

Institut für Immunologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)

Charakterisierung der T-Zellantwort in der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis der Maus

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
an der Universität Hamburg im Fachbereich Chemie

von

Julia Holzer

Hamburg, 2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig

2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

Tag der Disputation: 05.10.2012

Zusammenfassung

Die anti-glomeruläre-Basalmembran-Glomerulonephritis (anti-GBM-GN) ist eine seltene Autoimmunerkrankung der Niere. In vielen anti-GBM-GN-Patienten zeigt sich zusätzlich eine Lungenbeteiligung, welche sich durch Lungenblutungen äußert. Wenn beide Organe betroffen sind, wird die Krankheit als Goodpasture-Syndrom bezeichnet. Unbehandelt endet die anti-GBM-GN fast immer mit dem Tod des Patienten. Der Pathomechanismus der anti-GBM-GN beruht auf der Bildung von Autoantikörpern und zusätzlich wird eine Beteiligung von T-Zellen vermutet. Die Autoimmunität richtet sich dabei gegen die Nicht-Kollagen-Domäne 1 (NC1) der $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -Kette des Typ IV Kollagens ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ und $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$). Autoantikörper binden an $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ und $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ in der Basalmembran in Niere und Lunge. In der Niere bilden sich dann typische, halbmondförmige, mononukleäre Infiltrate, die mit einer schweren Schädigung der Glomeruli und einer progressiven Niereninsuffizienz einhergehen. Demgegenüber ist die Bedeutung der T-Zellen für die Schädigung der Niere bislang unklar.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Mausmodells für die anti-GBM-GN. In diesem Modell, der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis (EAG), sollten dann verschiedene Aspekte der Pathogenese und der Immunantwort untersucht werden. Wesentliche Punkte waren die generelle Funktion der CD4^+ T-Zellen sowie die Rolle der Th17-Zellen und der regulatorischen T-Zellen. Außerdem sollte untersucht werden, ob autoreaktive T-Zellen in der Maus vorhanden sind. Die zentrale Hypothese war, dass CD4^+ T-Zellen den Verlauf der Erkrankung und den damit verbundenen Nierenschaden beeinflussen.

In unserem EAG-Modell wurden DBA/1J-Mäuse mit rekombinantem Human- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ einmal in komplettem und dreimal in inkomplettem Freundschens Adjuvans immunisiert. Die Mäuse entwickelten als Folge eine schwere Proteinurie und ab Woche 8 eine GN mit letalem Funktionsverlust der Niere. Nach 2 Wochen waren $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische Antikörper und nach 3 - 5 Wochen IgG-Ablagerungen entlang der GBM nachweisbar. In diesem Stadium zeigten die Nieren noch keine entzündlichen Veränderungen und nur eine marginale Infiltration von Leukozyten. Erst im späten Stadium entwickelten die Tiere glomeruläre Halbmonde in der Bowman-Kapsel, erhebliche Schäden der Tubuli und eine massive Infiltration von Makrophagen. Die Infiltration von T-Zellen war weniger stark ausgeprägt und hauptsächlich im Interstitium zu beobachten. Diese T-Zellen zeigten einen aktivierten Phänotyp und enthielten einen erheblichen Anteil an Th1- und Th17-Zellen.

Um die generelle Funktion der T-Zellen und deren Subpopulationen zu klären, wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Die Depletion von CD4^+ T-Zellen in der späten Phase der EAG durch einen anti- CD4 -Antikörper führte zu keiner Minderung der Nierenschädigung im Vergleich zu den Kontrolltieren. Eine Neutralisierung von IL-17A über den gesamten Versuchszeitraum der EAG zeigte ebenfalls keinen veränderten Verlauf in der Nierenentzündung. Dieses Ergebnis wurde durch eine Analyse von IL-17A ko-Mäusen bestätigt. In denen wurde auch kein Unterschied im Nierenschaden beobachtet. Die Depletion von regulatorischen T-Zellen in der späten Phase der EAG hatte auch keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf.

Im letzten Teil der Arbeit wurde versucht $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische T-Zellen nachzuweisen. Nach Immunisierung konnten diese Zellen in der Milz mittels ELISpot identifiziert werden. Die Immunisierung mit einem immundominanten Peptid aus $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (P71) führte zur Induktion von P71- aber auch von $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen T-Zellen. In beiden Ansätzen waren die Frequenzen der autoreaktiven T-Zellen in der Milz sehr niedrig.

Zusammenfassend konnten wir das EAG-Modell etablieren und hochaktivierte T-Zellen in der Niere und $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische T-Zellen in der Milz nachweisen. Um die Funktion der T-Zellen in der anti-GBM-GN zu klären, sind weitere Studien notwendig.

Abstract

Anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis (GN) is a rare autoimmune kidney disease. This GN is often accompanied by lung haemorrhage and then commonly referred to as Goodpasture's syndrome. Untreated, anti-GBM-GN is usually fatal for the patient. The formation of autoantibodies is considered to be the central pathomechanism of anti-GBM-GN. However, there is also evidence for the participation of T cells. Autoimmunity is directed against the noncollagen domain 1 (NC1) of the $\alpha 3$ and $\alpha 5$ chain from type IV collagen ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ and $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$). Autoantibodies bind to the $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ and $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ within the basement membrane in kidney and lung. In the kidney, this is followed by massive immune cell infiltration and glomerular crescent formation, indicating a severe and rapidly progressing injury. The function of T cells for renal damage is so far unclear.

The major aim of this work was the establishment of a mouse model for anti-GBM-GN. In this model, the experimental autoimmune glomerulonephritis (EAG), different aspects of the pathogenesis of the disease and the immune response within the kidney should be examined. Central topics of research were the general function of the CD4^+ T cells as well as the role of Th17 cells and regulatory T cells in progression of renal destruction. In addition, it should be examined whether T cells specific for peptide derived from the basement membrane could be identified in the mouse. The central hypothesis was that CD4^+ T cells affect progression of the disease and control renal damage.

In our EAG model, DBA/1J mice were immunized with recombinant human $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ in complete Freund's adjuvant and boosted three times with human $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ in incomplete Freund's adjuvant. As consequence, mice developed a severe proteinuria and starting from week 8, a glomerulonephritis with fatal loss of kidney function. After 2 weeks, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -specific antibodies were detectable, and after 3 - 5 weeks mice displayed IgG deposits along the GBM. However, at this stage the kidneys showed only marginal infiltration of leukocytes and limited signs of inflammation. Only in the late stage, the animals developed glomerular crescents in the Bowman's capsule, extensive tubulointerstitial damage and massive infiltration of macrophages. Infiltration of T cells was less pronounced and mainly observed in the interstitium. These T cells showed an activated phenotype and contained a substantial portion of Th1 and Th17 cells.

To clarify the general function of T cells and of their subpopulations, different experiments were performed. The depletion of CD4^+ T cells in the late phase of EAG by an anti-CD4 antibody did not cause a reduction of kidney damage compared with control animals. Neutralization of IL-17A during the whole immunization and observation period of EAG showed likewise no alteration in the kidney inflammation. This result was confirmed by an analysis of IL-17A ko mice, in which also no difference in the kidney damage was observed. The depletion of regulatory T cells in the late phase of EAG had also no influence on disease progression.

In the last part of the work, we tried to identify $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -specific T cells in immunized mice. Using IFN γ -ELISpot, cells were detected in the spleen of mice immunized with $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. The immunization with an immune-dominant peptide derived from $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (P71) led to the induction of P71- and $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -specific T cells. In both approaches, frequencies of the autoreactive T cells in the spleen were however very low.

In summary, we could establish the EAG model and identify highly activated T cells in the kidney and $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -specific T cells in the spleen. The function of T cells in the anti-GBM-GN could not be revealed so far, therefore, further studies are necessary.

Abkürzungsverzeichnis

AKP	alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
α 3(IV)NC1	alpha3-Kette des Typ IV Kollagens der Nicht-Kollagen-Domäne 1
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BFA	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin, engl.: bovine serum albumin
BUN	Blut-Harnstoff-Stickstoff, engl.: blood urea nitrogen
CD	Nomenklatur für Oberflächenproteine, engl.: cluster of differentiation
Cy	Cyanin
DEREG	depletion of regulatory T cells
DMEM	Dulbecco's modifiziertes eagle Medium
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
DTX	Diphtherietoxin
DZ	dendritische Zellen
EAG	Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot	enzyme-linked immuno spot
FACS	Durchflusszytometrie, engl.: fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht, engl.: forward scatter
GBM	glomeruläre Basalmembran
Gly	Glycin
GN	Glomerulonephritis
GP	Goodpasture-Syndrom
Granulozyten	im Kontext dieser Arbeit neutrophile Granulozyten
h	Human
HEK293-Zellen	humane embryonale Nierenzellen 293, engl.: human embryonic kidney cells 293
HLA	humane Leukozytenantigen, engl.: human leukocyte antigen
HRP	Meerrettichperoxidase, engl.: horseradish peroxidase
IFA	inkomplettes Freundesches Adjuvans
IFN γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IS-Kontrolle	Immunisierungskontrolle
KFA	komplettes Freundesches Adjuvans
ko	knockout
m	Maus
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl.: major histocompatibility complex

NBT	nitro blue tetrazolium
PAS	Perjodsäure-Schiffsches Reagenz, engl.: periodic acid-schiff
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl.: phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
RPGN	rapid progrediente Glomerulonephritis
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl.: rotations per minute
RPMI	roswell park memorial institute
s.c.	subkutan
S=N	Sulfilimin-Bindungen
SSC	Seitwärtsstreulicht, engl.: side scatter
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung, engl.: tris buffered saline
Th	T-Helferzellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Treg-Zellen	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
Wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Triple-helikale Organisation des Kollagens der Typ IV Familie	4
Abb. 2: Aufbau und Netzwerkanordnung von Kollagen Typ IV Protomeren	5
Abb. 3: Sulfilimin-Bindungen (S=N) stabilisieren die Struktur von $\alpha3\alpha4\alpha5$ Nicht-Kollagen-Domäne 1 (NC1)-Hexameren, dem Goodpasture-Autoantigen	5
Abb. 4: EAG-Immunisierungsschema	17
Abb. 5: Dot-Plot-Darstellung der FACS-Analyse	24
Abb. 6: Rekombinante Expression von m- und h- $\alpha3(IV)NC1$ -Peptiden aus Kulturüberständen von HEK293-EBNA-Zellen	29
Abb. 7: Immunisierungs- und Analysenschema	33
Abb. 8: Kinetik der Nierenerkrankung	34
Abb. 9: Analyse der Nierenfunktion	35
Abb. 10: Histologische Untersuchungen der Nieren in immunisierten Mäusen	36
Abb. 11: Lineare Regressionsanalyse der glomerulären Halbmondbildung versus Endzeitpunkt der EAG	37
Abb. 12: Antikörperantwort in immunisierten Mäusen	38
Abb. 13: Analyse von Makrophagen in Milz, Niere und Lunge immunisierter Mäuse	40
Abb. 14: Analyse von T-Zellen in Nieren immunisierter Mäuse	41
Abb. 15: Phänotypische und funktionale Analyse von renalen CD4 ⁺ T-Zellen in immunisierten Mäusen	43
Abb. 16: EAG-Immunisierung und CD4-Depletierung	44
Abb. 17: Anzeichen der Nierenerkrankung nach CD4-Depletion	45
Abb. 18: Analyse der Nierenfunktion nach CD4-Depletion	46
Abb. 19: Antikörperantwort nach CD4-Depletion	46
Abb. 20: Histologische Untersuchungen der Nieren nach CD4-Depletion	47
Abb. 21: FACS-Analyse von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in Milz, Niere und Lunge nach CD4-Depletion	48
Abb. 22: FACS-Analyse von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen nach CD4-Depletion zum Endzeitpunkt der EAG	49
Abb. 23: EAG-Immunisierung und IL-17A-Neutralisierung	50
Abb. 24: Anzeichen der Nierenerkrankung nach IL-17A-Neutralisierung	50
Abb. 25: Analyse der Nierenfunktion nach IL-17A-Neutralisierung	51
Abb. 26: Antikörperantwort nach IL-17A-Neutralisierung	51
Abb. 27: Histologische Untersuchungen der Nieren nach IL-17A-Neutralisierung	52
Abb. 28: FACS-Analyse von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in Milz, Niere und Lunge nach IL-17A-Neutralisierung	53
Abb. 29: Funktionale Charakterisierung von CD4 ⁺ T-Zellen nach IL-17A-Neutralisierung	54
Abb. 30: EAG-Immunisierung in IL-17A ko-Mäusen	55
Abb. 31: Anzeichen der Nierenerkrankung in IL-17A ko-Mäusen	55
Abb. 32: Analyse der Nierenfunktion in IL-17A ko-Mäusen	56
Abb. 33: Antikörperantwort in IL-17A ko-Mäusen	56
Abb. 34: FACS-Analyse von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in Milz, Niere und Lunge von IL-17A ko-Mäusen	57
Abb. 35: Funktionale Charakterisierung von CD4 ⁺ T-Zellen in IL-17A ko-Mäusen	58
Abb. 36: EAG-Immunisierung und Depletion der Treg-Zellen	59
Abb. 37: Anzeichen der Nierenerkrankung nach Depletion der Treg-Zellen	60
Abb. 38: Analyse der Nierenfunktion nach Depletion der Treg-Zellen	61
Abb. 39: Antikörperantwort nach Depletion der Treg-Zellen	62
Abb. 40: FACS-Analyse von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in Milz, Niere und Lunge nach Depletion der Treg-Zellen	63

Abb. 41: FACS-Analyse von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen in Milz, Niere und Lunge nach Depletion der Treg-Zellen.....	64
Abb. 42: Funktionale Charakterisierung von CD4 ⁺ T-Zellen nach Depletion der Treg-Zellen.....	65
Abb. 43: Immunisierung mit m- α 3(IV)NC1	66
Abb. 44: Nachweis der IFN γ -Produktion von α 3(IV)NC1-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen aus der Milz immunisierter Mäuse im ELISpot	67
Abb. 45: Immunisierung mit dem immundominanten Peptid P71.....	68
Abb. 46: Nachweis der IFN γ -Produktion von α 3(IV)NC1- und P71-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen aus der Milz immunisierter Mäuse im ELISpot.....	68

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: In dieser Arbeit wurden die folgenden monoklonalen Antikörper aus Hybridomüberständen gereinigt.....	9
Tab. 2: Verwendete Antikörper für den $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -ELISA	10
Tab. 3: Verwendete Antikörper für die FACS-Analysen.....	10
Tab. 4: Verwendete Antikörper für den $\text{IFN}\gamma$ -ELISpot	10
Tab. 5: Verwendetes Peptid für den $\text{IFN}\gamma$ -ELISpot	10
Tab. 6: Verwendete Substanzen mit Gefahreinstufung und Sicherheitshinweisen nach GHS	93

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Rapid progrediente Glomerulonephritis (RPGN).....	1
1.2 Die anti-GBM-Glomerulonephritis und das Goodpasture-Syndrom.....	2
1.3 Aufbau des Goodpasture-Antigens.....	3
1.4 Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis (EAG).....	6
1.5 T-Lymphozyten.....	7
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	8
2 Material	9
2.1 Mauslinien.....	9
2.2 Zelllinien.....	9
2.3 Antikörper.....	9
2.4 Peptid.....	10
2.5 Puffer.....	11
2.6 Zellkulturmedien.....	13
2.7 Feinchemikalien und Reagenzien.....	14
2.8 Kits.....	15
2.9 Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien.....	15
2.10 Geräte.....	15
2.11 Software.....	15
3 Methoden	16
3.1 Induktion der EAG in DBA/1J-Mäusen.....	16
3.1.1 Haltungsbedingungen der Mäuse.....	16
3.1.2 Immunisierungsprotokoll.....	16
3.1.3 Klinische Symptome der EAG.....	17
3.1.4 Sammlung von Plasma und Urin.....	17
3.1.4.1 Plasmagewinnung.....	17
3.1.4.2 Uringewinnung.....	17
3.2 Antikörperinjektion: CD4-Depletion, IL-17A-Neutralisierung.....	18
3.3 Diphtherietoxin-Injektion.....	18
3.4 Analyse der Proteinurie.....	18
3.4.1 Albumin-ELISA.....	18
3.4.2 Bestimmung des Kreatinins.....	19
3.5 Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN).....	19
3.6 Analyse der Antikörperantwort gegen Human- oder Maus- α 3(IV)NC1.....	19
3.7 Analyse von zirkulierenden Immunkomplexen mittels C1q-ELISA.....	20
3.8 Leukozytengewinnung aus Organen der Maus zur FACS- und ELISpot-Analyse... ..	21
3.8.1 Aufreinigung von Leukozyten aus der Milz.....	21
3.8.2 Aufreinigung von Leukozyten aus Nieren und Lunge.....	21
3.9 Bestimmung der Zellzahl.....	22
3.10 Charakterisierung von Zellen.....	22

3.10.1	Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting).....	22
3.10.2	FACS-Daten: Darstellung und Auswertung.....	23
3.10.3	Stimulation der T-Zellen zur Zytokinproduktion.....	25
3.10.4	Extrazelluläre Färbung von Oberflächenmolekülen.....	25
3.10.5	Intrazelluläre Färbung von Zytokinmolekülen.....	25
3.11	Analyse der spezifischen T-Zellantwort mittels IFN γ -ELISpot	26
3.12	Histologie und Immunhistochemie	27
3.13	Rekombinante Expression und Reinigung von Human- und Maus- α 3(IV)NC1-Peptid.....	27
3.13.1	Kultur von HEK293-EBNA-Zellen	27
3.13.2	Reinigung der α 3(IV)NC1-Peptide über anti-Flag M2-Affinitätschromatographie ..	28
3.14	Herstellung und Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Hybridom- Überständen.....	29
3.14.1	Kultur von Hybridomzellen	29
3.14.2	Reinigung von Antikörpern über Protein G-Affinitätschromatographie	29
3.15	Proteinbestimmung.....	30
3.16	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
3.17	Statistik.....	31
3.18	Gemeinsame Durchführung von Experimenten.....	31
4	Ergebnis.....	32
4.1	Charakterisierung der EAG in DBA/1J-Mäusen.....	32
4.1.1	Induktion der EAG in DBA/1J-Mäusen.....	32
4.1.2	Spezifische Antikörperantwort in EAG-Mäusen	37
4.1.3	Renale Makrophageninfiltration in EAG-Mäusen	39
4.1.4	Renale T-Zellinfiltration in EAG-Mäusen	41
4.1.5	Phänotypische und funktionale Charakterisierung von renalen T-Zellen in EAG-Mäusen.....	42
4.2	Einfluss der CD4 ⁺ T-Zelldepletion auf die Immunantwort im EAG-Mausmodell ...	44
4.3	Einfluss von IL-17A auf die Immunantwort im EAG-Mausmodell	49
4.3.1	IL-17A-Neutralisierung.....	49
4.3.2	Analyse in der IL-17A ko-Maus	54
4.4	Einfluss der regulatorischen T-Zellen auf die Immunantwort im EAG-Mausmodell	59
4.5	α 3(IV)NC1-spezifische CD4 ⁺ T-Zellantwort im EAG-Mausmodell	66
4.5.1	Induktion der EAG mit Maus- α 3(IV)NC1	66
4.5.2	Induktion der EAG mit dem immundominanten Peptid P71	67
5	Diskussion	70
5.1	Krankheitsverlauf der EAG.....	70
5.2	Spezifische Antikörperantwort in EAG-Mäusen	71
5.3	Renale Lymphozyteninfiltration in EAG-Mäusen	72
5.4	Phänotypische und funktionale Charakterisierung von renalen T-Zellen in EAG-Mäusen.....	72
5.5	Einfluss verschiedener CD4 ⁺ T-Zellsubpopulationen auf die Immunantwort im EAG-Modell.....	73
5.5.1	Einfluss von CD4 ⁺ T-Zellen auf die Immunantwort im EAG-Modell.....	74
5.5.2	Einfluss von Th17-Zellen auf die Immunantwort im EAG-Modell.....	74
5.5.3	Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die Immunantwort im EAG-Modell	75
5.6	α 3(IV)NC1-spezifische CD4 ⁺ T-Zellantwort im EAG-Modell	77
5.7	Ausblick	78

6	Literaturverzeichnis.....	79
7	Anhang	92
	Publizierte Ergebnisse.....	92
	Gefahrstoffe.....	93
	Danksagung.....	95

1 Einleitung

1.1 Rapid progrediente Glomerulonephritis (RPGN)

Die Nieren sind ein paarig angeordnetes Organ der Wirbeltiere mit einer durchschnittlichen Länge von jeweils 10 cm. Ihre Funktionen sind sehr vielfältig und komplex. Die wichtigsten Aufgaben sind die Reinigung des Blutes von Stoffwechselprodukten und die Produktion von Harn (Urin). Jede Niere besteht aus über 1 Million kleinster Filtereinheiten (Nephronen). Diese bestehen wiederum aus einem kapillaren Gefäßknäuel (Glomerulus) mit umliegender Kapsel (Bowman-Kapsel) und dem Tubulussystem (Welsch, 2006).

Die Glomeruli bilden eine wichtige Zielstruktur für verschiedene Autoimmunerkrankungen. Bei diesen Erkrankungen wird zwischen einer primären und sekundären Entzündung der Glomeruli (Glomerulonephritis, GN) unterschieden. Eine aggressive Verlaufsform der GN ist die rapid progrediente Glomerulonephritis (RPGN) (Turner, 2011). Die RPGN ist durch eine rasch fortschreitende Schädigung der Glomeruli gekennzeichnet, die innerhalb von Tagen bis Monaten zu einem kompletten Funktionsverlust der Niere führen kann. Zusätzlich ist die RPGN durch eine schwere Entzündungsreaktion gekennzeichnet, die sich in einer typischen halbmondförmigen extrakapillären Proliferation innerhalb der Bowman-Kapsel präsentiert (Jindal, 1999; Wolf, 2003). RPGN lassen sich aufgrund ihres Pathomechanismus in drei Gruppen einteilen:

1. Die durch anti-glomeruläre-Basalmembran (GBM)-Antikörper vermittelte RPGN (anti-GBM-GN) tritt bei 10 bis 20% aller Patienten mit RPGN auf. Zeigt sich zusätzlich eine Lungenbeteiligung, welche sich durch Lungenblutungen äußert, spricht man von dem Goodpasture-Syndrom (Jindal, 1999). Charakteristisch für die anti-GBM-GN ist die lineare IgG- und Komplement-Ablagerung entlang der glomerulären Basalmembran. Typischerweise finden sich keine Immunkomplexe in den Glomeruli (Igarashi *et al.*, 1996; Haas & Eustace *et al.*, 2004).

2. Die durch Immunkomplexe vermittelte RPGN findet sich bei etwa 40% der Patienten mit RPGN. Diese Form der RPGN ist mit verschiedenen systemischen Autoimmunerkrankungen assoziiert, z.B. der IgA-Nephropathie (IgAN) oder dem Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) (Jindal, 1999). Charakteristisch für diese Form der RPGN ist die Immunkomplexablagerung an der GBM, die sich histologisch als granuläre IgG- und Komplement-Ablagerung entlang der GBM präsentiert (Salant, 1987; Igarashi *et al.*, 1996).

3. Die mit ANCA (anti-neutrophile-cytoplasmatische-Antikörper) assoziierten Formen der RPGN sind für den größten Teil der RPGN-Erkrankungen verantwortlich. Charakteristisch ist eine geringe oder fehlende Antikörperdeposition im Glomerulus. Diese Form der RPGN wird daher auch als Pauci-Immun-GN bezeichnet (Cunningham *et al.*, 1999).

