktion aufrechterhält und verstärkt: die Th1-Zellen produzieren IFN- $\gamma$ , welches den Jak/Stat1-Weg aktiviert. Dieser führt zu einer Produktion von Mig, welches wiederum Th1-Zellen anlockt.

Li et al kamen im Tiermodell zu dem Ergebnis, dass der Jak/Stat-Signalweg an der Genese der renalen Schädigung bei durch Adriamycin experimentell ausgelösten Nephropathie beteiligt ist und dessen Hemmung durch einen gegen die Januskinase 2 gerichteten Antikörper eine Besserung der Nierenfunktion, sowie eine geringere histologisch sichtbare Schädigung zur Folge hatte (Li et al. 2007). Dies bestätigt die Beteiligung dieses Signalweges an der Entstehung renaler Schädigungen.

Zwar müssten weitere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv und mit neuen experimentellen Herangehensweisen durchgeführt werden, um die Hypothese, dass dem Jak/Stat1-Signalweg über die Expression von Mig eine Rolle in der Pathogenese des glomerulären Schadens bei der rapid progressiven Glomerulonephritis zukommt zu belegen, doch deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass dies der Fall sein könnte.

## 5 Zusammenfassung

Die rapid progressive Glomerulonephritis ist eine seltene, aber unbehandelt rasch zum Funktionsverlust der Nieren führende Erkrankung unterschiedlicher Ätiologie. Eine schnellstmögliche Diagnosestellung mittels Biopsie ist essentiell. In der Biopsie erkennt man die Bildung von sogenannten glomerulären Halbmonden, welche das histologische Korrelat der Nekrosen der glomerulären Kapillarschlingen darstellen.

Der Entstehung der glomerulären Halbmonde liegt laut mehreren Studien eine Th1 vermittelte Reaktion ähnlich einer Überempfindlichkeitsreaktion von Spättyp, zugrunde und Interferon- $\gamma$  ist hierbei maßgeblich beteiligt. Andere Studien, welche sich auf die Rolle der Chemokine an der Halbmondentstehung konzentrierten, konnten zeigen, dass das Chemokin Monokine induced by Interferon- $\gamma$  (Mig) und sein Rezeptor CXCR3 bei Patienten mit Halbmonden in der untersuchten Biopsie vermehrt exprimiert waren. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob der Jak/Stat1-Signalweg, über welchen Interferon- $\gamma$  seine Wirkungen entfaltet und die Produktion von Mig gesteuert wird, an der Entstehung der Halbmonde beteiligt ist. Es wurden 25 Biopsien von Patienten mit rapid progressiver Glomerulonephritis mit einem Mig-Antikörper angefärbt und die Mig-Expression mit klinischen, laborchemischen und histologischen Parametern korreliert. Hier zeigte sich, dass alle Biopsien der erkrankten Patienten Mig-positive Glomeruli aufwiesen, zum Vergleich untersuchte Biopsien nierengesunder Patienten jedoch nicht. Die Färbung von Mig zeigte eine positive Korrelation mit dem initialen Wert für Kreatinin, der Notwendigkeit einer Dialysebehandlung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, sowie der Anzahl der glomerulären Halbmonde in der Biopsie. Eine starke Mig-Färbung ging also mit einer hohen initialen Krankheitsaktivität einher. Des Weiteren war eine Korrelation mit dem Kreatinin-Wert 90 Tage nach Diagnose zu sehen.

Da die Produktion von Mig über den Jak/Stat1-Signalweg induziert wird, lässt sich aus den hier gewonnenen Ergebnissen auf eine Beteiligung dieses Weges an der Entstehung der glomerulären Halbmondbildung schließen.