Klinisch wird bei autoimmunen Nierenerkrankungen zwischen einem nephritischen und einem nephrotischen Syndrom unterschieden. Eine akute Entzündung des Nierengewebes ist oft mit einem nephritischen Syndrom und eine chronisch-degenerative Schädigung mit dem nephrotischen Syndrom verbunden (Orth & Ritz, 1998). Die nephritische Erkrankungsform ist durch einen generellen Funktionsverlust der Niere gekennzeichnet. Folgen sind eine milde bis mäßige Proteinurie (< 3,5 g Eiweißausscheidung im 24 Stunden-Urin), mäßige Ödembildung, Bluthochdruck und Hämaturie (Greten, 2002). Die nephrotische Erkrankungsform beruht im Wesentlichen auf einem Proteinverlust durch die Niere. Es kommt daher zu einer schweren Proteinurie (> 3,5 g/24 h) mit massiver Ödembildung, Hypoalbuminämie, Hyperlipidämie und Lipidurie (Madaio & Harrington, 2001). RPGN sind im Allgemeinen durch ein schweres nephritisches Syndrom gekennzeichnet, es können aber auch Symptome eines nephrotischen Syndroms auftreten (Madaio & Harrington, 2001; Haller & Gross, 2003).

1.2 Die anti-GBM-Glomerulonephritis und das Goodpasture-Syndrom

Das Goodpasture (GP)-Syndrom wurde von dem amerikanischen Pathologen Ernest William Goodpasture erstmalig 1919 als eine Kombination der anti-GBM-GN mit Lungenblutungen beschrieben (Goodpasture, 1919). Das GP-Syndrom ist eine sehr selten auftretende (Kluth & Rees, 1999), aber äußerst schwere Autoimmunerkrankung vom Typ II (Panzer & Kurts, 2010). Die Inzidenz beträgt 0,5 bis 1 Fall pro eine Million Einwohner pro Jahr (Peto & Salama, 2011). Die Erkrankung kann in jeder Altersklasse auftreten. Bei Männern liegt aber häufig ein Alter zwischen 20 bis 30 Jahren und bei Frauen zwischen 50 bis 60 Jahren vor (Teague *et al.*, 1978; Savage *et al.*, 1986; Daly *et al.*, 1996; Levy *et al.*, 2001).

Wie bereits beschrieben ist die anti-GBM-GN durch eine halbmondförmige Entzündung in der Bowman-Kapsel gekennzeichnet. Hierfür sind eine extrakapilläre Proliferation der glomerulären Epithelzellen, eine Makrophageninfiltration sowie eine Fibrinablagerung verantwortlich (Lan *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 1995). Im fortgeschrittenen Zustand führt diese Entzündungsreaktion zum kompletten Funktionsverlust des Glomerulums. Unbehandelt endet die Erkrankung fast immer mit dem Tod des Patienten. Eine frühzeitige Diagnosestellung ist daher von entscheidender Bedeutung. In Folge dessen kann mit einem geeigneten Therapieverfahren begonnen werden, um die Zerstörung des Nierengewebes zu stoppen (Peto & Salama, 2011).

Das GP-Syndrom ist eine der wenigen autoimmunen Erkrankungen, bei dem das Autoantigen identifiziert und charakterisiert werden konnte (Dean *et al.*, 2005). Die anti-GBM-Autoantikörper lagern sich in der Niere und Lunge an ein konformationelles Epitop der C-terminalen Nicht-Kollagen-Domäne 1 (NC1) der α 3- und α 5-Kette vom Kollagen Typ IV (α 3(IV)NC1 und α 5(IV)NC1) (Vanacore *et al.*, 2011). (Der Aufbau des Typ IV Kollagens der GBM und des GP-Antigens wird später im Detail beschrieben). Die Antikörperbindung führt zu einer Aktivierung des Komplementsystems und nachfolgend zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Ooi *et al.*, 2009).

Lerner *et al.* zeigte 1967 zum ersten Mal pathogene Eigenschaften der anti-GBM-Antikörper in Tierexperimenten auf. Nach Immunisierung mit GBM-Bestandteilen konnte er anti-GBM-Autoantikörper im Serum und in den Nieren der Tiere nachweisen. Der anschließende Serumtransfer führte in nicht immunisierten Tieren zur Entwicklung einer GN und bestätigte daher die fundamentale Rolle der Autoantikörper in der Pathogenese der Erkrankung (Lerner *et al.*, 1967).

Bei Patienten mit anti-GBM-GN werden hohe Titer dieser Antikörper im Serum nachgewiesen. Auch aus dem Nierengewebe der Patienten können diese Antikörper isoliert werden. Diese Autoantikörper sind typischerweise vom Isotyp IgG1 (Hopfer *et al.*, 2003). Der Nachweis von anti-GBM-Autoantikörpern ist schließlich ein entscheidendes Diagnosekriterium für die anti-GBM-GN (Ooi *et al.*, 2009).

Neben den Autoantikörpern gibt es auch Hinweise für die Beteiligung von autoreaktiven T-Zellen an der Pathogenese der Erkrankung. Indirekte Hinweise sind der Klassenwechsel der Autoantikörper zum IgG1 Isotyp bei der Mehrheit der Patienten und die Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen in der entzündeten Niere (Hopfer *et al.*, 2003; Summers *et al.*, 2009). Schließlich konnten im peripheren Blut von Patienten α 3(IV)NC1-spezifische CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Ein Epitopmapping mit überlappenden α 3(IV)NC1-Peptiden führte zur Identifizierung von zwei immundominanten T-Zellepitopen: alpha3 (71-90) und alpha3 (131-150). Einige dieser Peptide induzierten die Produktion von Interferon- γ (IFN γ), welches auf eine Beteiligung von Th1-Zellen an der Erkrankung schließen lässt (Cairns *et al.*, 2003).

In Patienten konnte eine Assoziation der anti-GBM-GN mit dem humanen Leukozytenantigen (HLA)-Genlocus ermittelt werden. Die starke Disposition liegt für HLA-DRB1*1501 vor, das etwa 3,5 mal öfter in Patienten als in der normalen Bevölkerung gefunden wird. Andererseits finden sich HLA-Allele DRB1*01 und DRB1*07 seltener in Patienten; ein Hinweis auf eine schützende Funktion dieser Allele. Auch in den Tiermodellen für die anti-GBM-GN zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Tiere. Die Induktion der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis (EAG), ein Tiermodell des GP-Syndroms, ist nur in bestimmten Ratten- und Mausinzuchtstämmen möglich (Kalluri *et al.*, 1997; Reynolds *et al.*, 2002; Reynolds, 2011). Auch in der Maus ist die Ausprägung der GP-Erkrankung von bestimmten Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Haplotypen abhängig (Kalluri *et al.*, 1997). Weiterhin sind Tierstämme, welche überwiegend Th1-Antworten zeigen, für die Erkrankung empfänglich, wohingegen Th2-Stämme eine Resistenz zeigen (Peto & Salama, 2011).

Die Behandlung der anti-GBM-GN beruht zurzeit auf einer starken Immunsuppression in Kombination mit einer Plasmapherese zur Entfernung der Autoantikörper. Seit 30 Jahren werden standardmäßig Cyclophosphamid und Corticosteroide eingesetzt, um die Entzündung in der Niere und gegebenenfalls der Lunge zu unterdrücken und die Bildung von anti-GBM-Antikörpern zu verhindern (Peto & Salama, 2011).

1.3 Aufbau des Goodpasture-Antigens

Basalmembranen besitzen typischerweise einen vierschichtigen Aufbau und bestehen aus der *Lamina rara externa*, *Lamina densa*, *Lamina rara interna*, *Lamina fibroreticularis*. Diese Form der extrazellulären Matrix befindet sich unter den Epithel- bzw. Endothel-Zellen, welche die Basalmembran synthetisieren. Die Funktion der Basalmembran ist der Schutz des Epithel- bzw. Endothel-Gewebes vor Dehnungsschäden. *Lamina rara externa*, *Lamina densa* und *Lamina rara interna* werden zusammen als Basallamina bezeichnet und befinden sich in Nierenglomeruli und Lungenalveolen. Die *Lamina densa* ist die Hauptkomponente der Basalmembran und besteht aus den Glykoproteinen Laminin und Nidogen, Proteoglykanen wie Perlecan und Kollagen Typ IV (Aumailley *et al.*, 2000; Sundaramoorthy *et al.*, 2002; Lebel *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2004; Welsch, 2006).

Das Kollagen Typ IV bildet den Hauptbestandteil der Basalmembran und formt als einzige Kollagenart ein zweidimensionales Netzwerk (Ninomiya *et al.*, 1995; Salant, 2010). Kollagen Typ IV ist aus sechs homologen, genetisch verschiedenen α -Ketten ($\alpha 1(IV)$ bis $\alpha 6(IV)$) aufgebaut (Kohda *et al.*, 2004). In Abbildung 1 sind die Ketten des Typ IV Kollagens dargestellt.

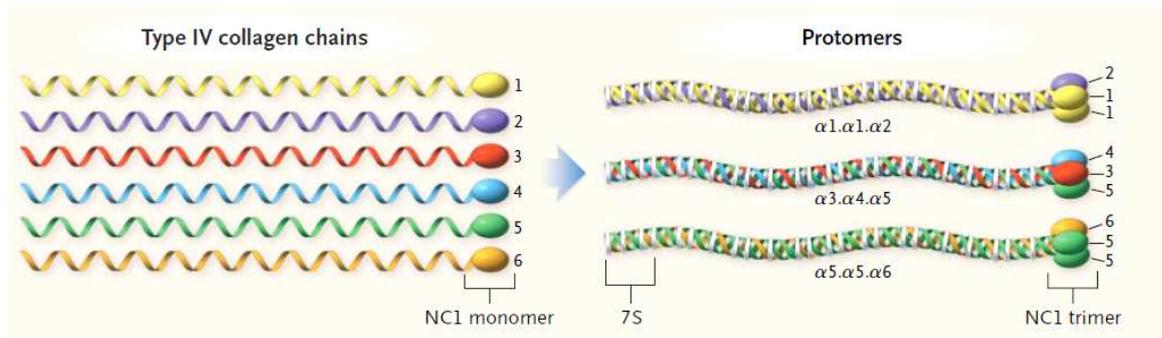


Abb. 1: Triple-helikale Organisation des Kollagens der Typ IV Familie. Sechs genetisch verschiedene α -Ketten werden zu drei verschiedenen Protomeren kombiniert. Jedes Protomer hat eine triple-helikale 7S-Domäne am N-Terminus, eine lange triple-helikale Kollagen-Domäne in der Mitte des Moleküls und einen Komplex aus drei NC1-Domänen (NC1: non collagenous domain 1) am C-Terminus. Unterbrechungen der Gly-X-Y Aminosäuresequenz an zahlreichen Stellen der Kollagen-Domänen (weißer Kreis) erlauben Flexibilität, Schlingenbildung und Supercoilstrukturen der Protomere im Netzwerk der Basalmembranen (Hudson *et al.*, 2003).

Jede α -Kette ist am N-Terminus durch eine kurze 7S-Domäne, im Mittelteil durch eine lange Kollagen-Domäne und am C-Terminus durch eine kugelige Nicht-Kollagen-Domäne 1 (NC1) charakterisiert (Hudson *et al.*, 2003; Pedchenko *et al.*, 2010). Die Kollagen-Domäne ist aus wiederholten Gly-X-Y Sequenzen aufgebaut und weist somit an jeder dritten Position die Aminosäure Glycin auf (Hudson *et al.*, 2003). Kollagene sind aus drei α -Ketten aufgebaut, die sich in Form einer Triple-Helix ineinander umschlingen. Diese Trimere werden als Protomere bezeichnet (Borza *et al.*, 2002). Für Typ IV Kollagen sind drei Protomere mit folgenden α -Kettenkombinationen bekannt: $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV), $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ (IV) und $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (IV). Die GBM besteht überwiegend aus $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ -Protomeren, außerdem werden $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ -Protomere auf der Endothelzelleseite der GBM gefunden (Kohda *et al.*, 2004).

Das Kollagen Typ IV-Netzwerk entsteht durch die Verbindung von zwei NC1-Trimeren zu NC1-Hexameren am C-Terminus und durch die Zusammenlagerung von vier 7S-Domänen zu Tetrameren am N-Terminus. Normalerweise finden sich nur drei Formen der Hexamere: $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV)- $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV), $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ (IV)- $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ (IV), $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV)- $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (IV) (Hudson *et al.*, 2003). In Abbildung 2 ist das $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ -Netzwerk dargestellt.

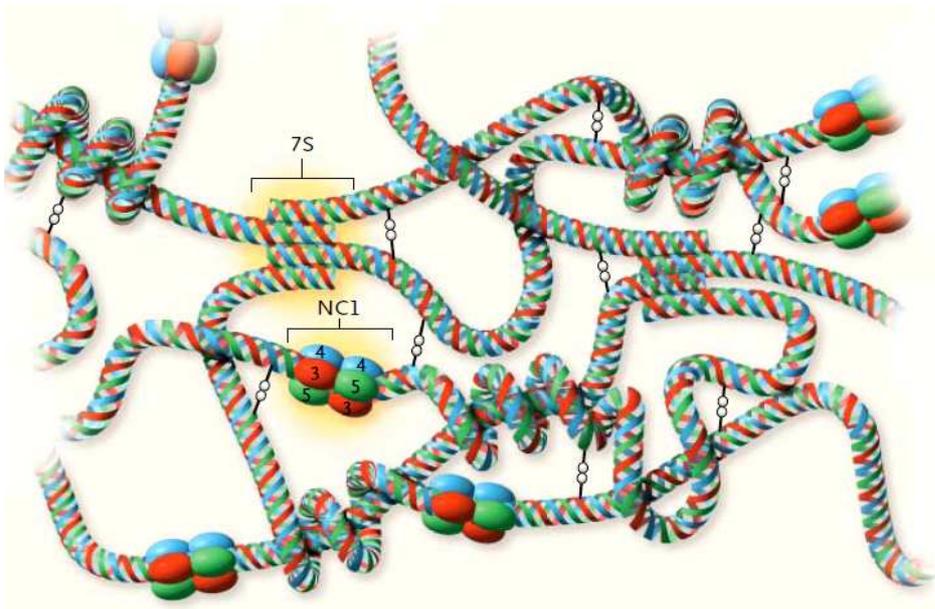


Abb. 2: Aufbau und Netzwerkanordnung von Kollagen Typ IV Protomeren. Protomere erzeugen Basalmembran-Netzwerke mit anderen Protomeren durch Verbindung von zwei C-terminalen NC1-Trimeren zu NC1-Hexameren und durch Interaktion von vier N-terminalen triple-helikalen 7S-Domänen. In der Abbildung ist ein Netzwerk aus $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ (IV)-Protomeren dargestellt. Es zeigt eine Ende-zu-Ende-Verbindung aus individuellen Protomer-Einheiten, Supercoilstrukturen und Schlingenbildungen der Triple-Helices und Disulfidbrücken zwischen triple-helikalen Domänen. Die Struktur des NC1-Hexamers wird durch die jeweiligen α -Ketten bestimmt. Die molekularen Erkennungssequenzen innerhalb der NC1-Domänen regeln die Selektion der Kettenpartner für die Protomere und den Netzwerkaufbau. Zwei ähnliche Netzwerke können aus $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV)- $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV) NC1-Hexameren oder $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV)- $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (IV) NC1-Hexameren aufgebaut werden. Das $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ (IV)- $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ (IV) NC1-Netzwerk unterscheidet sich von den anderen beiden in einer höheren Anzahl von Disulfidbrücken zwischen den triple-helikalen Domänen. Damit ist die Resistenz gegenüber Proteolyse erhöht (Hudson *et al.*, 2003).

Die NC1-Hexamere werden im Kollagen Typ IV-Netzwerk durch Sulfilimin-Bindungen (S=N) zwischen gegenüberliegenden NC1-Trimeren stabilisiert (Salant, 2010; Vanacore *et al.*, 2011). Sulfilimin-Bindungen entstehen zwischen der Aminosäure Methionin⁹³ und Lysin²¹¹ der NC1-Domänen (Luo *et al.*, 2010; Vanacore *et al.*, 2011). In Abbildung 3 ist die S=N-Verbindung zwischen NC1-Trimeren veranschaulicht.

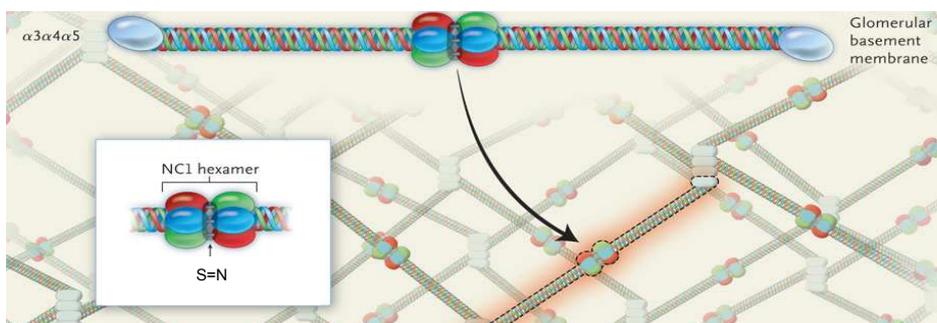


Abb. 3: Sulfilimin-Bindungen (S=N) stabilisieren die Struktur von $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ Nicht-Kollagen-Domäne 1 (NC1)-Hexameren, dem Goodpasture-Autoantigen. NC1-Hexamere bestehen aus zwei gegenüberliegenden NC1-Trimeren, in der Abbildung jeweils zusammengesetzt aus $\alpha 3$ (rot) $\alpha 4$ (blau) $\alpha 5$ (grün) NC1-Domänen. Methionin⁹³ und Lysin²¹¹ oder die hydroxylierte Form Hydroxylysin²¹¹ sind durch Sulfilimin-Bindungen zwischen gegenüberliegenden NC1-Domänen verbunden (Vanacore *et al.*, 2011; Abbildung modifiziert nach Salant, 2010).

Für die Autoantikörper der anti-GBM-GN wurden zwei immundominante Antigen-Epitope E_A und E_B in den NC1 Domänen von $\alpha3(IV)NC1$ und $\alpha5(IV)NC1$ identifiziert. (Borza *et al.*, 2002; Vanacore *et al.*, 2011). Bei diesen „Goodpasture-Epitopen“ handelt es sich um kryptische Epitope, die im Zentrum des NC1-Hexamers eingeschlossen sind (Borza *et al.*, 2002; Salant, 2010) und daher für Antikörper nicht zugänglich sind (Borza *et al.*, 2002). Eine Dissoziation der Hexamere und eine Auflösung der Interaktion von NC1-Domänen führt zur Exposition der E_A und E_B Regionen der $\alpha3(IV)NC1$ - und $\alpha5(IV)NC1$ -Untereinheiten die dann Autoantikörper binden können (Pedchenko *et al.*, 2010; Salant, 2010; Vanacore *et al.*, 2011). Die Antikörperbindung wirkt wahrscheinlich direkt destabilisierend auf das Kollagenetzwerk. Weiterhin wird durch die Antikörper das Komplementsystem aktiviert. Sowohl die Antikörper als auch das Komplementsystem führen dann zur Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen (Ooi *et al.*, 2009) und dadurch zu einer zusätzlichen Schädigung der Basalmembran.

Aufgrund der stabilisierenden Wirkung auf die Hexamere verhindern Sulfilimin-Bindungen die Bindung von Autoantikörpern und schützen daher die Basalmembran (Pedchenko *et al.*, 2010). Luo *et al.* zeigte in Versuchen, dass die Reaktivität der GP-Autoantikörper invers mit dem Gehalt der S=N-Verbindungen in NC1-Hexameren der GBM korreliert. In der GBM von Mäusen finden sich in den $\alpha3\alpha4\alpha5NC1$ -Hexameren zahlreiche S=N-Verbindungen und die GP-Epitope sind daher nicht zugänglich für Antikörper. Im Gegensatz dazu können im Menschen und Totenkopffäffchen $\alpha3\alpha4\alpha5NC1$ -Hexamere ohne NC1-Sulfilimin-Verbindungen nachgewiesen werden. Diese Spezies zeigen daher auch eine höhere Empfänglichkeit für das GP-Syndrom. Warum bestimmte Spezies Unterschiede im Ausmaß der S=N-Bindungen zeigen, ist nicht bekannt (Luo *et al.*, 2010).

Wie letztendlich Autoantikörper gegen die kryptischen Epitope in den Hexameren entstehen, ist bisher unklar. Eine Schädigung der Basalmembranen in Niere oder Lunge z.B. als Folge einer Infektion oder durch Kontakt mit Kohlenwasserstoffen könnte zur Freisetzung von NC1-Domänen führen, die dann eine Immunantwort verursachen (Peto & Salama, 2011). In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass die Lungenblutung im GP-Syndrom fast ausschließlich bei Zigarettenrauchern gefunden wird. Die Schädigung der alveolären Basalmembran durch Zigarettenrauch könnte einerseits die Bildung von Autoantikörpern gegen $\alpha3(IV)NC1$ auslösen. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass durch eine Schädigung der Basalmembran die kryptischen Epitope vermehrt für Autoantikörper zugänglich werden (Kluth & Rees, 1999; Peto & Salama, 2011).

1.4 Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis (EAG)

Die Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis (EAG) ist ein Tiermodell für eine organspezifische Autoimmunerkrankung, das 1962 zum ersten Mal von Steblay beschrieben wurde. Steblay immunisierte Schafe mit Human-GBM in komplettem Freundschens Adjuvans. Diese Tiere entwickelten daraufhin anti-GBM-Antikörper und zeigten Halbmondbildungen in den Glomeruli (Steblay, 1962). Später wurden in Ratten und Mäusen ähnliche EAG-Modelle entwickelt. Tiere bestimmter Inzuchtstämme wurden hierfür mit gereinigter Rinder- oder Ratten-GBM (Sado *et al.*, 1984; Pusey *et al.*, 1991; Bolton *et al.*, 1993; Kalluri *et al.*, 1997; Reynolds *et al.*, 1998) oder mit rekombinantem Human oder Ratten- $\alpha3(IV)NC1$ (Sado *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 2001; Hopfer *et al.*, 2003) immunisiert. Generell spiegeln diese Nagetiermodelle der EAG viele Parameter der humanen Erkrankung sehr gut wider, wobei sich verschiedene Maus- und Ratteninzuchtstämme z.T. deutlich in der Schwere der Erkrankung und in der Schädigung der Niere unterscheiden. In den Modellen finden sich Autoantikörper gegen $\alpha3(IV)NC1$ und z.T. auch eine ausgeprägte Halbmondbildung in den

Bowmankapseln, die mit einer tubulointerstitiellen Entzündung einhergeht (Ryan *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2003). Diese Modelle gaben auch Hinweise auf eine wichtige Funktion von T-Zellen in der Entwicklung der Erkrankung (Kalluri *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2002; Hopfer *et al.*, 2003).

Um die $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Spezifität und den Mechanismus der Autoimmunantwort in der GN zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit das von Hopfer *et al.* entwickelte EAG-Modell in der DBA/1J-Maus verwendet. In diesem Modell werden Mäuse mehrmals mit rekombinatem, in Zellkultur hergestelltem Human- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) oder Maus- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) immunisiert. Die Immunisierung mit h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ führt in einem Zeitraum von 8 - 14 Wochen und die Immunisierung mit m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ in einem Zeitraum von 10 - 16 Wochen zu einer schweren Entzündungsreaktion mit einem fortschreitenden Funktionsverlust der Niere. In den Tieren können $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische Antikörper sowie $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische CD4^+ T-Zellen nachgewiesen werden. Histopathologische Befunde, wie die Halbmondbildung, Fibrinablagerung und der tubulointerstitielle Schaden, zeigen eine große Ähnlichkeit zu den Befunden in der humanen Erkrankung (Hopfer *et al.*, 2012).

1.5 T-Lymphozyten

Verschiedene Ergebnisse aus EAG-Modellen, aber auch Daten von Patienten mit anti-GBM-GN deuten auf eine Beteiligung von T-Lymphozyten an der Entwicklung und dem Verlauf der Erkrankung hin. Auch in dem hier verwendeten EAG-Modell in der DBA/1J-Maus gibt es Hinweise auf eine Funktion von T-Zellen in der Erkrankung.

T-Zellen reifen im Thymus zu unreifen (naiven) T-Zellen heran. Sie tragen auf ihrer Oberfläche einen T-Zell-Rezeptor (TZR), wobei jede T-Zelle nur TZR einer einzigen Spezifität trägt. T-Zellen erkennen mit Hilfe ihres TZR kein lösliches Antigen, sondern nur Antigenfragmente, die ihnen mittels Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentiert werden. Durch diesen Kontakt wird die naive T-Zelle aktiviert und beginnt zu proliferieren und weiter zu differenzieren.

MHC-Moleküle werden in zwei Klassen unterteilt. MHC-Klasse I-Moleküle finden sich im menschlichen Körper auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten. Sie präsentieren Fragmente von Proteinen des Zytoplasmas. Hierbei handelt es sich um körpereigene Proteine bzw. um Proteine, die von im Zytoplasma replizierenden Pathogenen stammen. Infizierte Zellen können daher von zytotoxischen CD8^+ T-Zellen erkannt und zerstört werden. Material aus dem extrazellulären Raum, welches die Zellen aufgenommen haben, wird von MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert. MHC-II findet sich nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ), zu denen Makrophagen, dendritische Zellen (DZ) und B-Zellen gehören. MHC II-Peptid-Komplexe werden von CD4^+ T-Zellen erkannt (Janeway *et al.*, 2002).

Im Rahmen von Immunantworten differenzieren CD4^+ T-Zellen je nach Zytokinumfeld in T-Helferzellen mit spezialisierten Funktionen. Wichtige proinflammatorische CD4^+ T-Zellsubpopulationen sind $T_{\text{helper}1}$ (Th1)-, $T_{\text{helper}2}$ (Th2)- und $T_{\text{helper}17}$ (Th17)-Zellen. Die Zellen stehen den regulatorischen T (Treg)-Zellen gegenüber, die vor allem eine hemmende oder suppressive Funktion besitzen (Panzer & Kurts, 2010).

Th1-Zellen entstehen unter Einwirkung von Interleukin-12 (IL-12), welches z.B. durch Makrophagen produziert wird. Th1-Zellen bilden $\text{IFN}\gamma$, welches für die Aktivierung von Makrophagen entscheidend ist, und es diesen Zellen ermöglicht, Bakterien effizient zu zerstören. Th1-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene (Kitching *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2009).

Th2-Zellen entwickeln sich in Gegenwart von IL-4. Von den Th2-Zellen werden die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 produziert. Th2-Zellen spielen eine Rolle in der Immunantwort gegen Parasiten und sind an der Entstehung von Allergien beteiligt. Th2-Zellen sind weiterhin entscheidend für den Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgE (Tipping & Holdsworth, 2003; Paul & Zhu, 2010).

Th17-Zellen entstehen unter dem Einfluss von IL-6, IL-23 und dem Transforming Growth Factor- β (TGF- β). Th17-Zellen sind durch die Produktion von IL-17A, IL-17F und IL-22 charakterisiert. Th17-Zellen kontrollieren die Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze. Den Zellen wird aber auch eine Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zugeschrieben. Durch die Sekretion von IL-17A sind Th17-Zellen in der Lage, die Mobilisierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zu induzieren. (Huang *et al.*, 2004; Caccamo *et al.*, 2011; Odobasic *et al.*, 2011).

Regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) entstehen entweder im Thymus (natürliche Treg-Zellen oder nTreg-Zellen) oder werden in Gegenwart von TGF- β generiert (induzierte Treg-Zellen oder iTreg-Zellen). Durch eine Vielzahl von Mechanismen wie z.B. die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 oder TGF- β , können Treg-Zellen Immunantworten unterdrücken. Überschießende Immunantworten oder Antworten gegen körpereigene Strukturen können durch diese Zellen verhindert werden. Treg-Zellen spielen daher eine zentrale Rolle bei der Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen und immunpathologischen Prozessen. Sowohl iTreg- als auch nTreg-Zellen sind durch die Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD25 sowie durch den Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) gekennzeichnet (Fu *et al.*, 2004; Wan & Flavell, 2008; Panzer & Kurts, 2010; Hori, 2011).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Bereits vor über 40 Jahren fanden Rocklin *et al.* bei Patienten mit GN neben der T-Zell-abhängigen Autoantikörperproduktion auch eine T-Zell-vermittelte Hypersensitivität gegenüber dem GBM-Antigen (Rocklin *et al.*, 1970). Anschließende Arbeiten in der humanen und experimentellen GN bestätigten die Beteiligung der T-Zellen an der Krankheitsentwicklung (Bolton *et al.*, 1978; Neale *et al.*, 1988). T-Zellen spielen wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Induktion der Autoantikörper. Eine direkte Beteiligung am renalen Entzündungsgeschehen und am Funktionsverlust der Niere ist aber auch vorstellbar. Generell ist aber bis heute nur wenig über die Bedeutung von T-Zellen und insbesondere von $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen T-Zellen in der anti-GBM-GN bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion verschiedener CD4⁺ T-Zellen in der Induktion und im Verlauf der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis untersucht werden. Hierzu sollte das EAG-Modell in der DBA/1J-Maus etabliert und ausführlich charakterisiert werden. In diesem Modell sollte dann die Beteiligung von verschiedenen T-Helferzellpopulationen an Entzündungsprozessen der Niere untersucht werden. Das langfristige Ziel der Arbeit ist die Gewinnung von Erkenntnissen, die zu einer besseren Diagnose und zu neuen, wirkungsvollen Behandlungsstrategien von autoimmunen Nierenerkrankungen beim Menschen führen.

2 Material

2.1 Mauslinien

DBA/1J

Charles River, Wilmington, USA

DBA/1J-IL-17A ko

wurden von Dr. C. Hölscher (Nakae *et al.*, 2002) zur Verfügung gestellt und am Institut für Immunologie (UKE) mindestens 8 × auf den DBA/1J-Hintergrund zurückgekreuzt.

DBA/1J-DEREG

wurden von Prof. Dr. T. Sparwasser (Institut für Infektionsimmunologie, Hannover) & Prof. Dr. T. Kamrad (Institut für Immunologie, Jena) zur Verfügung gestellt und am Institut für Immunologie (UKE) mindestens 10 × auf den DBA/1J-Hintergrund zurückgekreuzt.

Die Tiere wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet. Alle Tierversuche erfolgten nach den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes.

2.2 Zelllinien

HEK293-EBNA

wurde durch Dr. H. Hopfer (Universitätsspital Basel) zur Verfügung gestellt (Hopfer *et al.*, 2003).

Ratte-anti-Maus-CD4 YTS 191 Hybridom

wurde durch Dr. S. H. E. Kaufmann, (Max Planck Institut, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Maus-anti-Maus-IL-17A MM17F3
Hybridom

wurde durch Dr. C. Uyttenhove (Ludwig Institut, Brüssel) zur Verfügung gestellt (Uyttenhove & Van Snick, 2006).

Die stabil transfizierten HEK293-EBNA-Zellen enthalten ein Plasmid mit einem Gen, welches entweder für das Human- $\alpha 3$ (IV)NC1 oder Maus- $\alpha 3$ (IV)NC1 kodiert. Die Konstruktion ist in Abschnitt 3.13.1 beschrieben.

2.3 Antikörper

Tab. 1: In dieser Arbeit wurden die folgenden monoklonalen Antikörper aus Hybridomüberständen gereinigt.

Spezifität	Isotyp	Klon	Ursprung	Quelle
Maus-CD4	IgG2b	YTS 191	Ratte	Dr. Kaufmann, Berlin
Maus-IL-17A	IgG1	MM17F3	Maus	Dr. Uyttenhove, Brüssel

Tab. 2: Verwendete Antikörper für den $\alpha 3(IV)NC1$ -ELISA.

Spezifität	Konjugat	Ursprung	Quelle
Maus-IgM + IgG	HRP	Ziege	Amersham Biosciences, Großbritannien
Flag M2	-	Maus	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tab. 3: Verwendete Antikörper für die FACS-Analysen.

Spezifität (anti-Maus)	Fluorochrom	Klon	Ursprung	Quelle
CD45	Alexa Fluor 700	30-F11	Ratte	eBioscience
CD45	PerCP	30-F11	Ratte	BD Biosciences
CD11b	PE	M1/70	Ratte	BD Biosciences
CD11b	FITC	M1/70	Ratte	BD Biosciences
CD11b	PerCP	M1/70	Ratte	BioLegend
CD4	PerCP	RM4-5	Ratte	BD Biosciences
CD4	Cy5	YTS 191	Ratte	Institut für Immunologie
CD4	FITC	GK1.5	Ratte	Institut für Immunologie
CD4	Alexa Fluor 700	RM4-5	Ratte	eBioscience
CD4	APC	RM4-5	Ratte	BioLegend
CD8a	PE-Cy7	53-6.7	Ratte	BD Biosciences
F4/80	Alexa Fluor 647	BM8	Ratte	eBioscience
Gr-1 (Ly6C+Ly6G)	eFluor 450	RB6-8C5	Ratte	Institut für Immunologie
Gr-1 (Ly6C+Ly6G)	eFluor 450	RB6-8C5	Ratte	eBioscience
CD44	PE	IM7	Ratte	BD Biosciences
CD62L	FITC	MEL-14	Ratte	BD Biosciences
CD3e	APC	145-2C11	Hamster	BD Biosciences
IFN γ	APC	XMG1.2	Ratte	eBioscience
IFN γ	eFluor 450	XMG1.2	Ratte	eBioscience
IL-17A	PE	TC11-18H110.1	Ratte	BD Biosciences
TNF- α	eFluor 450	MP6-XT22	Ratte	BD Biosciences
CD16/CD32	-	2.4G2	Ratte	BioXCell

(eBiosciences, San Diego, USA; BD Biosciences, Heidelberg; BioLegend, Fell; BioXCell, Lebanon, USA)

Tab. 4: Verwendete Antikörper für den IFN γ -ELISpot.

Spezifität	Konjugat	Klon	Ursprung	Quelle
Maus-IFN γ	-	R4-6A2	Ratte	Dr. Kaufmann, Berlin
Maus-IFN γ	Biotin	XMG1.2	Ratte	Dr. Kaufmann, Berlin
Maus-CD3e	-	145-2C11	Hamster	Dr. Kaufmann, Berlin

2.4 Peptid

Tab. 5: Verwendetes Peptid für den IFN γ -ELISpot.

Peptid	AS-Sequenz	Quelle
P15	KRAHGQDLGTLGSCL	JPT Peptide Technologies, Berlin
P71	STVKAGDLEKIISRC	JPT Peptide Technologies, Berlin

2.5 Puffer

Die folgenden Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Bei sterilen Bedingungen wurden die Puffer sterilfiltriert (\varnothing 0,22 μm).

Standardpuffer

PBS (phosphate buffered saline) 2,67 mM Kaliumchlorid
 1,47 mM Kaliumdihydrogenphosphat
 138 mM Natriumchlorid
 8 mM Dinatriumhydrogenphosphat
 pH \sim 7,2

Albumin-ELISA

Beschichtungspuffer: 0,05 M Carbonat-Bicarbonatpuffer
 pH \sim 9,6

Waschpuffer: 50 mM TBS
 0,05% (v/v) Tween 20
 pH 8 mit rauchender HCl eingestellt

Blockierungspuffer: 50 mM TBS
 1% (w/v) BSA
 pH 8 mit rauchender HCl eingestellt

Probenverdünnungspuffer: 50 mM TBS
 0,5% (w/v) BSA
 0,025% (v/v) Tween 20
 pH 8 mit rauchender HCl eingestellt

α 3(IV)NC1-ELISA

Beschichtungspuffer: 0,1 M Natriumhydrogencarbonat
 pH 8,2 mit rauchender HCl eingestellt

Waschpuffer: PBS
 0,05% (v/v) Tween 20

Blockierungspuffer: PBS
 1% (w/v) BSA

Leukozytenisolierung

Erythrozytenlysepuffer: 155 mM Ammoniumchlorid
 10 mM Kaliumhydrogencarbonat
 100 μM EDTA
 pH \sim 7,2

Antikörperfärbung für durchflusszytometrische Analysen

Saponinpuffer: PBS
0,1% BSA
0,3% Saponin

IFN γ -ELISpot

Beschichtungspuffer: 0,05 M Carbonatpuffer:
0,53 g Natriumcarbonat
0,42 g Natriumhydrogencarbonat
auf 100 ml H₂O
pH ~9,6
Lösung steril filtriert (\varnothing 0,22 μ m)

Blockierungspuffer: PBS
1% (w/v) BSA
Lösung steril filtriert (\varnothing 0,22 μ m)

Waschpuffer: PBS
0,05% (v/v) Tween 20

Konjugatpuffer: PBS
0,1% (w/v) BSA
0,05% (v/v) Tween 20

Substratlösung: 1 Tablette BCIP/NBT
auf 5 ml H₂O

Histologie und Immunhistochemie

Sörensen-Phosphat-Puffer: 3 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
14,1 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
auf 1 l H₂O
pH ~7,4

4% Formalinlösung: 40 ml Sörensen-Phosphat-Puffer
5 ml 37% Formalin

anti-Flag M2-Affinitätschromatographie

Äquilibrierungspuffer: 50 mM Tris
150 mM Natriumchlorid
pH 7,4 mit rauchender HCl eingestellt

Elutionspuffer: 0,1 M Glycin
pH 3,5 mit rauchender HCl eingestellt

Neutralisierungspuffer: 1 M Tris
pH 8 mit rauchender HCl eingestellt

Dialysepuffer: 50 mM Tris
pH 7,4 mit rauchender HCl eingestellt

Lagerungspuffer: Äquilibrierungspuffer
0,02% (w/v) Natriumazid

Protein G-Affinitätschromatographie

Elutionspuffer: 0,1 M Glycin
pH 2,7 mit rauchender HCl eingestellt

Neutralisierungspuffer: 1 M Tris
pH 9 mit rauchender HCl eingestellt

2.6 Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien wurden nach dem Ansetzen sterilfiltriert (\varnothing 0,22 μ m). Fötale Kälberserum (FKS) und IgG-armes FKS wurden vor dem Einsatz zur Inaktivierung von Komplementfaktoren bei 56 °C für 30 min erhitzt. Vor Gebrauch der Medien wurden diese auf 37 °C erwärmt.

Adhärente Zellen

RPMI-Komplettmedium: RPMI 1640 (500 ml)
5% (v/v) FKS
2 mM L-Glutamin
50 μ g/ml Gentamycin
50 μ M β -Mercaptoethanol

Regenerationsmedium: DMEM (500 ml)
10% FCS
50 Einheiten/ml Penicillin
50 μ g/ml Streptomycin

Selektionsmedium: DMEM (500 ml)
10% FCS
50 Einheiten/ml Penicillin
50 μ g/ml Streptomycin
1 μ g/ml Puromycin-Dihydrochlorid

Suspensionszellen

Hybridommedium: RPMI 1640 (500 ml)
5% (v/v) FKS
2 mM L-Glutamin
1 mM Natriumpyruvat
50 μ g/ml Gentamycin
50 μ M β -Mercaptoethanol

IgG-armes Medium:	RPMI 1640 (500 ml) 5% (v/v) IgG-armes FKS 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 50 µg/ml Gentamycin
--------------------------	---

2.7 Feinchemikalien und Reagenzien

Anti-Flag M2-Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol (1000× für Zellkultur)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium) Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	SERVA, Heidelberg
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diphtherietoxin (DTX)	Merck, Darmstadt
DMEM (+ Glucose, Natriumpyruvat)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
DNase I	Sigma-Aldrich, Steinheim
fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching, Österreich
Gentamycin (1000× für Zellkultur)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Glutamin (100× für Zellkultur)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
IgG-armes fötales Kälberserum	PAN-Biotech, Aidenbach
inkomplettes Freundesches Adjuvans (IFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ionomycin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Kollagenase D	Roche, Grenzach-Whylen, Schweiz
Kollagenase VIII	Sigma-Aldrich, Steinheim
komplettes Freundesches Adjuvans (KFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mausserum	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
Rattenserum	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
PBS (phosphate buffered saline) (Pulver)	Sigma-Aldrich, Steinheim
1× PBS (+ CaCl ₂ , MgCl ₂) (Lösung)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
1× PBS (ohne CaCl ₂ , MgCl ₂) (Lösung)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (für Zellkultur)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein G-Sepharose 4 Fast Flow	GE-Healthcare, Freiburg
Puromycin-Dihydrochlorid (für Zellkultur)	Sigma-Aldrich, Steinheim
RPMI 1640 (+ Glutamin)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptavidin-alkalische Phosphatase (AKP)	BD Biosciences, Heidelberg
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	KPL, Gaithersburg, USA
Trypsin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Urinteststreifen Multistix 10 SG	Siemens, Tarrytown, USA

Alle Standardchemikalien wurden von den Firmen Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.8 Kits

Circulating Immune Complexes (CIC) ELISA Kit	Alpha Diagnostic International, San Antonio, USA
Maus-Albumin-ELISA-Kit	Bethyl, Montgomery, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA

2.9 Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikwaren für Zellkulturarbeiten, ELISA, ELISpot- und FACS-Analysen wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), BD (Heidelberg), Falcon (Heidelberg), Greiner Bio-One (Frickenhäuser), Millipore (Billerica, USA), Nunc (Langenselbold) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.10 Geräte

BD FACS Canto II	BD, Heidelberg
Multilabel Counter 1420 Victor3™	PerkinElmer, Rodgau
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Jena

Bei allen weiteren für die Zellkultur und die Lymphozytenreinigung verwendeten Geräten handelt es sich um Standardlaborgeräte.

2.11 Software

Alle Abbildungen wurden mit Hilfe von CorelDRAW X3 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) erstellt. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Für die Berechnung und Auswertung der erhobenen Daten wurden die Programme Excel (Microsoft, Redwood USA) und GraphPad Prism 4.0 verwendet. Zur FACS-Analyse und -Auswertung diente die FACS Diva Software 6.1.3 (BD, Heidelberg). Die Punktdiagramme wurden mittels Inkscape 0.48.1-2 modifiziert.

3 Methoden

3.1 Induktion der EAG in DBA/1J-Mäusen

3.1.1 Haltungsbedingungen der Mäuse

Bis zu fünf Tiere wurden in individuell ventilierten Käfigen (IVC) gehalten. Die Haltung erfolgte in einem 12/12-Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Tiere wurden mit Standardnagerfutter und Leitungswasser versorgt.

3.1.2 Immunisierungsprotokoll

Für die Immunisierung wurden männliche Mäuse im Alter zwischen 8 und 12 Wochen verwendet. Das Immunisierungsprotokoll beruhte auf der Erstimmunisierung sowie drei Boosterimmunisierungen. Die dafür verwendeten Peptid-Adjuvans-Suspensionen sind im Folgenden aufgeführt:

Erstimmunisierung

Die Wasser-in-Öl-Emulsion der Erstimmunisierung bestand aus:

- 30 µg Human- oder Maus- α 3(IV)NC1-Peptid
- 20 µl PBS
- 50 µl komplettes Freundsches Adjuvans (KFA)

KFA enthält Mineralöl mit 1 mg/ml hitzeinaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis*, Stamm H37RA.

Boosterimmunisierung

Die Wasser-in-Öl-Emulsion der drei Boosterimmunisierungen bestand aus:

- 30 µg Human- oder Maus- α 3(IV)NC1-Peptid
- 20 µl PBS
- 50 µl inkomplettes Freundsches Adjuvans (IFA)

IFA enthält Mineralöl (ohne *M. tuberculosis*).

Durch Sonifizieren von einmal 10 sek und zweimal 5 sek wurde aus den Suspensionen eine cremige Emulsion hergestellt. Die Emulsion wurde stets gekühlt, um Denaturierungen der h- oder m- α 3(IV)NC1-Peptide zu verhindern. Bis zur Immunisierung wurde die Emulsion auf Eis gelagert und kurz vorher auf RT erwärmt. Den Mäusen wurde die Emulsion in einem Gesamtvolumen von 100 µl subcutan (s.c.) in den desinfizierten Rücken injiziert. Im Abstand von drei Wochen und dann jeweils von zwei Wochen erfolgten die Boosterimmunisierungen. Das Immunisierungsschema ist in Abbildung 4 dargestellt.

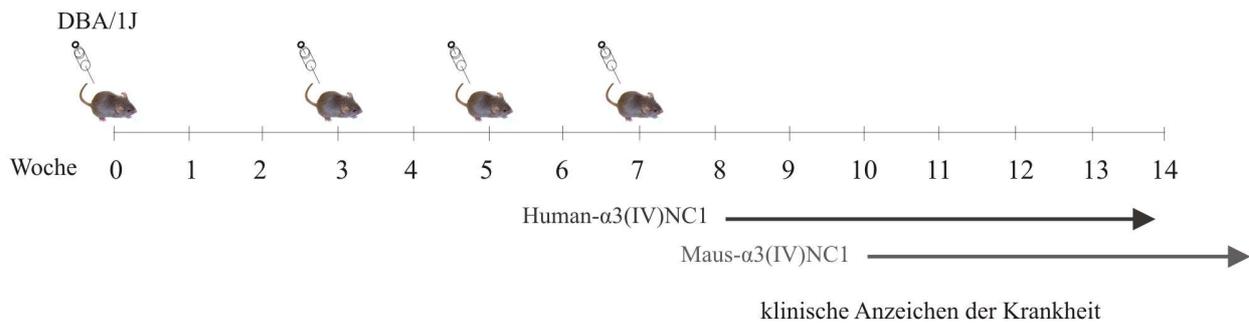


Abb: 4: EAG-Immunisierungsschema.

3.1.3 Klinische Symptome der EAG

Zur Verlaufskontrolle wurden die Mäuse zweimal pro Woche gewogen und ihr Allgemeinzustand untersucht. Im Abstand von zwei Wochen und ab Woche 7 in jeder Woche wurde der Proteingehalt des Urins mittels Urinteststreifen untersucht. Zeigten sich Auffälligkeiten im Allgemeinzustand oder eine deutliche Proteinurie (ab 300 mg/dl auf dem Urinteststreifen) wurden die Tiere drei- bis fünfmal pro Woche kontrolliert und gewogen, um schwer erkrankte Mäuse zu identifizieren. Schwer kranke Tiere zeigten ein struppiges ungepflegtes Äußeres, Verhaltensauffälligkeiten (Absonderung von den anderen Tieren, eingeschränkte Motorik) und eine rapide Gewichtszunahme von bis zu 30%. Die auffälligen Mäuse wurden getötet und ihr Blut gewonnen. Die Organe Milz, Niere und Lunge wurden nach Perfusion entnommen und für verschiedene Analysen konserviert (Histologie, Immunhistologie, mRNA-Expression) oder direkt untersucht (FACS, ELISpot). Für die Analyse von frühen Krankheitsstadien wurden unabhängig vom Gesundheitszustand Tiere in Woche 3, 5 und 7 getötet und die Gewebe konserviert oder direkt untersucht.

3.1.4 Sammlung von Plasma und Urin

3.1.4.1. Plasmagewinnung

Die Blutabnahme erfolgte submandibulär durch die Tierpfleger. Für die finale Blutabnahme wurden die Versuchstiere mit Isofluran leicht narkotisiert und das Blut retrobulbär gewonnen. Anschließend wurde das heparinisierte Blut für 5 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.1.4.2. Uringewinnung

Von den Mäusen wurde über einen Zeitraum von 6 - 8 h oder über Nacht der Urin gesammelt. Die Tiere wurden einzeln in Stoffwechselkäfige gesetzt, deren Boden aus einer 96-Näpf-Mikrotiterplatte bestand. Am Rand der Mikrotiterplatte wurde in vier Näpfe Leitungswasser hinzugegeben. Der Urin wurde aus den Näpfen in 2 ml Eppendorfgefäße gesammelt. Je 10 µl Urin wurden für die Urinteststreifen zur Bestimmung des Proteingehalts verwendet. Der Rest wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2 Antikörperinjektion: CD4-Depletion, IL-17A-Neutralisierung

Der anti-CD4 monoklonale Antikörper (mAk; Klon: YTS 191) und der anti-IL-17A mAk (Klon: MM17F3) wurde in sterilem PBS in Aliquots bei -80°C gelagert und für die Injektion aufgetaut. Von beiden Antikörpern wurden den Mäusen jeweils $500\ \mu\text{g}$ in $300\ \mu\text{l}$ sterilem PBS intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Als Kontrollantikörper erhielten die Mäuse die gleiche Menge an gereinigtem Ratten- oder Maus-IgG. Für die Reinigung von Ratten- und Maus-IgG aus Ratten- bzw. Mausserum wurde das gleiche Reinigungsverfahren wie für die Hybridomüberstände verwendet (siehe hierzu Abschnitt 3.14.2).