## Literaturverzeichnis

- Amann, Kerstin; Haas, Christian S. (2006): What you should know about the work-up of a renal biopsy. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 21 (5), S. 1157–1161. DOI: 10.1093/ndt/gfk037.
- Atkins, R. C.; Nikolic-Paterson, D. J.; Song, Q.; Lan, H. Y. (1996): Modulators of crescentic glomerulonephritis. In: *JASN* 7 (11), S. 2271–2278. Online verfügbar unter <http://jasn.asnjournals.org/content/7/11/2271.full.pdf>.
- Borza, Dorin-Bogdan (2007): Autoepitopes and alloepitopes of type IV collagen: role in the molecular pathogenesis of anti-GBM antibody glomerulonephritis. In: *Nephron. Experimental nephrology* 106 (2), S. e37-43. DOI: 10.1159/000101791.
- Campanella, G. S. V.; Grimm, J.; Manice, L. A.; Colvin, R. A.; Medoff, B. D.; Wojtkiewicz, G. R. et al. (2006): Oligomerization of CXCL10 Is Necessary for Endothelial Cell Presentation and In Vivo Activity. In: *The Journal of Immunology* 177 (10), S. 6991–6998. DOI: 10.4049/jimmunol.177.10.6991.
- Campanella, Gabriele S. V.; Medoff, Benjamin D.; Manice, Lindsay A.; Colvin, Richard A.; Luster, Andrew D. (2008): Development of a novel chemokine-mediated in vivo T cell recruitment assay. In: *Journal of immunological methods* 331 (1-2), S. 127–139. DOI: 10.1016/j.jim.2007.12.002.
- Charles R. Mackay (1996): Chemokine receptors and T cell chemotaxis. In: *The Journal of experimental medicine* 184 (3), S. 799. Online verfügbar unter </pmc/articles/PMC2192795/pdf/je1843799.pdf>.
- Couser, W. G. (1998): Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 13 Suppl 1, S. 10–15.
- Dabbs, D. J. (2013): Diagnostic Immunohistochemistry: Elsevier Health Sciences. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=KZazAQAAQBAJ>.
- Darnell, J. E.; Kerr, I. M.; Stark, G. R. (1994): Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. In: *Science (New York, N.Y.)* 264 (5164), S. 1415–1421.
- Faaber, P.; Rijke, T. P.; van de Putte, L B; Capel, P. J.; Berden, J. H. (1986): Cross-reactivity of human and murine anti-DNA antibodies with heparan sulfate. The major glycosaminoglycan in glomerular basement membranes. In: *The Journal of clinical investigation* 77 (6), S. 1824–1830. DOI: 10.1172/JCI112508.
- Farber, Joshua M. (1990): A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (14), S. 5238–5242.
- Gómez-Chiarri, M.; Hamilton, T. A.; Egido, J.; Emancipator, S. N. (1993): Expression of IP-10, a lipopolysaccharide- and interferon-gamma-inducible protein, in murine mesangial cells in culture. In: *The American journal of pathology* 142 (2), S. 433–439.