3.3 Diphtherietoxin-Injektion

Diphtherietoxin wurde in sterilem PBS gelöst ($100\ \mu\text{g}/\text{ml}$) und bei -80°C gelagert. Zur Treg-Zelldepletion wurde den Mäusen $0,5\ \mu\text{g}$ Toxin in $300\ \mu\text{l}$ sterilem PBS i.p. verabreicht.

3.4 Analyse der Proteinurie

3.4.1 Albumin-ELISA

Während der EAG wurde der Proteingehalt der Tiere per Urineststreifen untersucht. Nach Beendigung des Experiments sollte der Proteingehalt mit dem Albumin-ELISA bestätigt werden. Die Identifizierung von Albumin aus dem Urin der Mäuse basiert auf einem Sandwich-ELISA. Hierbei werden 96-Napf-Mikrotiterplatten mit anti-Albumin-Antikörpern beschichtet, welche das Albumin aus dem Urin spezifisch erkennen. Nach Zugabe der Urinproben bindet Albumin an die anti-Albumin-Antikörper. Als nächstes wird ein HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelter Sekundäntikörper zugegeben, welcher ein anderes Epitop des Albuminmoleküls erkennt. Nach Zugabe der Substratlösung setzt das an den Sekundäntikörper gekoppelte Enzym das Substrat in ein farbiges Produkt um, dessen Farbintensität photometrisch bestimmt wird. Anhand einer Albuminstandardkurve wird die Konzentration des Albumins in den einzelnen Proben bestimmt.

Die Durchführung des ELISA erfolgte mit einem Maus-Albumin-ELISA-Kit.

Durchführung:

Die Mikrotiterplatten wurden pro Napf mit $100\ \mu\text{l}$ Ziege anti-Mausalbumin-Antikörper, welcher im Beschichtungspuffer auf $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit je $200\ \mu\text{l}$ /Napf Waschpuffer entfernt.

Noch freie Bindungsstellen wurden durch Zugabe von $200\ \mu\text{l}$ /Napf Blockierungspuffer I geblockt. Zur Blockierung wurden die Mikrotiterplatten für 30 min bei RT auf einen Schüttler gestellt. Anschließend wurden die Platten dreimal gespült.

Vor Durchführung des ELISA wurden die bei -80°C gelagerten Urinproben auf 4°C erwärmt und kurz durch Vortexen vermischt. Die Urinproben wurden abhängig vom Proteingehalt der Urineststreifenuntersuchung 1:1.000 (Spur/30 mg/dl), 1:20.000 ($100/300\ \text{mg}/\text{dl}$) oder 1:200.000 ($2000\ \text{mg}/\text{dl}$) im Probenverdünnungspuffer verdünnt. Als Standardkurve wurde Mausalbumin im gleichen Puffer in Konzentrationen von $1000\ \text{ng}/\text{ml}$ bis $15,62\ \text{ng}/\text{ml}$ verdünnt. Als Negativkontrolle diente der Probenverdünnungspuffer. Die verdünnten Urinproben und die Albuminstandardreihe wurden als Doppelbestimmung mit je $100\ \mu\text{l}$ /Napf für 1 h bei RT in den Platten inkubiert. Nach Inkubationsende wurden die Platten fünfmal gewaschen.

Zum Nachweis des gebundenen Albumins wurde ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Mausalbumin-Antikörper verwendet. Dieser wurde 1:50.000 im Blockierungspuffer verdünnt und 100 μ l/Napf wurden in die Mikrotiterplatten pipettiert. Die Inkubation wurde bei RT durchgeführt. Nach 1 h wurden nicht gebundene Antikörper durch fünfmaliges Waschen entfernt.

Es folgte die Zugabe von 100 μ l/Napf der TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Substratlösung. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 mol/l Schwefelsäure (100 μ l/Napf) gestoppt. Die colorimetrische Reaktion wurde am Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt und die Konzentration der einzelnen Proben über die Standardkurve berechnet. Lagen die Urinverdünnungen nicht im linearen Bereich der Albuminstandards, erfolgte ein zweiter ELISA mit höheren oder niedrigeren Urinverdünnungen.

3.4.2 Bestimmung des Kreatinins

Zur Bestimmung des Kreatinins im Mausurin wurden die Proben auf 4 °C erwärmt und kurz durch Vortexen vermischt. Die Bestimmung erfolgte im Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie des UKE. Für die Bestimmung waren mindestens 200 μ l Urin erforderlich. Wenn nur wenig Mausurin zur Verfügung stand, wurde dieser mit Wasser (Aqua ad iniectabilia) verdünnt, um ein Gesamtvolumen von 200 μ l zu erhalten.

Als Maß für die Stärke der Proteinurie wurde der Quotient aus Albumin [mg/l] und Kreatinin [mg/l] berechnet.

3.5 Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN)

Zur Bestimmung des Blut-Harnstoff-Stickstoff-Gehalts im Blutplasma der Mäuse wurden die Proben auf 4 °C erwärmt und kurz durch Vortexen vermischt. Die Bestimmung erfolgte im Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie des UKE. Für die Bestimmung waren mindestens 200 μ l Plasma erforderlich. Wenn nur wenig Plasma zur Verfügung stand, wurde dieses mit Wasser (Aqua ad iniectabilia) verdünnt, um ein Gesamtvolumen von 200 μ l zu erhalten. Der BUN (blood urea nitrogen)-Wert wurde in mg/dl angegeben.

3.6 Analyse der Antikörperantwort gegen Human- oder Maus- α 3(IV)NC1

Die Identifizierung von α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern im Blutplasma der Mäuse basiert auf einem indirekten ELISA. Hierbei werden 96-Napf-Mikrotiterplatten mit α 3(IV)NC1-Peptid beschichtet. Nach Zugabe des Blutplasmas binden spezifische Antikörper an α 3(IV)NC1-Peptide. Als nächstes wird ein HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelter Sekundäntikörper gegen Maus-Immunglobulin zugegeben. Die Bindung des an den Sekundäntikörper gekoppelten Enzyms wird über die Bildung eines farbigen Produkts photometrisch bestimmt.

Durchführung:

Die Mikrotiterplatten wurden pro Napf mit 100 μ l h- oder m- α 3(IV)NC1-Peptid, welches im Beschichtungspuffer auf 1,4 μ g/ml verdünnt wurde, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die nicht gebundenen Peptide wurden durch dreimaliges Waschen mit je 200 μ l/Napf Waschpuffer entfernt.

Noch freie Bindungsstellen wurden durch Zugabe von 200 µl/Napf Blockierungspuffer geblockt. Zur Blockierung wurden die Mikrotiterplatten für 2 h bei RT auf einen Schüttler gestellt. Anschließend wurden die Platten dreimal gespült.

Vor Durchführung des ELISA wurden die bei -80 °C gelagerten Plasmaproben auf 4 °C erwärmt und kurz durch Vortexen vermischt. Die Plasmaproben wurden 1:5.000 im Blockierungspuffer verdünnt. Zusätzlich wurden drei Kontrollen mitgeführt. Die erste Positivkontrolle, Maus anti-Flag M2-Antikörper, wurde 1:100 im Blockierungspuffer verdünnt. Die zweite Positivkontrolle, Blutplasma, welches aus einem vorherigen Versuch die höchste Extinktion zeigte, wurde 1:5.000 im Blockierungspuffer verdünnt. Als Negativkontrolle diente der Blockierungspuffer. Alle Proben wurden als Doppelbestimmung mit je 100 µl/Napf für 2 h bei RT in den Platten inkubiert. Nach Inkubationsende wurden die Platten viermal gewaschen.

Zum Nachweis des gebundenen Antikörpers wurde ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper verwendet. Dieser wurde 1:1.000 im Blockierungspuffer verdünnt und 100 µl/Napf wurden in die Mikrotiterplatten pipettiert. Die Inkubation wurde bei RT auf dem Schüttler durchgeführt. Nach 1 ½ h wurden nicht gebundene Antikörper durch viermaliges Waschen entfernt.

Es folgte die Zugabe von 100 µl/Napf der TMB-Substratlösung. Nach wenigen Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 mol/l Schwefelsäure (50 µl/Napf) gestoppt. Durch photometrische Bestimmung der colorimetrischen Reaktion bei einer Wellenlänge von 450 nm erfolgte die indirekte Bestimmung der Antikörper.

3.7 Analyse von zirkulierenden Immunkomplexen mittels C1q-ELISA

Die Identifizierung von zirkulierenden Immunkomplexen im Blutplasma der Mäuse basiert auf einem C1q-ELISA. Hierfür werden 96-Napf-Mikrotiterplatten mit der Komplementuntereinheit C1q beschichtet. C1q bindet IgM-, IgG- und IgA-Antikörper, die mit Antigenen zu größeren Komplexen verbunden sind. Freie Antikörper werden nicht gebunden. Nach Zugabe des Blutplasmas auf die Platte kann das gebundene C1q daher Immunkomplexe im Plasma binden. Die gebundenen Immunkomplexe werden dann mit einem Enzym-gekoppelten anti-Maus-Antikörper nachgewiesen.

Die Durchführung des ELISA erfolgte mit einem Maus Circulating Immune Complexes (CIC) ELISA Kit. Alle verwendeten Materialien und Reagenzien wurden diesem Kit entnommen.

Durchführung:

Die C1q-beschichteten Mikrotiterplatten wurden auf RT erwärmt.

Vor Durchführung des ELISA wurden die bei -80 °C gelagerten Plasmaproben auf 4 °C erwärmt und kurz durch Vortexen vermischt. Die Proben wurden nach Angaben des Herstellers 1:100 im Probenverdünnungspuffer verdünnt. Zusätzlich wurden zwei im Kit enthaltene Kontrollen mitgeführt. Die Positiv- und Negativkontrolle wurden jeweils 1:10 im Probenverdünnungspuffer verdünnt. Alle Proben und Kontrollen wurden als Doppelbestimmung mit je 100 µl/Napf für 30 min bei RT in den Platten inkubiert. Nach Inkubationsende wurden die nicht gebundenen Plasmabestandteile durch viermaliges Waschen mit je 300 µl/Napf Waschpuffer entfernt.

Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter anti-Maus-Antikörper verwendet. Dieser wurde 1:100 im Probenverdünnungspuffer verdünnt und 100 µl/Napf wurden in die Mikrotiterplatten pipettiert. Die Inkubation wurde bei RT durchgeführt. Nach 30 min wurden nicht gebundene Antikörper durch fünfmaliges Waschen entfernt.

Die Messung der Enzymreaktion erfolgte wie in Abschnitt 3.6 beschrieben.

3.8 Leukozytengewinnung aus Organen der Maus zur FACS- und ELISpot-Analyse

Sowohl die Durchflusszytometrie als auch der ELISpot-Test beruhen auf der Analyse von Zellsuspensionen. Für die FACS-Analysen wurden Milz, Niere und Lunge unsteril entnommen. Von allen Organen wurden jeweils kleine Teile abgetrennt und für andere Analysen (z.B. die Histologie) konserviert. Für die ELISpot-Analyse erfolgte die Entnahme der Milz unter sterilen Bedingungen. Um sicher zu stellen, dass die isolierten Zellen nur aus dem Gewebe stammen, wurden beide Blutkreisläufe der Mäuse perfundiert, um das zirkulierende Blut aus den Geweben zu spülen.

Durchführung:

Die Mäuse wurden mit einer Gasmischung aus 80% CO₂ und 20% O₂ narkotisiert und mit reinem CO₂-Gas getötet. Für FACS-Untersuchungen wurde den Mäusen vor der Tötung retrobulbär ein möglichst großes Blutvolumen entnommen und dieses für weitere Analysen bei -80 °C gelagert. Das Mausfell wurde mit 70% Ethanol desinfiziert. Anschließend erfolgte der Fell- und Unterhautschnitt. Der Bauch- und Brustraum wurde geöffnet. Mit einer Flügelkanüle wurde in die linke und rechte Herzkammer langsam etwa je 25 ml PBS injiziert, bis die Farbe der Organe deutlich heller wurde. Die Nieren waren dann hellbraun bis gelblich und die Lunge hatte eine fast weiße Erscheinung. Nach dem Spülen wurden Milz, Niere und Lunge entnommen und vorsichtig die anhaftenden Reste der angrenzenden Gewebe, besonders die bronchialen Lymphknoten, welche sich unmittelbar in der Nähe der Lunge befinden, entfernt. Anschließend wurden die Organe in 5 ml gekühltem PBS aufgenommen und bis zur Aufreinigung auf Eis gelagert.

3.8.1 Aufreinigung von Leukozyten aus der Milz

Durchführung:

Die Milz wurde in PBS mit einem Spritzenstempel durch ein Metallsieb (\varnothing 200 μ m) gepresst, welches in einer Petrischale lag. Das Sieb wurde mit 10 ml PBS gespült und die gewonnene Zellsuspension für 5 min bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Entfernen der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 3 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 3 min bei RT inkubiert. Auf diese Weise wurden die Erythrozyten selektiv lysiert, wohingegen die anderen Zellen weitgehend unversehrt blieben. Zum Stoppen der Reaktion wurden 12 ml PBS mit 0,2% BSA dazugegeben. Die Zellsuspension wurde danach durch ein Zellsieb (\varnothing 70 μ m) filtriert und erneut für 5 min bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach erfolgreicher Erythrozytenlyse zeigte das Zellpellet eine gelbliche Farbe. Das Pellet wurde in 3 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl in der Zellsuspension bestimmt.

3.8.2 Aufreinigung von Leukozyten aus Nieren und Lunge

Durchführung:

Die Nieren und Lunge wurden mit PBS in einzelne Petrischale gegeben. Mit Hilfe einer Pinzette wurde die Kapsel der Niere abgezogen. Alle weiteren Schritte gelten für Niere und Lunge gleichermaßen. In einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden die Organe mit einer Schere zerstückelt. Danach wurden die Organbestandteile in eine 200 ml Schottflasche überführt, in die ein Rührfisch, 19 ml RPMI-Komplettmedium, 0,25 mg/ml Kollagenase D und 0,25 mg/ml Kollagenase VIII vorgelegt waren. Das Eppendorfgefäß und die Schere wurden mit RPMI-Komplettmedium abgespült und die aufgefangene Flüssigkeit in die Schottflasche überführt, um einen möglichst geringen Zellverlust zu erreichen. Zur Zellsuspension wurden

10 Einheiten/ml DNase I hinzu pipettiert und die Flaschen in ein Rührwasserbad gestellt. Nach 45 min bei 37°C wurde der Kollagenaseverdau beendet. Die Zellsuspension wurde durch ein Metallsieb (ø 200 µm) gegeben, um größere Gewebetrümmern und Zellklumpen abzutrennen. Die weitere Vorgehensweise gleicht der Beschreibung in Abschnitt 3.8.1.

3.9 Bestimmung der Zellzahl

Durchführung:

Die Ermittlung der Zellkonzentration einer Zellsuspension erfolgte mikroskopisch durch eine Neubauer-Zählkammer. Dafür wurde die Probe der Suspension 1:10 mit einer Trypanblaulösung verdünnt und in die Zählkammer pipettiert. Durch die Zugabe von Trypanblau können tote Zellen aufgrund der geschädigten Membran den Farbstoff aufnehmen und so von vitalen, hell-kugeligen Zellen unterschieden werden. Mit einem Lichtmikroskop wurde die Anzahl der lebenden Leukozyten in zwei Großquadraten (je 16 Kleinquadrate) ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Um die Lebendzellzahl pro Milliliter zu bestimmen, wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{Mittelwert beider Großquadrate} \cdot 10^4 \text{ (Kammerfaktor)} \cdot 10 \text{ (Verdünnung)}$$

Anschließend wurden die Zellzahlen auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

3.10 Charakterisierung von Zellen

3.10.1 Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting)

Die Durchflusszytometrie, auch fluorescence activated cell sorting (FACS) genannt, basiert auf der Detektion von fluoreszenzgefärbten Zellen. Diese werden aus der Zellsuspension durch eine Kapillare gesogen und passieren einzeln einen Laserstrahl. Trifft der Laserstrahl auf die Zelle, wird er gestreut und regt Fluorochrome an. Lichtdetektoren messen dann das Streulicht und die Fluoreszenz der Farbstoffe. Dabei korreliert die Menge des gestreuten Lichts mit der Größe und Granularität der Zelle. Mit dem Vorwärtsstreulicht des Lasers (forward scatter = FSC, geringe Lichtablenkung) kann eine Aussage über die Zellgröße gemacht werden. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC, große Lichtablenkung) gibt Auskunft über die Granularität der Zelle. Für die spätere Auswertung werden dann die Parameter FSC und SSC gegeneinander aufgetragen. Hierbei lassen sich Leukozytenpopulationen wie Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten aufgrund ihres individuellen Musters voneinander trennen, sowie Zelltrümmer von der weiteren Auswertung ausschließen. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert mit der Menge der gebundenen fluoreszenzgekoppelten Antikörper und dadurch auch mit der Menge der durch die Antikörper erkannten Moleküle. Durch die Verwendung verschiedener Fluorochrome können in einer Messung mehrere verschiedene Moleküle gemessen werden. Das für diese Arbeit verwendete Durchflusszytometer erlaubt z.B. die parallele Analyse von acht Fluorochromen zusätzlich zu FSC und SSC.

Jede Zelle besitzt aufgrund ihrer chemischen Eigenschaft eine leichte Autofluoreszenz. Weiterhin besitzen Fluorochrome z.T. ein relativ breites Emissionsspektrum, welches sich mit den Spektren anderer Fluorochrome überlappen. Aus diesem Grund werden vor jeder Messreihe ungefärbte Zellen zur Berechnung der Negativität und der Autofluoreszenz mitgeführt und jedes verwendete Fluorochrom einzeln gemessen. Falsch-positive Signale und

Signale, welche in fremde Kanäle strahlen, werden von den echten Signalen subtrahiert. Nach dieser Korrektur oder so genannten Kompensation kann die eigentliche FACS-Messung der zu analysierenden Zellpopulationen gestartet werden. Für die Untersuchung diente das FACS-Canto II. Während jeder Analyse wurden etwa $1 - 2 \times 10^6$ Milzzellen sowie alle Nieren- und Lungenzellen aufgezeichnet.

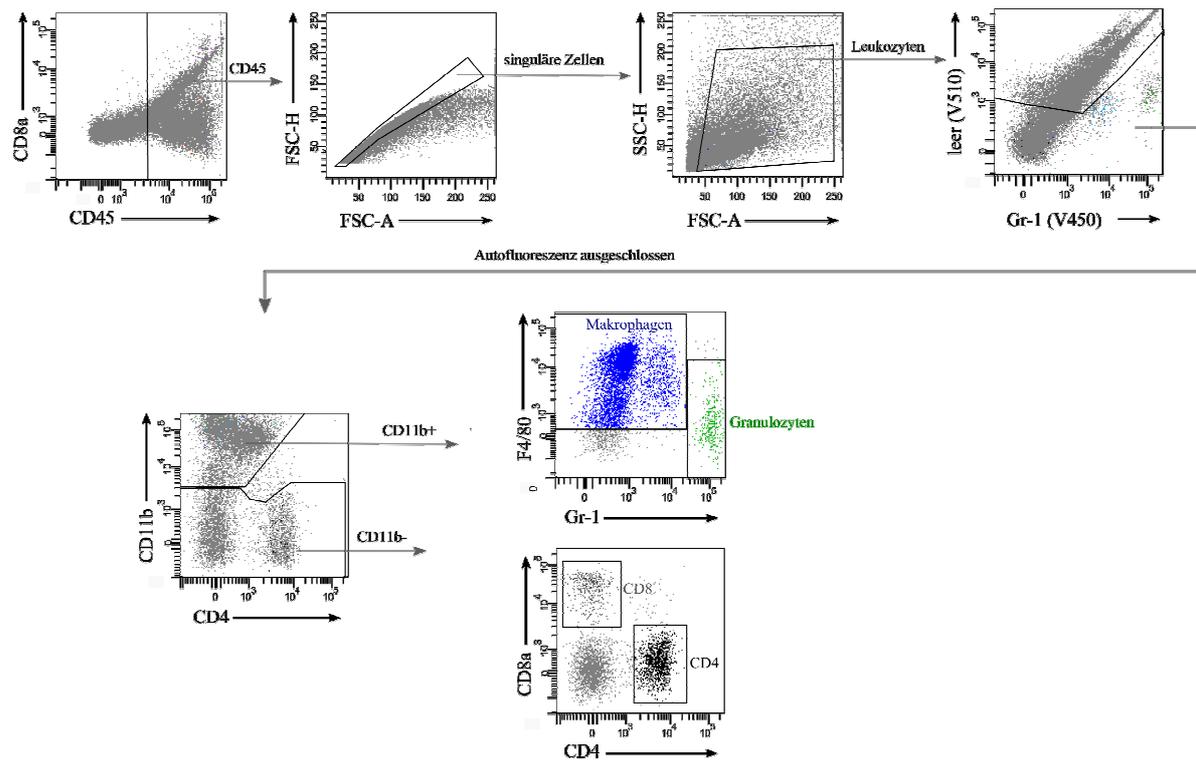
3.10.2 FACS-Daten: Darstellung und Auswertung

Durchführung:

Mit Hilfe der FACS Diva Software wurden die gemessenen FACS-Daten grafisch dargestellt und ausgewertet. Hierfür wurde die Darstellung des Punktdiagramms (Dot-Plot) gewählt. Vor der eigentlichen Auswertung wurden Zelldubletten aus der Auswertung genommen. Hierzu erfolgte die Darstellung FSC-H/FSC-A-Plot. Dabei steht das H (Height) für die Höhe und A (Area) für die Fläche des Signals. Bei einzelnen Zellen sollten sich die FSC-H und FSC-A linear zueinander verhalten, die Zellen ordnen sich dadurch auf einer Linie an und können somit ausgewählt werden. Weiterhin wurden CD45-positive Zellen dargestellt, um Leukozyten einzugrenzen. Als nächstes folgte eine Darstellung der Signale in einem SSC/FSC Diagramm, die eine Abtrennung von kleinen, toten Zellen und Erythrozyten erlaubte. Schließlich wurden noch Zellen mit einer starken Autofluoreszenz, überwiegend tote Zellen, ausgeschlossen. Deren Strahlung wurde in einem nicht Fluorochrom belegten Kanal separiert.

Mit der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Oberflächen- und intrazelluläre Zytokinmolekülen konnten nun Zellen identifiziert und ihr Zytokinprofil charakterisiert werden. In Abbildung 5 wird die Dot-Plot-Auswertung der Oberflächenfärbung sowie der intrazellulären Zytokinfärbung von Nierenzellen dargestellt.

A



B

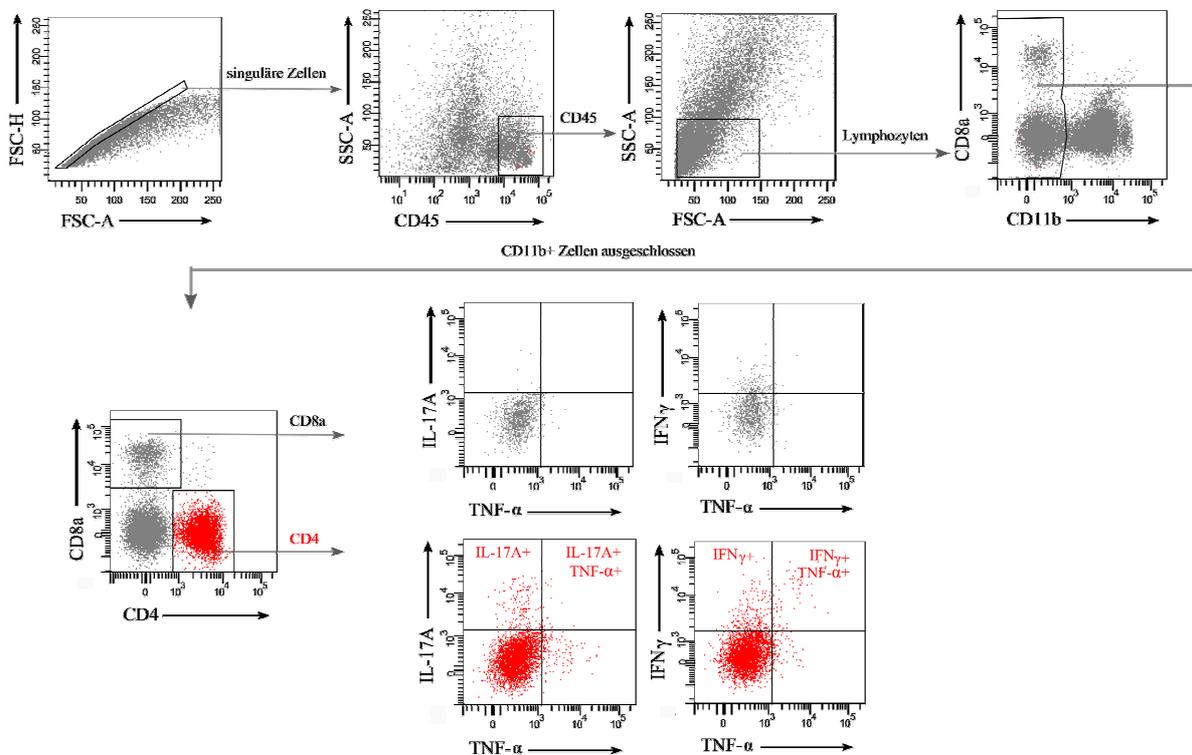


Abb. 5: Dot-Plot-Darstellung der FACS-Analyse. (A) Analysestrategie für Nierenzellen nach Anfärben von Oberflächenmolekülen durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper. (B) Analysestrategie von Nierenzellen nach intrazellulärer Anfärbung von Zytokinmolekülen mittels fluorochrommarkierter Antikörper.

3.10.3 Stimulation der T-Zellen zur Zytokinproduktion

Durchführung:

Die polyklonale Stimulation der T-Zellen zur Produktion von Zytokinen erfolgte in FACS-Röhrchen durch Zugabe von Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) und Ionomycin. PMA aktiviert die Proteinkinase C. Ionomycin ist ein Kalziumionophor. Beide Substanzen stimulieren T-Zellen, unabhängig von deren Rezeptorspezifität, wodurch alle T-Zellen aktiviert werden können. Für die Stimulation wurden $1 - 2 \times 10^6$ Zellen aus der Milz und alle gereinigten Zellen aus der Niere und Lunge verwendet. Die Stimulation erfolgte in 1 ml RPMI-Komplettmedium mit PMA (50 ng/ml Endkonzentration) und Ionomycin (1 μ M Endkonzentration). Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde der Suspension Brefeldin A in 50 μ l PBS zugegeben (10 μ g/ml Endkonzentration), um die Funktion des Golgi-Apparates zu unterbinden. Hierdurch werden normalerweise sezernierte Proteine nicht mehr aus der Zelle transportiert, sondern reichern sich innerhalb der Zelle an und können so mittels FACS-Analyse detektiert werden. Für weitere 3 ½ h wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert und dann mittels FACS-Färbungen analysiert.

3.10.4 Extrazelluläre Färbung von Oberflächenmolekülen

Durchführung:

Zur Färbung von spezifischen Oberflächenmolekülen wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten monoklonalen Antikörpern gefärbt. Dafür wurden $1 - 2 \times 10^6$ Milzzellen und alle Zellen von Niere und Lunge in einem Volumen von etwa 100 μ l eingesetzt. Zuerst wurde pro Zellansatz eine Lösung zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen von 1 μ l Rattenserum, 0,5 μ l F_c-Rezeptor-Block (anti-CD16/CD32-Antikörper) in 20 μ l PBS zugegeben und die Zellsuspension für 5 min bei RT inkubiert. Da die Mehrheit der fluoreszenzmarkierten Antikörper in Ratten hergestellt wurde, sollte das eingesetzte Rattenserum unspezifische Antikörperbindungen auf der Oberfläche von Zellen blockieren. Der F_c-Rezeptor-Block bindet spezifisch an F_c-Rezeptoren und verhindert damit die Bindung von Antikörpern am F_c-Teil. Danach wurde das Gemisch der fluorochrommarkierten Antikörper in einem Volumen von 20 μ l PBS zugeben. Die Konzentration der Antikörper wurde im Labor in Vorversuchen ermittelt und betrug zwischen 0,1 und 1 μ g pro Ansatz. Die Zellsuspension wurde durch Vortexen vermischt und für 15 min lichtgeschützt bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bis zur Analyse lichtgeschützt auf Eis gelagert.

3.10.5 Intrazelluläre Färbung von Zytokinmolekülen

Durchführung:

Nach Oberflächenfärbung und Waschen wurden die Zellen fixiert. Zur Fixation wurden pro Ansatz 200 μ l einer PFA-Lösung (2% Paraformaldehyd in PBS) gegeben. Die Zellsuspension wurde für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 0,2% BSA in PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 20 μ l einer Saponinlösung aufgenommen. Diese Lösung enthielt zur Blockade der unspezifischen Antikörperbindung 1 μ l Rattenserum und 0,5 μ l F_c-Rezeptor-Block. Saponin ist ein mildes Detergenz, welches die Zellmembran permeabilisiert und es Antikörpern ermöglicht, ins Zellinnere zu gelangen. Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden die gewünschten Antikörper in 20 μ l Saponinpuffer pro Ansatz verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 15 min lichtgeschützter Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und im FACS analysiert.

3.11 Analyse der spezifischen T-Zellantwort mittels IFN γ -ELISpot

Die Identifizierung von einzelnen $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen T-Zellen basiert auf dem äußerst sensitiven ELISpot-Test (enzyme-linked immuno spot). In den Versuchen wurden Milzzellen mit oder ohne Antigen kultiviert. Die in der Milz vorhandenen MHC-Klasse II positiven Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen oder B-Zellen) können das $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Peptid aufnehmen und CD4^+ T-Zellen im Kontext mit MHC-Klasse II präsentieren. Th1-T-Zellen mit dem passenden T-Zellrezeptor sezernieren nach Erkennung des Antigens IFN γ (Koch *et al.*, 2009). Im ELISpot-Test kann die IFN γ -Produktion durch eine Anfärbung im Plattenboden sichtbar gemacht werden, wobei jede IFN γ -produzierende Zelle einen Spot ergibt.

Für die Analyse werden 96-Napf-Filterplatten mit anti-IFN γ -Antikörpern beschichtet. In diesen Platten werden dann Zellen inkubiert und stimuliert. Bilden Zellen IFN γ , bindet dies an die anti-IFN γ -Antikörper. Nach Ende der Zellkultur wird die Platte gewaschen. Als nächstes wird ein biotinylierter anti-IFN γ -Antikörper zugegeben. Nach erneutem Waschen wird Streptavidin-alkalische Phosphatase (AKP) hinzugegeben, welches das Biotin erkennt. Nach einem weiteren Waschschrift wird die Phosphatase durch Zugabe einer Substratlösung nachgewiesen. Das entstehende Produkt bindet als tiefblauer Punkt (Spot) überall dort an die Platte, wo IFN γ -produzierende Zellen saßen.

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden bis zum Inkubationsende der Zellen nach drei Tagen unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die sterilen Filterplatten (0,45 μm , MultiScreen-HA Filter Plate MAHAS4510, Millipore) wurden pro Napf mit 100 μl einer Ratte-anti-Maus-IFN γ -Antikörper-Lösung (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Beschichtungspuffer) über Nacht bei 4 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Noch freie Bindungsstellen wurden durch Zugabe von 200 μl /Napf Blockierungspuffer bei 37 $^{\circ}\text{C}$ für mindestens 2 h geblockt. Anschließend wurden die Platten einmal mit PBS gespült.

Es wurden pro Napf 1×10^5 gereinigte Milzleukozyten dazugegeben. Als Antigene wurden das Maus- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Peptid in einer Endkonzentration von 54 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und das immundominante Peptid P71 in einer Endkonzentration von 3,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugegeben. Die Stimulationen wurden für jede Maus als Dreifachbestimmung durchgeführt. Zusätzlich wurden die folgenden Kontrollen mitgeführt. Als Positivkontrolle wurden Zellen polyklonal mit einem anti-CD3-Antikörper stimuliert, welcher auf 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt wurde. Als Negativkontrolle diente das jeweilige Medium, in dem die Zellen vorlagen. Als zweite Negativkontrolle diente in einigen Experimenten das irrelevante Peptid P15, welches ebenfalls in einer Endkonzentration von 3,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt wurde. Alle Kulturen erfolgten in 100 μl RPMI-Komplettmedium pro Napf. Nach 3 Tagen Inkubation wurden die Platten viermal mit PBS und dann viermal mit Waschpuffer gewaschen.

Zum Nachweis der sezernierten IFN γ -Zytokine wurde ein biotinylierter anti-IFN γ -Antikörper verwendet. Dieser wurde auf 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Konjugatpuffer verdünnt und 100 μl pro Napf wurden in die Filterplatten pipettiert. Die Inkubation wurde bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank durchgeführt. Nach 2 h wurden nicht gebundene Antikörper durch viermaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Zum Nachweis des Biotins wurde Streptavidin-AKP 1:1.000 im Konjugatpuffer verdünnt und 100 μl /Napf pipettiert. Ungebundenes Enzym wurde durch viermaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Es folgte die Zugabe von 50 μl /Napf BCIP/NBT-Substratlösung. Nach etwa 30 min wurde die Farbreaktion durch Ausklopfen der Substratlösung gestoppt. Nach dem Waschen der Platte mit Wasser wurde die Platte über Nacht getrocknet. Mit einer binokularen Prismenlupe wurden die IFN γ -Spots ausgezählt. Die IFN γ -Spots der Dreifachbestimmung wurden gemittelt und der Median errechnet. Die Zahl der IFN γ -Spots wurde in Spots/ 10^6 Zellen angegeben.

3.12 Histologie und Immunhistochemie

In dieser Arbeit wurden die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen von dem Pathologen Dr. H. Hopfer (Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel) durchgeführt. Hierbei wurde ein Teil der Nieren und Lunge unmittelbar nach der Organentnahme in 4% Formalinlösung für 24 h bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde das Gewebe dreimal für ca. 3 h mit PBS gewaschen. Im Institut für Pathologie des UKE wurden die Organe von Frau M. Reczka in Paraffin eingebettet und im Anschluss verschickt. Die weitere Aufarbeitung und Färbung der Proben erfolgte im Institut für Pathologie des Universitätsspitals Basel.

3.13 Rekombinante Expression und Reinigung von Human- und Maus- $\alpha 3$ (IV)NC1-Peptid

3.13.1 Kultur von HEK293-EBNA-Zellen

Zur Produktion der beiden Peptide wurden stabil transfizierte HEK293-EBNA-Zellen verwendet. Die Zellen wurden von Dr. H. Hopfer zur Verfügung gestellt (Hopfer *et al.*, 2003). Zur Transfektion wurde ein modifiziertes pCEP-Pu Plasmid verwendet. Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus einer N-terminalen BM-40-Signalsequenz, einem Flag-Tag und dem h- oder m- $\alpha 3$ (IV)NC1-Peptid. Mit dem BM-40-Signalpeptid wird die Sekretion rekombinanter Proteine in das Zellkulturmedium gewährleistet. Der Flag-Tag erleichtert die Reinigung mittels Affinitätschromatographie und besteht aus acht Aminosäuren der Sequenz DYKDDDDK (Schuster *et al.*, 2000). Die h- oder m- $\alpha 3$ (IV)NC1-Domäne besteht aus der eigentlichen NC1-Domäne und zusätzlich aus den letzten zehn Aminosäuren des Kollagens Typ IV. Das Plasmid kodiert weiterhin für eine Puromycinresistenz zur Selektion von transfizierten Zellen.

HEK293-EBNA-Zellen sind adhärente HEK293-Zellen (human embryonic kidney cells 293), bei denen ein EBNA-1-Gen (Epstein-Barr nuclear antigen) stabil in das Genom integriert wurde. Dieses Gen erlaubt die episomale Replikation des pCEP-Pu Vektors.

Durchführung:

Zur Proteinproduktion wurden die Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank in eine T25-Zellkulturflasche mit Regenerationsmedium gegeben. Nach 24 - 48 h Regenerationszeit wurde die Selektion gestartet, um die Vermehrung nicht transfizierter Zellen zu unterdrücken. Das Regenerationsmedium wurde durch Selektionsmedium ersetzt, welches zusätzlich Puromycin-Dihydrochlorid enthielt. Sobald die T25-Zellkulturflasche konfluent bewachsen war, wurden die Zellen in eine T75-Zellkulturflasche überführt und in einer Verdünnung von 1:2 - 1:3 auf weitere acht Zellkulturflaschen vermehrt. Dafür wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um das FKS zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen durch eine fünfminütige Trypsinierung bei 37 °C abgelöst. Durch Zugabe von 5 - 10 ml Selektionsmedium, je nach Flaschenvolumen, wurde die Trypsinierungsreaktion gestoppt, die Zellen wurden bei 300 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die HEK293-EBNA-Zellen wurden in frischem Selektionsmedium resuspendiert und anschließend in einer Verdünnung von 1:2 - 1:3 auf 25 Zellkulturschalen (\varnothing 145 mm) expandiert. Sobald die Zellkulturschalen konfluent bewachsen waren, wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS mit CaCl₂ und MgCl₂ gespült. Dieser Schritt war wichtig, um alle Serumreste zu entfernen. Anschließend wurde in jede Zellkulturschale 20 ml FKS-freies Medium (DMEM ohne Zusätze) gegeben und die Schalen wurden zurück in den Brutschrank gestellt. Nach zwei Tagen wurde der Zellüberstand geerntet, in 50 ml Falcon Tubes überführt und bei 200 g

für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde steril in einem 500 ml-Behälter bei -80 °C gelagert. Zu den Zellen wurde erneut 20 ml DMEM gegeben und der Überstand nach weiteren 2 Tagen geerntet. Die Zellen vertrugen die Inkubation in FKS-freiem DMEM normalerweise dreimal. Danach erfolgte eine Passage in Selektionsmedium. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis ein Volumen von etwa 6 - 8 l an Überstand vorhanden war. Das Vorhandensein der Peptide im serumfreien Überstand wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung überprüft (Daten nicht gezeigt).

3.13.2 Reinigung der $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Peptide über anti-Flag M2-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung der $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Flag-Tag-Fusionsproteine aus HEK293-EBNA-Zellüberständen kam eine Flag-Tag-Affinitätssäule zum Einsatz. Hierfür wurde ein matrixgebundener monoklonaler anti-Flag M2-Antikörper verwendet (Hopp *et al.*, 1988).

Die Zellüberstände wurden bei 4 °C aufgetaut und alle folgenden Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt. Die Zellkulturüberstände wurden mittels Stericup Vakuum-Filtereinheit (\varnothing 0,22 μm , Millipore, Billerica, USA) sterilfiltriert, um letzte Zellreste zu entfernen.

Zur Reinigung wurde eine 20 ml Polypropylen-Plastiksäule inklusive Membran (Bio-Rad, München) verwendet und mit 2 ml anti-Flag M2-Agarose befüllt. Die Flag-Tag-Bindungskapazität betrug $> 0,6$ mg/ml. Die Säule wurde mit ca. 15 ml Äquilibriumspuffer gespült. Anschließend wurde die Agarose mit ca. 15 ml Elutionspuffer gewaschen. Bevor die Probe auf die Säule überführt wurde, fand ein erneuter Durchlauf mit ca. 25 ml Äquilibriumspuffer statt. Dann wurden 500 ml Kulturüberstand über die Säule gegeben und der Durchlauf aufgefangen. Die Säule wurde mit etwa 40 ml Äquilibriumspuffer gewaschen, um Reste des Zellkulturüberstandes auszuspülen. Die $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Peptide wurden anschließend mit 15 ml Elutionspuffer von der Säule gelöst. Das Eluat wurde in 10 Fraktionen von je 1 ml aufgefangen und jeweils mit 30 μl Neutralisierungspuffer versetzt. Die Proteinkonzentration des Eluats wurde im Photometer bei 280 nm Wellenlänge bestimmt. Proteinhaltige Fraktionen wurden anschließend vereinigt und in eine 0,5 - 3 oder 3 - 12 ml Dialysekassette (Slide-A-Lyzer, Thermo Scientific, Rockford, USA) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa überführt. Die Kassette wurde in ein Becherglas gehängt und für 3 Tage bei 4 °C gegen 2 l Dialysepuffer dialysiert. Der Dialysepuffer wurde in gleichen Zeitabständen dreimal gewechselt. Die Reinheit der dialysierten Eluate wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 6). Die Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

Zur Konzentrierung wurden alle Proben bei 4 °C aufgetaut, vereinigt und in Centricon-Konzentratoren (YM-10, Millipore, Billerica, USA) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa bei 2500 g und 4 °C auf die gewünschte Konzentration eingeengt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Test (Pierce) bestimmt, die Proben aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Die Säule wurde direkt nach der Elution mit 40 ml Äquilibriumspuffer gespült. Die Lagerung der Säule erfolgte bei 4 °C nach Zugabe von Lagerungspuffer.

Die Ausbeute aus einem Liter gesammelten Überstand betrug für beide Peptide etwa 0,3 bis 0,4 mg Protein.

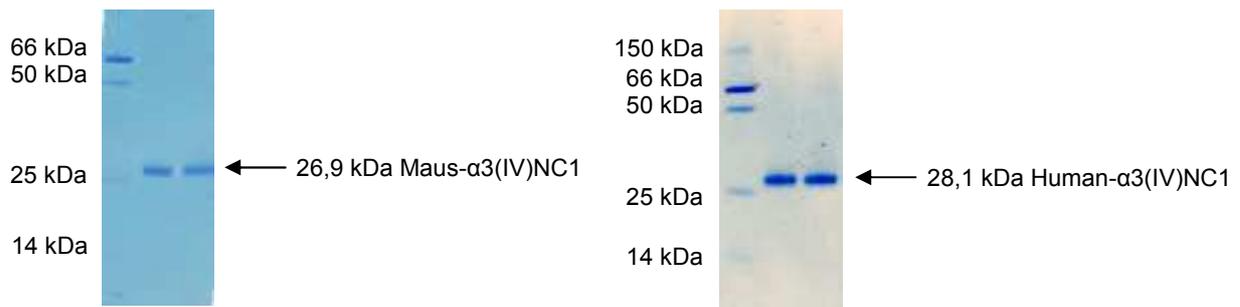


Abb. 6: Rekombinante Expression von m- und h- α 3(IV)NC1-Peptiden aus Kulturüberständen von HEK293-EBNA-Zellen. Die gereinigten α 3(IV)NC1-Peptide wurden als Doppelbestimmung in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Peptide wurden mittels Coomassiefärbung sichtbar gemacht.

3.14 Herstellung und Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Hybridom-Überständen

3.14.1 Kultur von Hybridomzellen

Durchführung:

Zur Antikörperproduktion wurden die Zellen aus flüssigem Stickstoff entnommen, unter dem laminaren Luftstrom der Sterilwerkbank aufgetaut und mit Hybridommedium gewaschen, um das Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen. Die Zellen im Pellet wurden in Hybridommedium resuspendiert und in T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank. Nach zwei Tagen wurden die Zellen langsam an IgG-armes Medium angepasst. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 - 90% erreicht hatten, wurden die Zellen in größere T75-Zellkulturflaschen und dann in T225-Flaschen überführt, so dass die Zellen schließlich in etwa 14 - 15 T225-Zellkulturflaschen mit je 150 ml IgG-armen Medium vorlagen (~ 2 l). Nach etwa einer Woche, sobald die Zellen anfangen zu sterben, wurden die Überstände geerntet. Die Überstände wurden für 10 min bei 1850 g zentrifugiert, dann steril filtriert (ϕ 0,22 μ m) und bis zur Aufreinigung bei 4 °C gelagert.

3.14.2 Reinigung von Antikörpern über Protein G-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung der monoklonalen Antikörper aus Hybridomzell-Überständen und Antikörper aus Ratten- und Mausserum kam eine Protein G-Affinitätssäule zum Einsatz. Protein G ist ein bakterielles Zellwandprotein aus *Streptokokken* mit einer hohen Affinität für den F_c-Teil von Immunglobulinen des IgG-Isotyps (Nilson *et al.*, 1986).

Vor der Reinigung wurde der Hybridom-Kulturüberstand von ca. 2 l auf 200 ml in einer Zentrifugenfereinheit (Centricon-Plus 70, Millipore, Billerica, USA) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa nach Herstellerangaben einkonzentriert. Das gefriergetrocknete Ratten- oder Mausserum (50 mg/ml Proteinkonzentration) wurde in 5 ml hochreinem Wasser (Aqua ad iniectabilia) aufgenommen.

Zur Reinigung wurde eine 20 ml Polypropylen-Plastiksäule inklusive Membran verwendet und mit 4 ml Protein G-Sepharose befüllt. Hierbei betrug die IgG-Bindungskapazität ca. 6 mg/ml. Vor dem Probenauftrag wurde das Säulenmaterial mit 10 ml hochreinem Wasser (Aqua ad iniectabilia) gespült. Danach wurde die Protein G-Säule mit 10 ml PBS äquilibriert. Es erfolgte der Probenauftrag und ein anschließendes Spülen mit 20 ml PBS, um nicht spezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Durch sukzessive Zugabe von 7 \times 4 ml

Elutionspuffer konnten die gebundenen Antikörper von der Säule gelöst werden und in sieben 15 ml-Röhrchen gesammelt werden. Die 15 ml-Röhrchen enthielten jeweils 400 µl Neutralisierungspuffer, so dass das Eluat direkt auf einen neutralen pH-Wert gebracht wurde. Hybridom-Überstände mit hohen Antikörperkonzentrationen wurden z.T. mehrmals über die Protein G-Säule gegeben, um eine möglichst vollständige Reinigung der Antikörper zu erreichen (z.T. 9 - 10 Durchläufe). Die einzelnen Fraktionen des Eluats wurden jeweils mittels SDS-Page auf das Vorhandensein von IgG überprüft. Im Anschluss wurden alle eluierten Fraktionen vereint und in Centricon-Konzentratoren (YM-10) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa für etwa je 4×10 min bei 2500 g und 4 °C in PBS umgepuffert. Diese Antikörperlösung wurde dann bei -80 °C gelagert. Um eine einheitliche IgG-Charge zu bekommen, wurden alle gereinigten Fraktionen eines Antikörpers aufgetaut, vereinigt und schließlich in Centricon-Konzentratoren auf ca. 5 ml eingengt. Die finale Antikörperkonzentration wurde mittels BCA-Test (Pierce) bestimmt, die Proben aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Die Säule wurde direkt nach der Elution mit weiteren 3 ml Elutionspuffer und 10 ml PBS gespült. Die Lagerung der Säule erfolgte bei 4 °C nach Zugabe von 20% Ethanol.

Die Ausbeute aus 2 l Kulturüberstand betrug 174 mg für den anti-CD4-Antikörper und 61 mg für den anti-IL-17A-Antikörper. Aus den kommerziell erworbenen Ratten- oder Mausseren wurden aus jeweils etwa 250 mg Gesamtprotein IgG-Ausbeuten von 30 bis 60 mg erzielt.

3.15 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte colorimetrisch mit dem BCA-Proteintest von Pierce nach Herstellerangaben.

3.16 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteingemischen entsprechend ihres Molekulargewichtes und zur Überprüfung von deren Reinheit. Hierfür wurde das NuPAGE Elektrophoresesystem (Novex/Invitrogen) verwendet, bestehend aus NuPAGE 12% Bis-Tris Gel, NuPAGE MES SDS Running Buffer 20X, NuPAGE LDS Sample Buffer, NuPAGE Reducing Agent.