- Grandaliano, G.; Gesualdo, L.; Ranieri, E.; Monno, R.; Schena, F. P. (2000): Tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin receptor expression in human crescentic glomerulonephritis. In: *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 35 (4), S. 726–738.
- Gross, W. L.; Schmitt, W. H.; Csernok, E. (1993): ANCA and associated diseases: immunodiagnostic and pathogenetic aspects. In: *Clinical and experimental immunology* 91 (1), S. 1–12.
- Guesdon, J. L.; Ternynck, T.; Avrameas, S. (1979): The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. In: *J Histochem Cytochem* 27 (8), S. 1131–1139. DOI: 10.1177/27.8.90074.
- Haas, C.; Ryffel, B.; Le Hir, M. (1997): IFN-gamma is essential for the development of autoimmune glomerulonephritis in MRL/lpr mice. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158 (11), S. 5484–5491.
- Haas, Cordula; Ryffel, Bernhard; Le Hir, Michel (1998): IFN- $\gamma$  Receptor Deletion Prevents Autoantibody Production and Glomerulonephritis in Lupus-Prone (NZB  $\times$  NZW)F1 Mice. In: *J Immunol* 160 (8), S. 3713–3718. Online verfügbar unter <http://www.jimmunol.org.eaccess.ub.tum.de/content/160/8/3713.full>.
- Halpern, B.; Milliez, P.; Lagrue, G.; Fray, A.; Morard, J. C. (1965): Protective Action of Heparin in Experimental Immune Nephritis 205 (4968), S. 257–259. DOI: 10.1038/205257a0.
- Herold, Gerd (2013): Innere Medizin 2013. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Selbstverl.
- Holdsworth, S. R.; Kitching, A. R.; Tipping, P. G. (1999): Th1 and Th2 T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis. In: *Kidney international* 55 (4), S. 1198–1216. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1999.00369.x.
- Huang, Xiao Ru; Holdsworth, Stephen R.; Tipping, Peter G. (1994): Evidence for delayed-type hypersensitivity mechanisms in glomerular crescent formation. In: *Kidney international* 46 (1), S. 69–78. DOI: 10.1038/ki.1994.245.
- Huang, Xiao-Ru; Tipping, Peter G.; Shuo, Li; Holdsworth, Stephen R. (1997): Th1 responsiveness to nephritogenic antigens determines susceptibility to crescentic glomerulonephritis in mice. In: *Kidney international* 51 (1), S. 94–103. DOI: 10.1038/ki.1997.12.
- Izui, S.; Lambert, P. H.; Miescher, P. A. (1976): In vitro demonstration of a particular affinity of glomerular basement membrane and collagen for DNA. A possible basis for a local formation of DNA-anti-DNA complexes in systemic lupus erythematosus. In: *The Journal of experimental medicine* 144 (2), S. 428–443.
- Jayne, David R.W.; Gaskin, Gill; Rasmussen, Niels; Abramowicz, Daniel; Ferrario, Franco; Guillevin, Loic et al. (2007): Randomized Trial of Plasma Exchange or High-Dosage Methylprednisolone as Adjunctive Therapy for Severe Renal Vasculitis. In: *JASN* 18 (7), S. 2180–2188. DOI: 10.1681/ASN.2007010090.
- Jennette, J. Charles (2003): Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. In: *Kidney international* 63 (3), S. 1164–1177. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00843.x.
- Kitching, A. R.; Holdsworth, S. R.; Tipping, P. G. (1999): IFN-gamma mediates crescent formation and cell-mediated immune injury in murine glomerulonephritis. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10 (4), S. 752–759.

- Koch, Karl-Martin; Anton, Peter (Hg.) (2000): *Klinische Nephrologie*. München [u.a.]: Urban & Fischer.
- Lerner, R. A.; Glassock, R. J.; Dixon, F. J. (1967): The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. In: *The Journal of experimental medicine* 126 (6), S. 989–1004.
- Li, Rong; Yang, Niansheng; Zhang, Lili; Huang, Yuefang; Zhang, Rui; Wang, Fang et al. (2007): Inhibition of JAK/STAT Signaling Ameliorates Mice Experimental Nephrotic Syndrome. In: *Am J Nephrol* 27 (6), S. 580–589. DOI: 10.1159/000108102.
- Mosmann, T. R.; Coffman, R. L. (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. In: *Annual review of immunology* 7, S. 145–173. DOI: 10.1146/annurev.iy.07.040189.001045.
- Naish, P.; Penn, G. B.; Evans, D. J.; Peters, D. K. (1972): The Effect of Defibrination on Nephrotoxic Serum Nephritis in Rabbits. In: *Clinical Science* 42 (5), S. 643–646. DOI: 10.1042/cs0420643.
- Otani, T.; Nakamura, S.; Toki, M.; Motoda, R.; Kurimoto, M.; Orita, K. (1999): Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice. In: *Cellular immunology* 198 (2), S. 111–119. DOI: 10.1006/cimm.1999.1589.
- Ozmen, Laurence; Roman, Danièle; Fountoulakis, Michael; Schmid, Georges; Ryffel, Bernhard; Garotta, Gianni (1995): Experimental therapy of systemic lupus erythematosus: the treatment of NZB/W mice with mouse soluble interferon- $\gamma$  receptor inhibits the onset of glomerulonephritis. In: *European Journal of Immunology* 25 (1), S. 6–12. DOI: 10.1002/eji.1830250103.
- RICH, A. R. (1956): The pathology and pathogenesis of experimental anaphylactic glomerulonephritis in relation to human acute glomerulonephritis. In: *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 98 (2), S. 120–151.
- Romagnani, Paola; Beltrame, Chiara; Annunziato, Francesco; Lasagni, Laura; Luconi, Michaela; Galli, Grazia et al. (1999): Role for Interactions Between IP-10/Mig and CXCR3 in Proliferative Glomerulonephritis. In: *JASN* 10 (12), S. 2518–2526. Online verfügbar unter <http://jasn.asnjournals.org/content/10/12/2518.full>.
- Romagnani, Paola; Lazzeri, Elena; Lasagni, Laura; Mavilia, Carmelo; Beltrame, Chiara; Francalanci, Michela et al. (2002): IP-10 and Mig Production by Glomerular Cells in Human Proliferative Glomerulonephritis and Regulation by Nitric Oxide. In: *JASN* 13 (1), S. 53–64. Online verfügbar unter <http://jasn.asnjournals.org/content/13/1/53.full>.
- Romagnani, Sergio (1995): Biology of human TH1 and TH2 cells. In: *J Clin Immunol* 15 (3), S. 121–129. DOI: 10.1007/BF01543103.
- Schroder, Kate; Hertzog, Paul J.; Ravasi, Timothy; Hume, David A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. In: *Journal of leukocyte biology* 75 (2), S. 163–189. DOI: 10.1189/jlb.0603252.
- Schwarting, Andreas; Wada, Takashi; Kinoshita, Koji; Tesch, Gregory; Kelley, Vicki Rubin (1998): IFN- $\gamma$  Receptor Signaling Is Essential for the Initiation, Acceleration, and Destruction of Autoimmune Kidney Disease in MRL-Fas<sup>lpr</sup> Mice. In: *J Immunol* 161 (1), S. 494–503. Online verfügbar unter <http://www.jimmunol.org.eaccess.ub.tum.de/content/161/1/494.full>.
- Segerer, Stephan; Alpers, Charles E. (2003): Chemokines and chemokine receptors in renal pathology. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 12 (3), S. 243–249. DOI: 10.1097/01.mnh.0000069858.94246.01.