Durchführung

Die zu untersuchenden Proben von jeweils 10 µl wurden mit 5 µl 4× Probenpuffer (LDS Sample Buffer), 5 µl deionisiertem Wasser und 2,5 µl 10× Reduktionsmittel (Reducing Agent) versetzt und zur vollständigen Denaturierung für 10 min auf 75°C erhitzt. Anschließend wurden die einzelnen Taschen des Gels mit den Proben beladen. In die erste Geltasche wurde ein Größenstandard pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 200 V für 37 min durchgeführt.

Die Visualisierung der Proteinauftrennung erfolgte durch eine Coomassiefärbung mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau. Hierbei wurde das Gel zweimal in ca. 100 ml deionisiertem Wasser und einmal in der Coomassielösung in der Mikrowelle aufgeköcht. Das Gel wurde ca. 20 min bei RT geschwenkt und anschließend mit deionisiertem Wasser und Zellstoff so lange entfärbt, bis die gewünschte Farbintensität erreicht wurde. Im Anschluss wurde das Gel zum Trocknen zwischen zwei Lagen feuchter Zellophanfolie in einen Rahmen eingespannt.

3.17 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism durchgeführt. Für die statistischen Vergleiche kamen folgende nichtparametrischen Tests zum Einsatz: der Log-Rank-Test, der Mann-Whitney-Test oder bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben der Kruskal-Wallis-Test. Die Daten wurden als Median oder selten als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Als signifikant unterschiedlich galt ein Ergebnis, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

3.18 Gemeinsame Durchführung von Experimenten

Aufgrund der sehr aufwendigen Versuchsansätze im Rahmen der Etablierung und Charakterisierung des EAG-Modells wurden die *in vivo* Experimente in Zusammenarbeit mit Frau Dipl.-Biochemikerin Stefanie Hünemörder durchgeführt. Die gemeinsamen Arbeiten umfassen die Versuchsplanung, die Immunisierung der Tiere, die Entnahme der Organe und die Reinigung von Zellen aus den Organen. Eigenständige Arbeiten sind die Analyse der Zellen und Gewebe, die Charakterisierung der verschiedenen Zellpopulationen sowie die Auswertung dieser Ergebnisse. Die Analyse der $\alpha 3(IV)NC1$ -spezifischen T-Zellantworten wurde komplett eigenständig durchgeführt.

4 Ergebnis

Die anti-glomeruläre-Basalmembran-Glomerulonephritis (anti-GBM-GN) ist eine selten auftretende Autoimmunerkrankung der Niere (Kluth & Rees, 1999). In den meisten Patienten mit anti-GBM-GN zeigt sich auch eine Beteiligung der Lunge. Die Erkrankung wird dann als Goodpasture (GP)-Syndrom bezeichnet (Goodpasture, 1919). Ein wichtiger Pathomechanismus der anti-GBM-GN ist die Bildung von Autoantikörpern gegen die Nicht-Kollagen-Domäne 1 (NC1) der α 3- und α 5-Kette von Kollagen Typ IV (α 3(IV)NC1 und α 5(IV)NC1) (Vanacore *et al.*, 2011). Es gibt aber auch Hinweise für die Beteiligung von T-Zellen an der Entstehung der Erkrankung (Tipping & Holdsworth, 2003). Die Bedeutung und Funktion dieser Zellen ist bisher unklar.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Mausmodell für die anti-GBM-GN in der Arbeitsgruppe etabliert werden. In diesem Modell der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis (EAG) (Hopfer *et al.*, 2003) sollten dann verschiedene Aspekte der Pathogenese und der Immunreaktion in der anti-GBM-GN untersucht werden.

4.1 Charakterisierung der EAG in DBA/1J-Mäusen

Das von Hopfer *et al.* beschriebene Modell der EAG beruht auf der Immunisierung von Mäusen des Inzuchtstamms DBA/1J mit humanem oder Maus- α 3(IV)NC1 (h- α 3(IV)NC1 bzw. m- α 3(IV)NC1). In diesem Modell entwickeln die Mäuse eine Entzündungsreaktion mit einem fortschreitenden Funktionsverlust der Niere. Im Gegensatz zu vielen anderen Modellen zeigt das EAG-Modell alle wichtigen Parameter der humanen anti-GBM-GN. Auch in der EAG können α 3(IV)NC1-spezifische Antikörper sowie α 3(IV)NC1-spezifische CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Im ersten Teil der Arbeit sollte das EAG-Modell etabliert werden und möglichst viele klinische und immunologische Parameter analysiert werden.

4.1.1 Induktion der EAG in DBA/1J-Mäusen

Zur Induktion der EAG wurden männliche DBA/1J-Mäuse mit 30 μ g rekombinantem h- α 3(IV)NC1 in komplettem Freundschens Adjuvans s.c. immunisiert. Die Boosterimmunisierungen mit 30 μ g h- α 3(IV)NC1 erfolgten in Woche 3, 5 und 7 s.c. in inkomplettem Freundschens Adjuvans. Unbehandelte DBA/1J-Mäuse dienten als Kontrollgruppe (Woche 0). Für die Charakterisierung der Erkrankung zu frühen Zeitpunkten wurden am Tag jeder Boosterimmunisierung je 5 Tiere getötet und analysiert. Tiere im Endstadium der Erkrankung wurden getötet und untersucht. Diese Tiere mit finaler Erkrankung werden in der Arbeit durchgehend als EAG-Tiere bezeichnet. Das Immunisierungs- und Analysenschema ist in Abbildung 7 gezeigt.

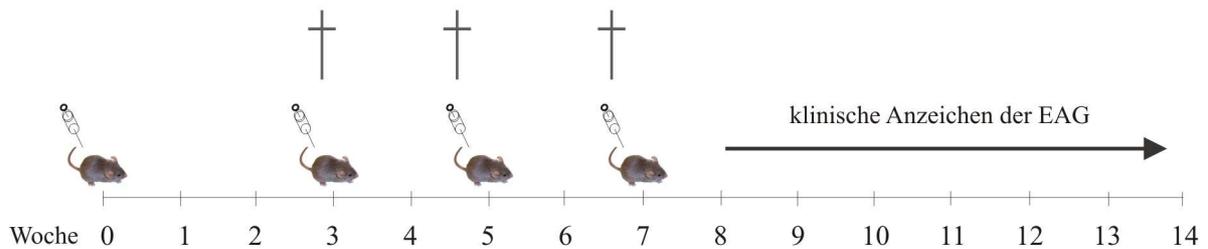


Abb. 7: Immunisierungs- und Analysenschema. Es wurden männliche DBA/1J-Mäuse mit 30 µg rekombinantes h- α 3(IV)NC1 in komplettem Freundschens Adjuvans s.c. immunisiert. Die Boosterimmunisierungen mit 30 µg h- α 3(IV)NC1 erfolgten in Woche 3, 5 und 7 s.c. in inkomplettem Freundschens Adjuvans. Unbehandelte Mäuse wurden als Kontrolle verwendet. In verschiedenen Intervallen wurde den Tieren Blut entnommen, ihr Urin gesammelt und das Gewicht der Tiere bestimmt. In Woche 3, 5 und 7 sowie zum Endzeitpunkt (EAG) wurden Tiere getötet. Diesen Tieren wurden Blut und die Organe Milz, Niere und Lunge entnommen und analysiert.

Die immunisierten Tiere wurden zunächst zweimal pro Woche kontrolliert und gewogen. Weiterhin wurde den Mäusen im Abstand von ein bis zwei Wochen Blut abgenommen und das Plasma zur anschließenden Bestimmung von Antikörpern und Harnstoff eingefroren. Im Abstand von zwei Wochen und ab Woche 7 in jeder Woche wurde Urin der Tiere gesammelt. Der Proteingehalt wurde mit Urinteststreifen bestimmt. Nach Beendigung des Experiments wurde der Proteingehalt mit einem Albumin-ELISA bestätigt. Die Albuminkonzentration wurde dann über die Kreatininkonzentration normalisiert (Album/Kreatinin-Ratio). Kreatinin ist ein Maß dafür, wie konzentriert der Urin vorliegt, da es kontinuierlich über die Niere ausgeschieden wird. Die maximale Detektionsgrenze des Tests lag bei 1000 g/g. Sobald eine deutliche Proteinurie vorlag (300 mg/dl auf dem Urinstreifen), wurden die Tiere drei- bis fünfmal pro Woche kontrolliert und gewogen, um schwer kranke Mäuse zu identifizieren. Schwer kranke Tiere zeigten ein struppiges ungepflegtes Äußeres, Verhaltensauffälligkeiten (Absonderung von den anderen Tieren, eingeschränkte Motorik) und eine rapide Gewichtszunahme. Auffällige Tiere wurden getötet und ihr Blut gesammelt. Milz, Niere und Lunge wurden nach Perfusion entnommen und für die verschiedenen Arten der Analyse konserviert (Histologie, Immunhistologie, mRNA-Expression) oder direkt untersucht (FACS). Für die Analyse von frühen Krankheitsstadien wurden unabhängig vom Gesundheitszustand Tiere in Woche 3, 5 und 7 getötet und die Gewebe konserviert oder direkt untersucht.

Abbildung 8 zeigt den typischen Krankheitsverlauf. Ab Woche 8 nach Immunisierung fanden sich erste Tiere mit schweren Krankheitssymptomen. In allen Experimenten entwickelten mehr als 95% der Tiere eine Erkrankung. Im Gegensatz dazu zeigten die Mäuse, welche nur mit dem Adjuvans behandelt wurden, keine Krankheitszeichen über den gesamten Beobachtungszeitraum (Abb. 8A). Die immunisierten Mäuse entwickelten bis zum Endzeitpunkt der EAG massive Ödeme, welche sich durch eine drastische Gewichtszunahme von 18 - 30% innerhalb von wenigen Tagen bemerkbar machten (Abb. 8B). In Abbildung 8C ist ein exemplarisches Beispiel für eine EAG-Maus im Vergleich zur gesunden Kontrollmaus gezeigt.

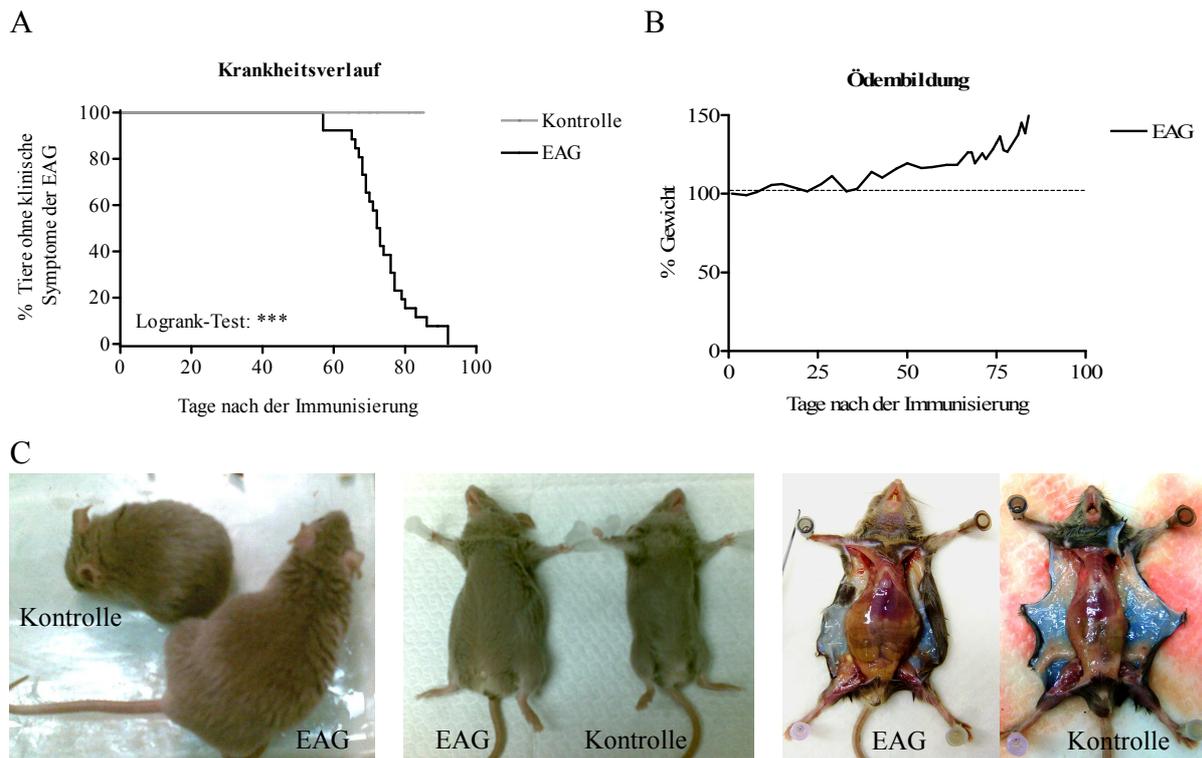


Abb. 8: Kinetik der Nierenerkrankung. (A) Dargestellt ist der Krankheitsverlauf in der EAG-Gruppe und der Kontrollgruppe. (B) Dargestellt ist der Gewichtsverlauf einer EAG-Maus während der gesamten Beobachtungsperiode. (C) Die Bilder zeigen exemplarisch Wassereinlagerungen im Bauchraum der EAG-Maus im Vergleich zu der Kontrollmaus ohne Anzeichen der Erkrankung. *** $P < 0,001$.

In allen immunisierten Tieren konnte ab Woche 6 bis 7 eine leichte Proteinurie nachgewiesen werden. Ab Woche 8 bis 9 hatten alle Tiere eine schwere Proteinurie und waren damit nephrotisch (Abb. 9A). Als weiteres Maß für die Nierenfunktion wurde der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Wert (BUN: blood urea nitrogen) im Plasma gemessen. Dabei wird der im Harnstoff enthaltene Stickstoff (Harnstoff besteht zu 46,6% aus Stickstoff) bestimmt. Bei gesunden Tieren wird der Harnstoff über die Niere ausgeschieden. Demgegenüber kommt es bei einem Nierenversagen zur Erhöhung des Harnstoffes im Blut und BUN-Werte über 50 mg/dl signalisieren schwere Nierenschäden. Im Gegensatz zu den Proteinwerten im Urin waren die BUN-Werte nur im Endstadium der Erkrankung erhöht. Dieser Anstieg war signifikant (** $P < 0,001$), wobei sich aber starke Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren zeigten (Abb. 9B).

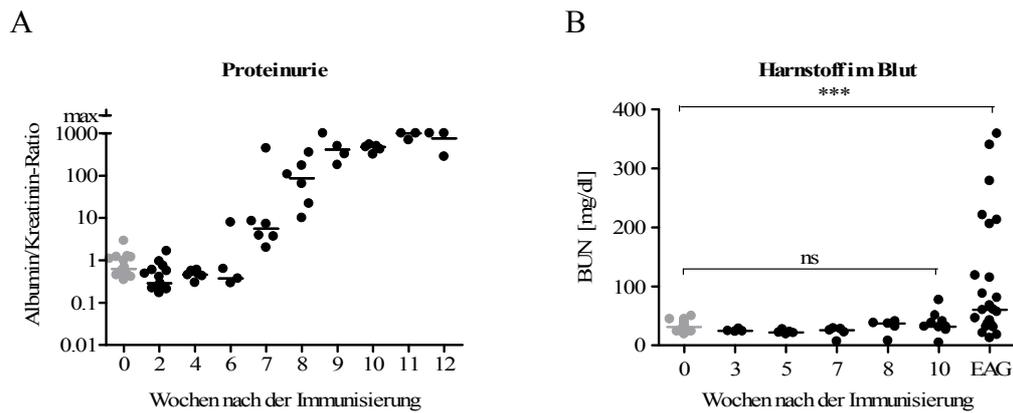


Abb. 9: Analyse der Nierenfunktion. (A) Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin mittels ELISA. Die Werte wurden gegen Kreatinin aus dem Urin normalisiert (maximale Detektion 1000g/g). (B) Der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Gehalt (BUN) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der EAG bestimmt. Die Punkte repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. ns: nicht signifikant; *** $P < 0,001$.

Die Nieren wurden als nächstes auf pathologische Veränderungen hin untersucht. Als Maß der Erkrankung wurden die Bildung von halbmondförmigen, mononukleären, glomerulären Infiltraten sowie die Schädigung des Tubulointerstitiums von einem Pathologen bestimmt (Abb. 10). Die Nieren zeigten bis Woche 8 keine auffälligen Veränderungen. In Woche 10 fanden sich in einzelnen Tieren glomeruläre Halbmonde (Abb. 10A + 10B) und erste tubulointerstitielle Schäden (Abb. 10C + 10D). Im EAG-Endstadium wiesen alle Tiere zum Teil schwerste tubulointerstitielle Schäden auf und in fast allen Tieren waren Halbmonde zu sehen. Insgesamt korrelierte die Nierenschädigung mit dem äußeren Erscheinungsbild der Mäuse, d.h. die Tiere, die in Woche 10 Halbmonde und tubulointerstitielle Schäden aufwiesen, zeigten auch beginnende äußere Zeichen einer Erkrankung.

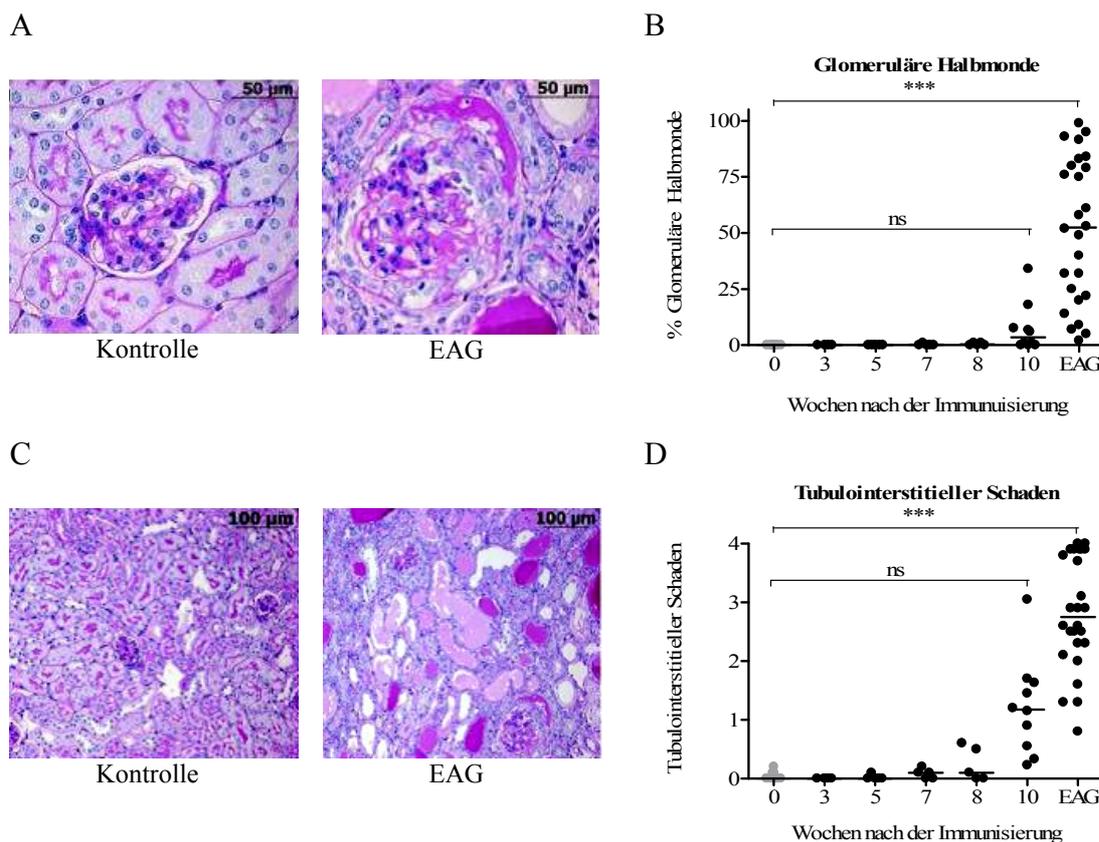


Abb. 10: Histologische Untersuchungen der Nieren in immunisierten Mäusen. (A, C) Die histologischen Bilder zeigen exemplarisch glomeruläre Halbmonde (A) und tubulointerstitielle Veränderungen (C) in Nieren der EAG-Mäusen sowie Kontrollen (PAS (periodic acid-schiff)-Färbung auf Nierenschnitten, 100fache Bildvergrößerung). (B) Dargestellt ist der Anteil der Glomeruli mit Halbmondbildung. (D) Der tubulointerstitielle Schaden wurde semiquantitativ bestimmt und mit 0 - 4 bewertet. In den Diagrammen repräsentieren die Punkte die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. ns: nicht signifikant; *** $P < 0,001$.

In Abbildung 11 ist eine lineare Regressionsanalyse der glomerulären Halbmondbildung gegen die EAG-Endzeitpunkte individueller Mäuse dargestellt. Die Analyse ergab keine signifikante Korrelation, das Ausmaß der Halbmondbildung war daher unabhängig vom Zeitpunkt der EAG-Entwicklung. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich auch in der Regressionsanalyse der tubulointerstitiellen Schädigung gegen den EAG-Endzeitpunkt (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass der Verlauf von der leichten Erkrankung bis zum akuten Nierenversagen wahrscheinlich kein kontinuierlich ansteigender Prozess ist. Vielmehr spricht das Ergebnis für einen über einen langen Zeitraum histologisch unauffälligen Verlauf und eine kurze finale Phase, in der sich die schwere Nierenschädigung ausbildet. Der Übergang in die finale Phase der Erkrankung zeigt hierbei eine starke zeitliche Streuung innerhalb der immunisierten Mäuse (Abb. 11).

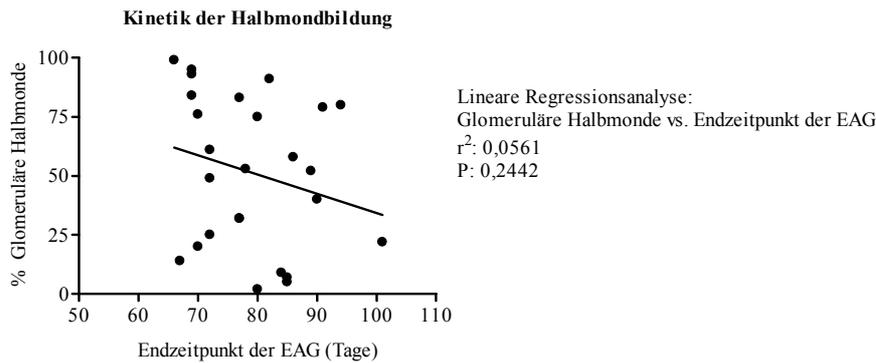


Abb. 11: Lineare Regressionsanalyse der glomerulären Halbmondbildung versus Endzeitpunkt der EAG. Die Punkte repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse.

4.1.2 Spezifische Antikörperantwort in EAG-Mäusen

In einer nächsten Serie von Untersuchungen wurde die spezifische Antikörperantwort charakterisiert. Antikörper gegen h- α 3(IV)NC1 konnten zum ersten Mal in Woche 2 nach Immunisierung im Plasma nachgewiesen werden und zeigten einen Anstieg bis Woche 4. Die Konzentration der h- α 3(IV)NC1-Antikörper fiel bis zum Endzeitpunkt der EAG langsam wieder ab (Abb. 12A). Ein möglicher Grund für den Rückgang der Antikörper im Plasma könnte ein Verlust durch die geschädigte Niere sein. Diese Abnahme konnte durch eine Analyse des Urins bestätigt werden. In einzelnen Tieren konnten nach 8 und 12 Wochen selbst in 20.000facher Verdünnung des Urins noch h- α 3(IV)NC1-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 12B). Das Plasma der mit h- α 3(IV)NC1 immunisierten Tiere wurde auch auf eine Reaktivität gegenüber Maus- α 3(IV)NC1 getestet (Abb. 12C). Ab Woche 3 und deutlich ab Woche 5 konnten m- α 3(IV)NC1-spezifische Autoantikörper gemessen werden.

Ein wichtiger Parameter der humanen anti-GBM-GN ist die lineare Ablagerung von IgG entlang der GBM. Um eine Ablagerung von Antikörpern zu untersuchen, wurden Nierenschnitte mittels Immunhistochemie auf eine IgG-Ablagerung hin untersucht. In Abbildung 12D ist die Färbung exemplarisch gezeigt. In Woche 3 konnte in einzelnen Tieren eine schwache Ablagerung und ab Woche 5 in der Mehrzahl der Tiere eine deutliche Ablagerung von IgG demonstriert werden. Ab Woche 8 wiesen alle untersuchten Tiere eine starke IgG-Deposition auf (Abb. 12E). Bei näherer Analyse zeigte sich in den Nieren sowohl eine lineare als auch eine granuläre Antikörperfärbung. Granuläre Antikörperfärbungen werden im Menschen bei Immunkomplexerkrankungen beobachtet. Um Immunkomplexe als Pathomechanismus in unserem EAG-Modell auszuschließen, wurde ein auf C1q-basierender Immunkomplex-ELISA durchgeführt (Abb. 12F). Zirkulierende Immunkomplexe konnten aber zu keinem Zeitpunkt im Plasma nachgewiesen werden. Schließlich wurden die IgG-Ablagerungen in der Niere noch auf ihren Isotyp hin analysiert (Abb. 12G). In gesunden Nieren war eine hohe Hintergrundfärbung sichtbar (Daten nicht gezeigt), die aber nicht auf die GBM beschränkt war. Im Gegensatz dazu wiesen die EAG-Nieren eine auf die GBM beschränkte Färbung auf. In diesen Färbungen konnte die Ablagerung von IgG1, IgG2a und IgG2b gezeigt werden, wobei IgG1 die stärkste Färbung aufwies.

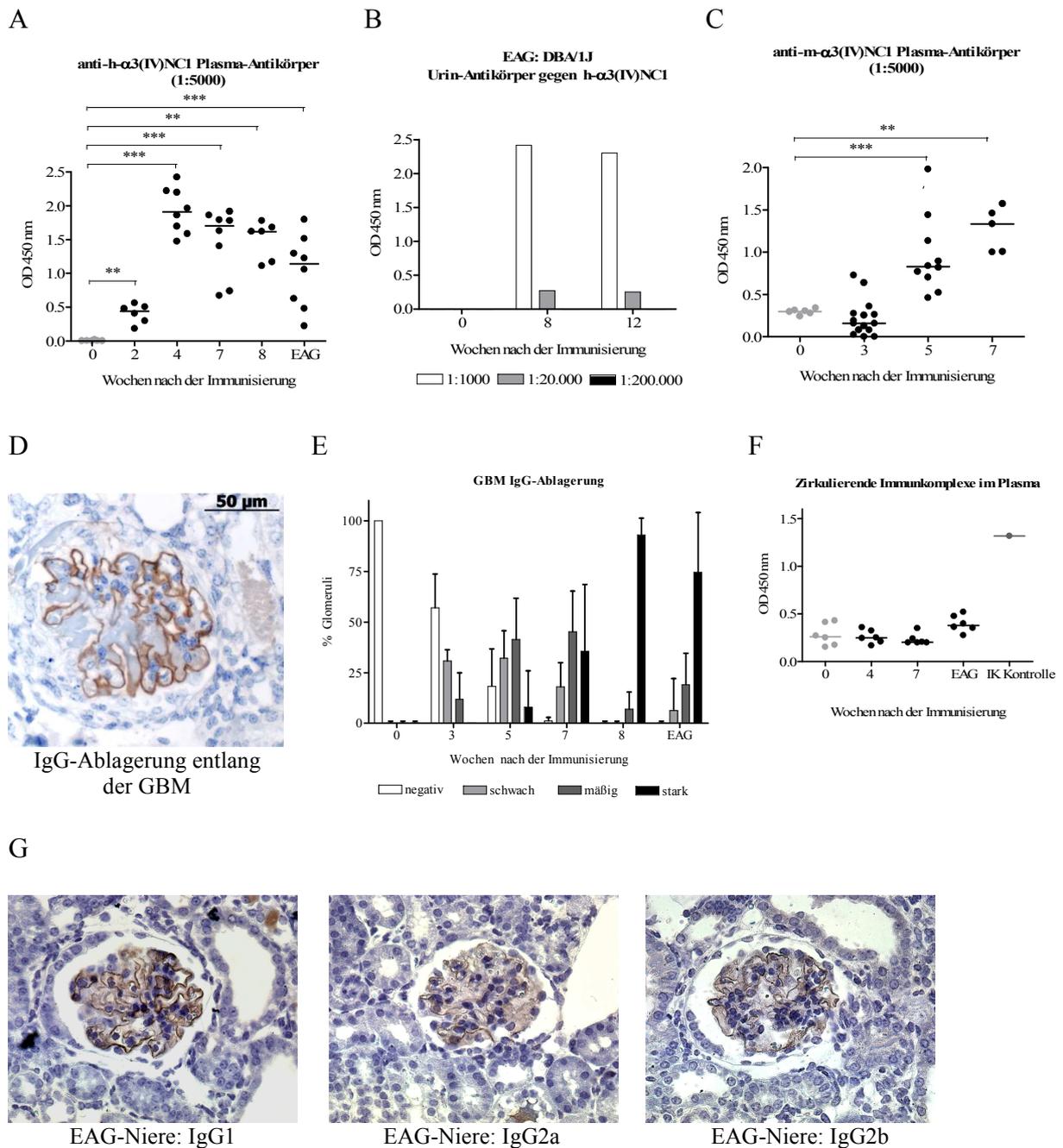


Abb. 12: Antikörperantwort in immunisierten Mäusen. (A) Indirekter ELISA gegen h- α 3(IV)NC1-spezifische Antikörper im Plasma. Dargestellt ist das Ergebnis von 14 Mäusen kombiniert aus zwei Experimenten. (B) Indirekter ELISA gegen h- α 3(IV)NC1-spezifische Antikörper im Urin. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis für eine Maus. (C) Mit h- α 3(IV)NC1 immunisierte Tiere wiesen eine Kreuzreaktivität gegenüber m- α 3(IV)NC1 auf. (D) Repräsentative Abbildung der IgG-Ablagerung entlang der GBM (Immunhistochemie auf Paraffinschnitten, 600fache Bildvergrößerung). (E) Zusammenfassung der Auswertung zu glomerulären IgG-Ablagerungen von Antikörpern entlang der GBM von EAG-Mäusen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD gezeigt. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Nieren von mindestens 5 Tieren ausgewertet. (F) Zirkulierende Immunkomplexe wurden mittels C1q-ELISA untersucht. Der ELISA detektierte IgM-, IgG- und IgA-Immunkomplexe. IK-Kontrolle: Immunkomplexkontrolle des Herstellers. (G) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Nierenschnitten für verschiedene IgG-Isotypen (400fache Bildvergrößerung). In den Diagrammen repräsentieren die Punkte die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. **P < 0,01; ***P < 0,001.

4.1.3 Renale Makrophageninfiltration in EAG-Mäusen

In Abbildung 13A konnte ein schwerer tubulointerstitieller Schaden gezeigt werden. Diese Schädigung war mit einer massiven zellulären Infiltration verbunden. Um die Art und Verteilung der infiltrierenden Zellen zu charakterisieren, wurden immunhistochemische und durchflusszytometrische Analysen der Mausnieren durchgeführt.

Der Antikörper gegen F4/80 erkennt ein Glycoprotein aus der Familie der Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren auf Makrophagen sowie DZ (Schaller *et al.*, 2002). Da die F4/80-Färbung in der Immunhistochemie häufig keine Abgrenzung einzelner Zellen erlaubt, wurde in den Nieren die F4/80 positive Fläche bestimmt. In gesunden Tieren fanden sich nur sehr wenige F4/80⁺ Zellen (< 1% der Fläche). Im Gegensatz dazu waren in EAG-Nieren etwa 5% der Fläche durch F4/80 angefärbt (**P < 0,001; Abb. 13B). Die Färbung konzentrierte sich außerhalb der Glomeruli im Interstitium.

Die durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse) erlaubt eine nähere Charakterisierung von Zellen anhand einer Kombination von Oberflächenmolekülen. Makrophagen wurden in der Analyse als CD45^{hoch} CD11b^{hoch} F4/80^{hoch} Gr-1^{niedrig/intermediär} Zellen und neutrophile Granulozyten als CD45^{hoch} CD11b^{hoch} F4/80^{niedrig} Gr-1^{hoch} Zellen definiert. CD45 ist eine Tyrosinphosphatase und befindet sich auf allen Leukozyten (Trowbridge & Thomas *et al.*, 1994; Pesnel *et al.*, 2012). Auf allen myeloiden Zellen wird das Integrin CD11b exprimiert (Han *et al.*, 2010). Der anti-Gr-1-Antikörper erkennt Ly-6C und Ly-6G aus der Ly-6 Gen-Familie. Ly-6C und Ly-6G finden sich auf Granulozyten. Ly-6C ist zudem auf DZ, Subpopulationen von Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten vorhanden (Daley *et al.*, 2008).

In Abbildung 13C ist die FACS-Analyse exemplarisch für aus Milz, Niere und Lunge gereinigte Zellen gezeigt. In dieser Graphik repräsentieren die Gr-1⁺ F4/80⁻ Zellen im unteren rechten Bereich die Granulozyten. Die F4/80⁺ Zellen setzen sich aus verschiedenen Makrophagenpopulationen zusammen. Eine Auswertung der Organe von mehreren Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung ist in Abbildung 13D zusammengefasst. Der Anteil der Makrophagen und der Granulozyten ist dabei einerseits im Verhältnis zu den Leukozyten (CD45⁺ Zellen) und andererseits im Verhältnis zu allen gemessenen Ereignissen (CD45⁺ und CD45⁻) dargestellt. In der Milz blieben die Werte der Makrophagen über den gesamten Analysenzeitraum auf konstant niedrigem Niveau (etwa 4% der CD45⁺ Zellen und 2% aller Zellen). Die Granulozyten zeigten ein ähnliches Bild (Daten nicht gezeigt). In gesunden Nieren waren 30 - 40% der Leukozyten Makrophagen. Dieser Wert stieg auf etwa 75% in EAG-Tieren (**P < 0,001). Bezogen auf alle Ereignisse ergaben sich Werte von 1 - 3% an Makrophagen in naiven und immunisierten Tieren bis Woche 7 und dann ein drastischer Anstieg auf ca. 15% (**P < 0,001). Die Granulozyten blieben im gesamten Zeitraum bei Werten unter 5% der CD45⁺ Nierenzellen und unter 1% aller Nierenzellen. In der Lunge blieben die %-Werte der Makrophagen und Granulozyten ähnlich wie in der Milz über den gesamten Zeitraum konstant.

Insgesamt bestätigte die FACS-Analyse der Makrophagen die Ergebnisse der Immunhistochemie. Die FACS-Analysen korrelierten weiterhin mit der Analyse der Nierenschädigung und der Halbmondbildung (Abb. 10). Parallel zu der geringen Schädigung über einen Zeitraum von 7 Wochen war auch kein Anstieg der Makrophagen in den Nieren mittels FACS-Analyse nachweisbar.

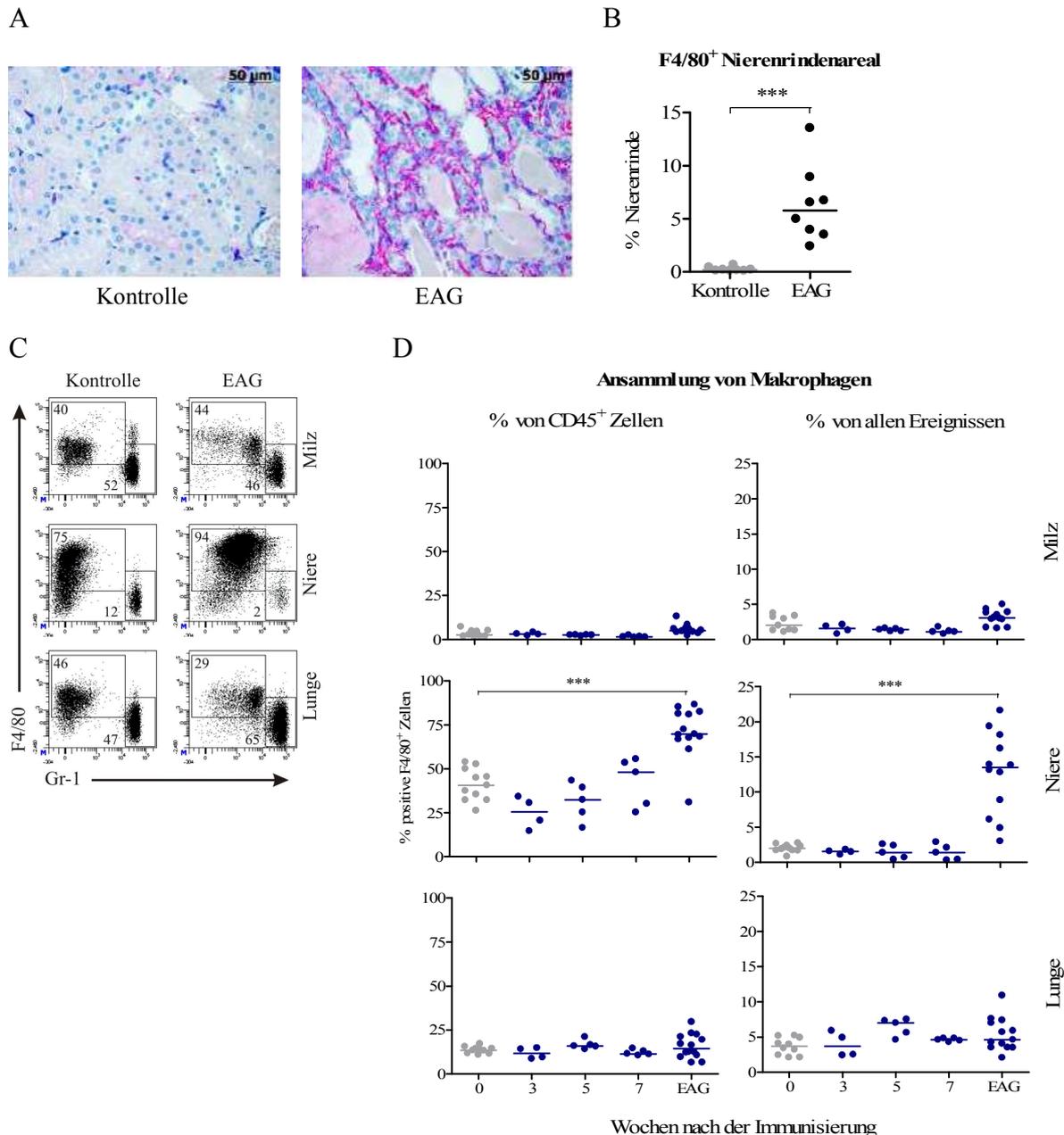


Abb. 13: Analyse von Makrophagen in Milz, Niere und Lunge immunisierter Mäuse. (A) Repräsentative F4/80-Färbung von Nieren einer gesunden und einer EAG-Maus (Immunhistochemie auf Paraffinschnitten, 400fache Bildvergrößerung). (B) Quantitative Auswertung der immunhistochemischen F4/80-Analyse. (C) Repräsentative FACS-Analyse von Zellen aus Milz, Niere und Lunge gesunder Tiere sowie aus EAG-Tieren. Die Abbildungen zeigen die Gr-1 und F4/80 Färbung für CD45⁺ CD11b⁺ Zellen individueller Mäuse. Zahlenwerte sind als Prozentangabe für Granulozyten (F4/80^{niedrig} Gr-1^{hoch}) und Makrophagen (F4/80^{hoch} Gr-1^{niedrig}) angegeben und beziehen sich auf die myeloiden Zellen (CD11b⁺ CD45⁺). (D) Dargestellt ist die Akkumulation von Makrophagen (CD11b⁺ F4/80⁺ Gr-1^{niedrig}) im Verhältnis zu den CD45⁺ Leukozyten und in Bezug auf alle im FACS analysierten Ereignisse. In den Diagrammen repräsentieren die Punkte die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. ***P < 0,001.

4.1.4 Renale T-Zellinfiltration in EAG-Mäusen

Im nächsten Schritt wurden T-Zellen mittels Immunhistochemie in der Niere im Interstitium und in den Glomeruli nachgewiesen. Hierbei wurden T-Zellen als CD3⁺ Zellen identifiziert. CD3 ist ein Proteinkomplex aus Polypeptidketten und Bestandteil des T-Zell-Rezeptors auf allen peripheren T-Zellen (Smith *et al.*, 1989).

In Abbildung 14A wird exemplarisch die immunhistochemische Färbung von CD3⁺ interstitiellen T-Zellen auf Nierenschnitten einer EAG- und einer Kontrollmaus gezeigt. Das Gesamtergebnis ist in Abbildung 14B und 14C dargestellt. Im Interstitium der EAG-Nieren wurde eine 4fach höhere CD3⁺ T-Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollnieren gefunden (**P < 0,001). In Woche 10 waren die Werte ebenfalls erhöht (**P < 0,001). In den Glomeruli fanden sich generell nur wenige CD3⁺ T-Zellen (5 - 10 pro 100 Glomeruli) und die Anzahl der T-Zellen blieb nach der Immunisierung konstant.

Auch die T-Zellen wurden mittels FACS-Analyse näher charakterisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 14D gezeigt. Im Vergleich zu den Makrophagen bildeten die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nur einen sehr kleinen Teil der CD45⁺ Zellen in der Niere. Die Frequenz der CD4⁺ T-Zellen blieb bis Woche 7 bei Werten von etwa 0,2% aller Ereignisse und stieg dann auf das 5fache in EAG-Tieren an (*P < 0,05). Die CD8⁺ T-Zell-Frequenz blieb während des gesamten Untersuchungszeitraumes niedrig.

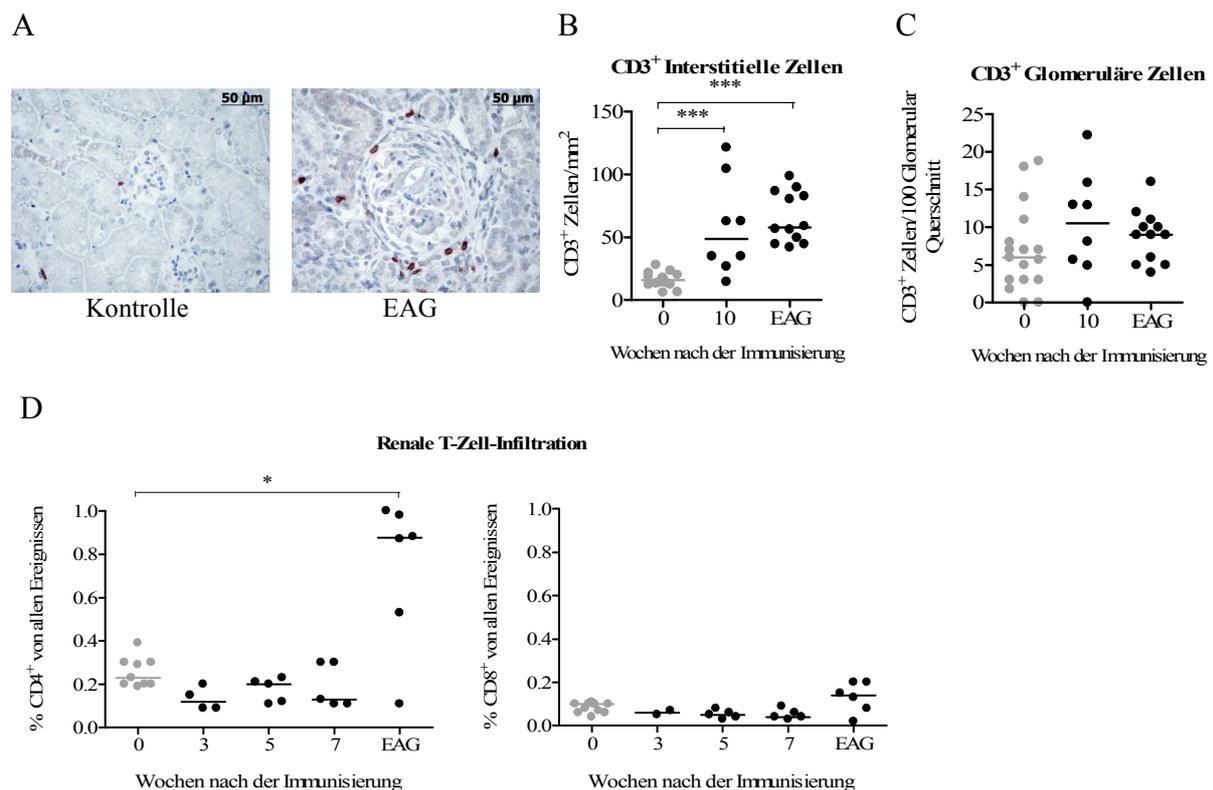


Abb. 14: Analyse von T-Zellen in Nieren immunisierter Mäuse. (A) Repräsentative Abbildung der immunhistochemischen Färbung von CD3⁺ interstitiellen T-Zellen auf Nierenschnitten einer EAG- und einer Kontrollmaus (400fache Bildvergrößerung). (B, C) Die T-Zellen wurden mittels immunhistochemischer Färbung quantifiziert. Dabei wurden die T-Zellen als CD3⁺ Zellen identifiziert und als Anzahl von CD3⁺ Zellen pro mm² Nierencortex oder pro 100 Glomeruli angegeben. (D) Mit der FACS-Analyse wurden renale CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen detektiert. Die Frequenz der CD4⁺ (linkes Diagramm) und CD8⁺ T-Zellen (rechtes Diagramm) ist als Prozentwert in Bezug auf alle im FACS analysierten Ereignisse angegeben. In den Diagrammen repräsentieren die Punkte die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. *P < 0,05; ***P < 0,001.

4.1.5 Phänotypische und funktionale Charakterisierung von renalen T-Zellen in EAG-Mäusen

Der Phänotyp und das Zytokinprofil lassen Aussagen zur Funktion von T-Zellen zu. Für die phänotypische Charakterisierung von CD4⁺ T-Zellen wurde die Oberflächenexpression von bestimmten Molekülen mittels FACS untersucht. T-Zellen wurden dabei in naive T-Zellen (CD44^{niedrig} CD62L⁺), zentrale T-Gedächtniszellen (CD44^{hoch} CD62L⁺), T-Effektorzellen oder T-Effektorgedächtniszellen (CD44^{hoch} CD62L⁻) unterteilt. In der naiven Milz und Lunge besaß der größte Teil der CD4⁺ T-Zellen einen naiven Phänotyp (CD44^{niedrig} CD62L⁺). In EAG-Tieren nahm dieser Anteil von etwa 70% auf etwa 55% ab. Im Gegensatz hierzu zeigten die CD4⁺ T-Zellen der Niere einen deutlich veränderten Phänotyp. Bereits in naiven Nieren hatte die Mehrzahl der CD4⁺ T-Zellen einen aktivierten Phänotyp und in EAG-Tieren waren etwa 90% der T-Zellen aktiviert (Abb. 15A). Der Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen im Blut entsprach zu allen Zeitpunkten dem Phänotyp der Milzzellen (Daten nicht gezeigt). Der Unterschied im Phänotyp zwischen CD4⁺ T-Zellen in Niere und Milz bzw. Blut ist auch ein wichtiger Hinweis dafür, dass die aus der Niere gereinigten Zellen keine größeren Verunreinigungen von Blutzellen enthielten.