- Sgadari, Cecilia; Farber, Joshua M.; Angiolillo, Anne L.; Liao, Fang; Teruya-Feldstein, Julie; Burd, Parris R. et al. (1997): Mig, the Monokine Induced By Interferon- $\gamma$ , Promotes Tumor Necrosis In Vivo. In: *Blood* 89 (8), S. 2635–2643. Online verfügbar unter <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/89/8/2635.full.pdf>.
- Tang, W. W.; Yin, S.; Wittwer, A. J.; Qi, M. (1995): Chemokine gene expression in anti-glomerular basement membrane antibody glomerulonephritis. In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 269 (3), S. F323-F330.
- Timoshanko, J. R.; Holdsworth, S. R.; Kitching, A. R.; Tipping, P. G. (2002): IFN- Production by Intrinsic Renal Cells and Bone Marrow-Derived Cells Is Required for Full Expression of Crescentic Glomerulonephritis in Mice. In: *The Journal of Immunology* 168 (8), S. 4135–4141. DOI: 10.4049/jimmunol.168.8.4135.
- Vassalli, P.; McCluskey, R. T. (1964): THE PATHOGENIC ROLE OF FIBRIN DEPOSITION IN IMMUNOLOGICALLY INDUCED GLOMERULONEPHRITIS. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 116. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1964.tb52567.x.
- Wei, Y. P.; Kita, M.; Shinmura, K.; Yan, X. Q.; Fukuyama, R.; Fushiki, S.; Imanishi, J. (2000): Expression of IFN-gamma in cerebrovascular endothelial cells from aged mice. In: *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 20 (4), S. 403–409. DOI: 10.1089/107999000312342.
- Wörnle, Markus; Schmid, Holger; Merkle, Monika; Banas, Bernhard (2004): Effects of chemokines on proliferation and apoptosis of human mesangial cells. In: *BMC Nephrol* 5 (1), S. 8. DOI: 10.1186/1471-2369-5-8.
- Xie, J. H. (2003): Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. In: *Journal of leukocyte biology* 73 (6), S. 771–780. DOI: 10.1189/jlb.1102573.
- Xie, Jenny H.; Nomura, Naomi; Lu, Min; Chen, Shiow-Ling; Koch, Greg E.; Weng, Youmin et al. (2003): Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. In: *J Leukoc Biol* 73 (6), S. 771–780. DOI: 10.1189/jlb.1102573.