Um das Zytokinprofil der T-Zelle zu analysieren, wurden die Zellen aus Milz, Niere und Lunge der immunisierten Mäuse isoliert und mit dem Phorbolster PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) und dem Kalziumionophor Ionomycin für 4 h inkubiert. Die Stimulation mit PMA und Ionomycin führt zu einer polyklonalen Stimulation und Zytokinproduktion der T-Zellen und erlaubt die Bestimmung des Zytokinprofils von individuellen T-Zellen. Die T-Zellen wurden weiterhin mit Brefeldin A inkubiert. Brefeldin A blockiert den Golgi-Apparat und verhindert die Sekretion von Zytokinen. Diese Zytokine können dann nach einer intrazellulären Antikörperfärbung im FACS gemessen werden. In den Experimenten wurde die Expression von IFN γ und IL-17A bestimmt. IFN γ ist ein Leitzytokin für Th1-Zellen und IL-17A ein Leitzytokin für Th17-Zellen. In Abbildung 15B sind die Ergebnisse der FACS-Analyse exemplarisch für eine Kontroll- und eine EAG-Maus als Punktdiagramme gezeigt. Das Ergebnis aller Mäuse eines Experiments ist in Abbildung 15C zusammengefasst. In Milz und Lunge der gesunden als auch der EAG-Mäuse war zu beobachten, dass sich die Frequenzen von IFN γ und IL-17A-produzierenden CD4⁺ T-Zellen während der gesamten Beobachtungsperiode annähernd konstant verhielten. Die Kontrollnieren wiesen nur geringe Frequenzen von IFN γ ⁺ Th1-Zellen auf, während die Nieren nach Immunisierung bis zum Endzeitpunkt der EAG einen Anstieg der Frequenz dieser Zellen zeigten (**P < 0,01). Im Gegensatz dazu blieb die Frequenz von IL-17A⁺ Th17-Zellen auf einem geringen Niveau und stieg nur zum Endzeitpunkt der EAG deutlich an (**P < 0,01).

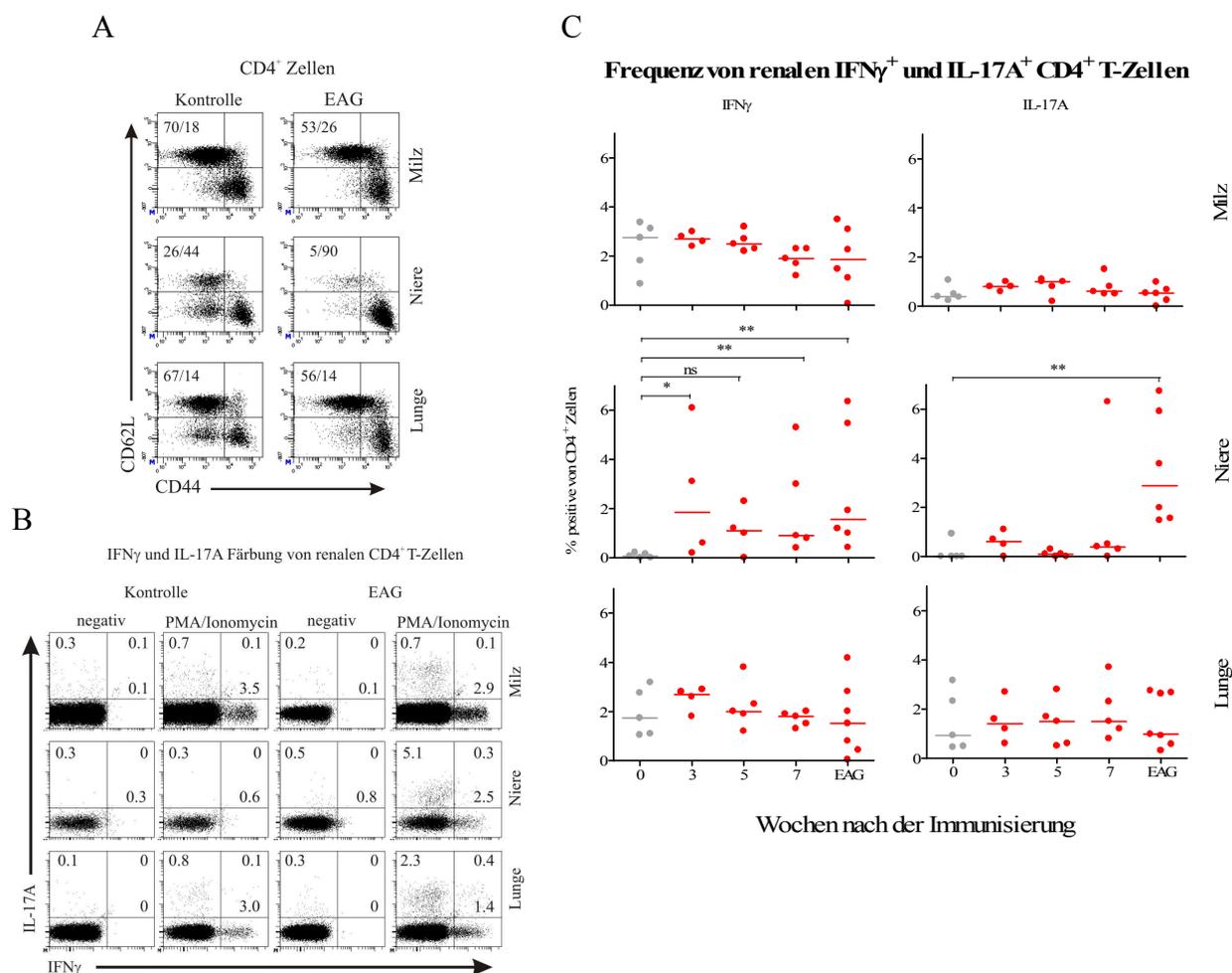


Abb. 15: Phänotypische und funktionale Analyse von renalen CD4⁺ T-Zellen in immunisierten Mäusen. (A) Analyse von CD4⁺ T-Zellen auf die Expression von CD44 und CD62L. Die Zahlen geben die Prozentwerte für naive T-Zellen (CD62L⁺ CD44^{niedrig}) und T-Effektorzellen bzw. T-Effektorgedächtniszellen (CD62L⁻ CD44^{hoch}) wieder. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis 4 - 6 individuell analysierter Tiere pro Zeitpunkt. (B) IFN γ - und IL-17A-Expression in CD4⁺ T-Zellen. Die Punktdiagramme zeigen repräsentativ die IFN γ - und IL-17A-Expression nach Inkubation ohne Stimulus bzw. nach PMA+Ionomycin-Stimulation für 4 h. Die Zahlen geben die Prozentwerte der Zytokin-positiven Zellen wieder. (C) Zusammenfassung der Zytokinanalyse von EAG- und Kontrollmäusen zu verschiedenen Zeitpunkten. Angegeben sind die Δ -Zytokinwerte, wofür die Prozentwerte der positiven Zellen ohne Stimulation von den Prozentwerten der positiven Zellen nach Stimulation subtrahiert wurden. In den Diagrammen repräsentieren die Punkte die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. ns: nicht signifikant; *P < 0,05; **P < 0,01.

Insgesamt weisen die Ergebnisse auf eine CD4⁺ T-Zellantwort in der Niere hin. In EAG-Tieren zeigen die renalen T-Zellen fast ausschließlich einen aktivierten Phänotyp und es finden sich erhöhte Frequenzen von Th1- und Th17-Zellen. Für die Th1-Zellen konnte ein kontinuierlicher Anstieg über den gesamten Versuchszeitraum beobachtet werden. Eine Akkumulation von Th17-Zellen war hingegen nur am Endzeitpunkt nachweisbar. Im Gegensatz zur Niere blieben Phänotyp und das Zytokinprofil der CD4⁺ T-Zellen in der Milz und Lunge über den gesamten Beobachtungszeitraum annähernd konstant.

4.2 Einfluss der CD4⁺ T-Zelldepletion auf die Immunantwort im EAG-Mausmodell

Unsere Ergebnisse zeigen eine Akkumulation von aktivierten CD4⁺ T-Zellen in EAG-Nieren und ein Teil dieser T-Zellen war in der Lage Th1 oder Th17-Zytokine zu produzieren. Um zu testen in welchem Umfang diese T-Zellen zur Nierenentzündung beitragen, wurden Depletionsexperimente mit einem anti-CD4 mAk durchgeführt. Aus der Literatur und Vorversuchen war bekannt, dass die Gabe des hier verwendeten anti-CD4-Antikörpers (Klon: YTS 191) zu einer sehr deutlichen Reduktion (> 90%) der CD4⁺ T-Zellen in Mäusen führt. CD4⁺ T-Zellen sind an der Entstehung der Antikörperantwort beteiligt, es besteht aber auch die Möglichkeit, dass diese Zellen direkt in das Entzündungsgeschehen der Niere involviert sind. Da der Fokus dieser Arbeit auf der T-Zellfunktion in der Niere lag, wurde ein Depletionsschema verwendet, mit dem diese CD4⁺ T-Zellen zu einem späten Zeitpunkt nach der Immunisierung entfernt wurden. Da dieses Schema eine normale Antikörperantwort erlaubt, sollten Veränderungen im Krankheitsverlauf Hinweise auf eine direkte Wirkung der CD4⁺ T-Zellen auf die Entzündung in der Niere geben.

Die Mäuse wurden wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben immunisiert und auf eine Entwicklung einer Proteinurie hin kontrolliert. Tiere mit einem Proteinwert von mindestens 300 mg/dl wurden zwei Gruppen zugeordnet. Tiere der einen Gruppe erhielten 500 µg des anti-CD4-Antikörpers, die Tiere der anderen Gruppe 500 µg von identisch aus Rattenserum gereinigten IgG. Die Gabe der Antikörper erfolgte i.p. und wurde alle 6 Tage wiederholt. Tiere, die Zeichen einer EAG entwickelten, wurden getötet und analysiert. In Abbildung 16 ist der Versuchsaufbau gezeigt.

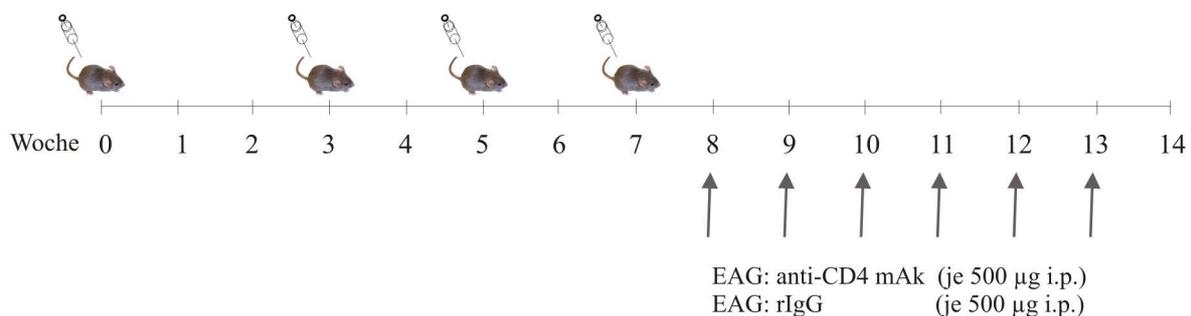


Abb. 16: EAG-Immunisierung und CD4-Depletierung. Für das Experiment wurden zwölf männliche DBA/1J-Mäuse mit 30 µg rekombinantem h- α 3(IV)NC1 in komplettem Freundschens Adjuvans s.c. immunisiert. Die Boosterimmunisierungen mit jeweils 30 µg h- α 3(IV)NC1 erfolgten in Woche 3, 5 und 7 s.c. in inkomplettem Freundschens Adjuvans. Sobald die Tiere im Urin einen Proteinwert von 300 mg/dl erreicht hatten, wurde mit der Depletion begonnen (4 + 4 Tiere in Woche 8 und 2 + 2 Tiere in Woche 9). Tiere der Depletionsgruppe erhielten jeden sechsten Tag 500 µg anti-CD4-Antikörper (YTS 191) i.p. injiziert. Tiere der Kontrollgruppe wurden zeitgleich mit 500 µg eines Kontrollantikörpers (gereinigtes Ratten-IgG, rIgG) i.p. behandelt. Alle Tiere wurden bis zum Auftreten von Zeichen der EAG mit dem anti-CD4 mAk oder rIgG behandelt und dann getötet. Anschließend wurden das Blut der Tiere und deren Organe Milz, Niere und Lunge analysiert.

In Abbildung 17 ist der Krankheitsverlauf in beiden Mausgruppen dargestellt. Beide Gruppen zeigten einen ähnlichen Verlauf ($P = 0,81$).

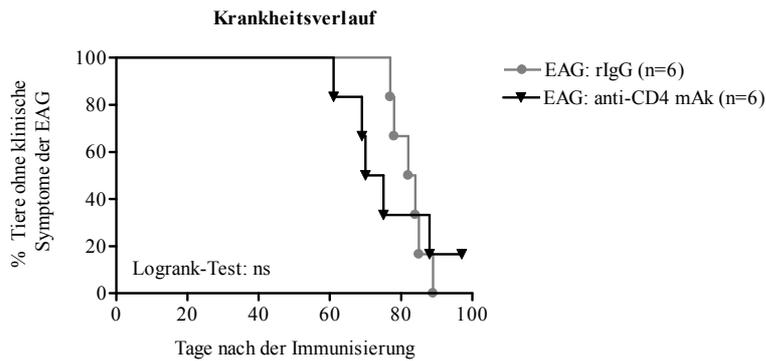


Abb. 17: Anzeichen der Nierenerkrankung nach CD4-Depletion. Dargestellt ist der Krankheitsverlauf der Depletionsgruppe und der Kontrollgruppe. ns: nicht signifikant.

Die Analyse des Proteingehalts im Urin ergab sowohl mit den Teststreifen (Abb. 18A) als auch im Albumin-ELISA (Abb. 18B) für beide Gruppen vergleichbare Werte. Ab Woche 8 bis 10 hatten alle Tiere eine schwere Proteinurie und waren nephrotisch. Auch die Blutharnstoff-Stickstoff-Werte waren zum Endzeitpunkt der EAG in beiden Gruppen mit etwa 50 mg/dl ähnlich (Abb. 18C).

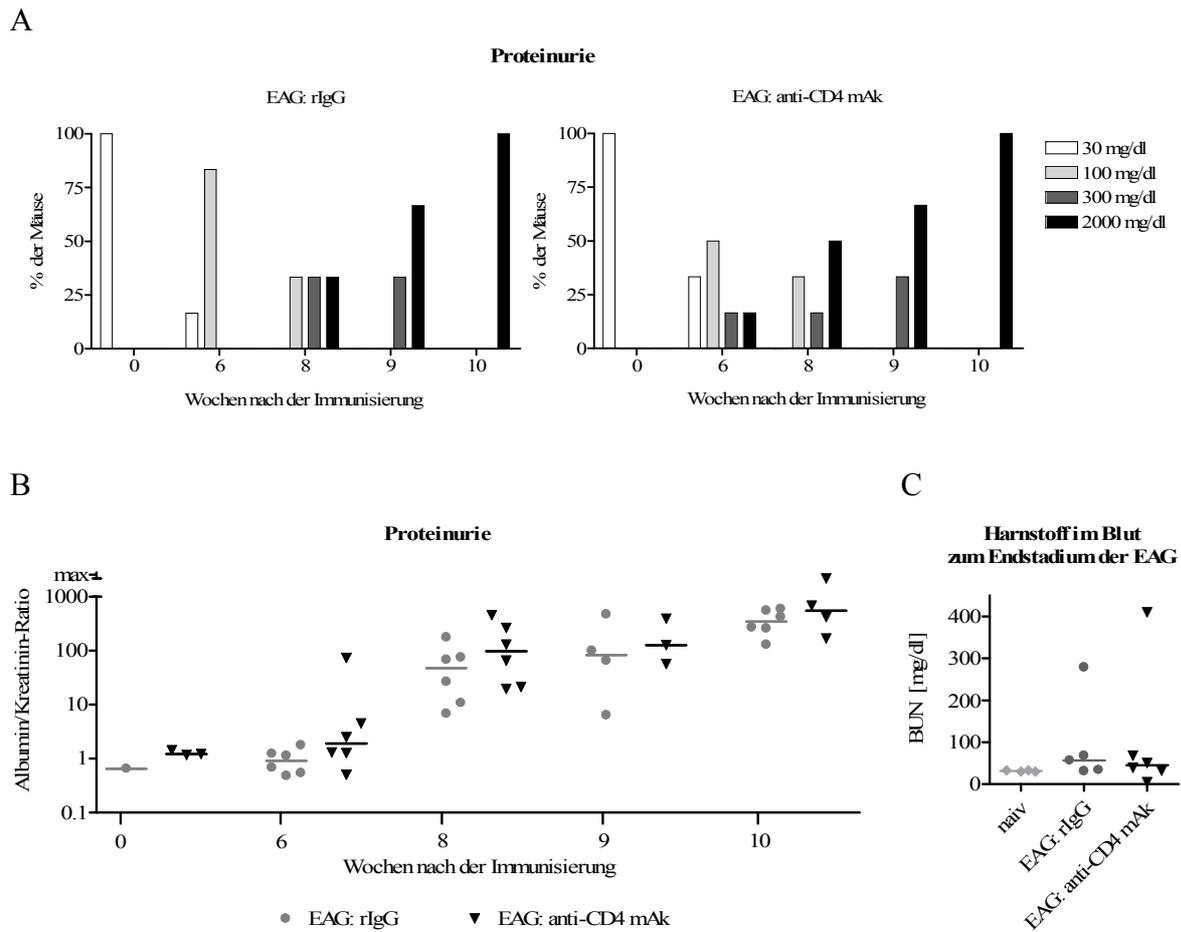


Abb. 18: Analyse der Nierenfunktion nach CD4-Depletion. (A) Die Konzentration der Gesamtproteine im Urin wurde mittels Urinteststreifen bestimmt. Die Urin-Protein-Ausscheidung ist in mg Protein pro dl angegeben. (B) Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin mittels ELISA. Die Werte wurden gegen Kreatinin aus dem Urin normalisiert (maximale Detektion 1000g/g). (C) Der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Gehalt wurde zum Endzeitpunkt der EAG bestimmt. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Abbildung 19 zeigt die Analyse der Plasma-Antikörper gegen m- α 3(IV)NC1. Für beide Gruppen ergab sich auch hier ein ähnlicher Verlauf in den Antikörperkonzentrationen.

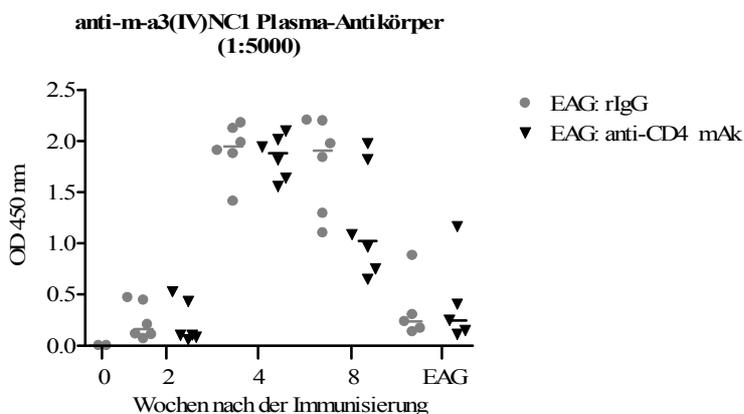


Abb. 19: Antikörperantwort nach CD4-Depletion. Indirekter ELISA zum Nachweis von m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern im Plasma. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Die histologische Untersuchung der Nieren wurde zum Endzeitpunkt der EAG durchgeführt (Abb. 20). Beide Gruppen zeigten vergleichbare Werte für die glomeruläre Halbmondbildung, die Fibrinablagerung und den tubulointerstitiellen Schaden.

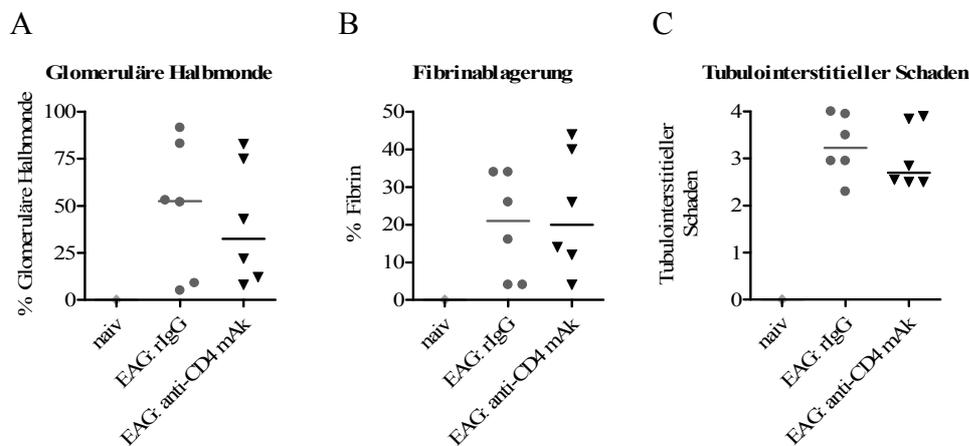
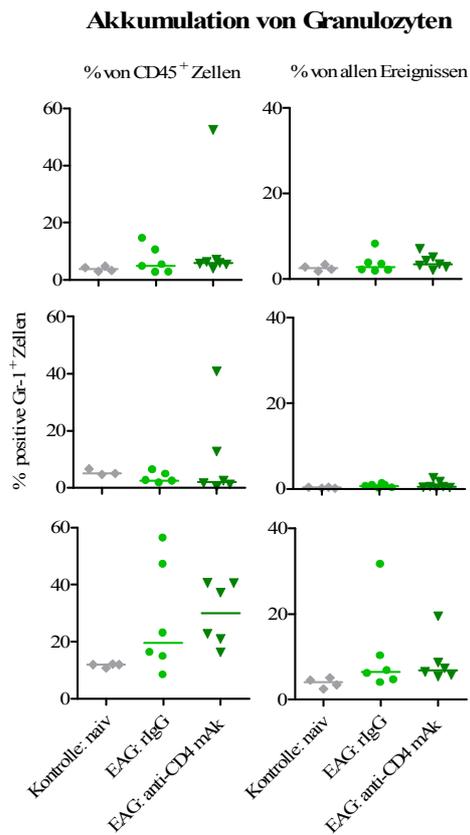


Abb. 20: Histologische Untersuchungen der Nieren nach CD4-Depletion. (A) Dargestellt ist der Anteil der Glomeruli mit Halbmondbildung, ausgezählt auf PAS-gefärbten Nierenschnitten. (B) Dargestellt ist die Fibrinablagerung innerhalb der glomerulären Halbmonde, ausgezählt auf PAS-gefärbten Nierenschnitten. (C) Der tubulointerstitielle Schaden wurde semiquantitativ auf PAS-gefärbten Nierenschnitten bestimmt und mit 0 - 4 bewertet. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Die FACS-Analysen von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen aus Milz, Niere und Lunge zum Endzeitpunkt der EAG sind in Abbildung 21 zusammengefasst. In der Milz fanden sich jeweils nur niedrige Frequenzen an Granulozyten und Makrophagen. Sowohl die Immunisierung als auch die CD4-Depletion führten zu keiner Veränderung dieser Frequenzen. Auch in der Niere fanden sich nur niedrige Frequenzen an Granulozyten, die ebenfalls stabil blieben. Für die Makrophagen bestätigte sich das Ergebnis aus Abschnitt 4.1.3. In gesunden Nieren waren etwa 39% der Leukozyten Makrophagen. Dieser Wert stieg in beiden immunisierten Gruppen auf vergleichbare Werte von über 80% an. Bezogen auf alle Ereignisse ergaben sich Werte von etwa 2% an Makrophagen in naiven Tieren und 12% in immunisierten Tieren beider Gruppen. In gesunden Lungen waren ca. 12% der Leukozyten Granulozyten. Dieser Wert stieg auf 20% in den EAG-Kontrolltieren und auf 30% in den anti-CD4 behandelten Tieren an. Durch große Streuung zwischen Tieren innerhalb der Gruppen erreichte dieser Unterschied aber keine Signifikanz. In Bezug auf alle gemessenen Ereignisse zeigte sich ebenfalls ein leichter aber nicht signifikanter Anstieg nach Immunisierung. Die Werte der Makrophagen in den naiven Tieren und immunisierten Tieren beider Gruppen blieben auf einem konstanten Niveau (etwa 18% der CD45⁺ Zellen und 6% aller Zellen).

A



B

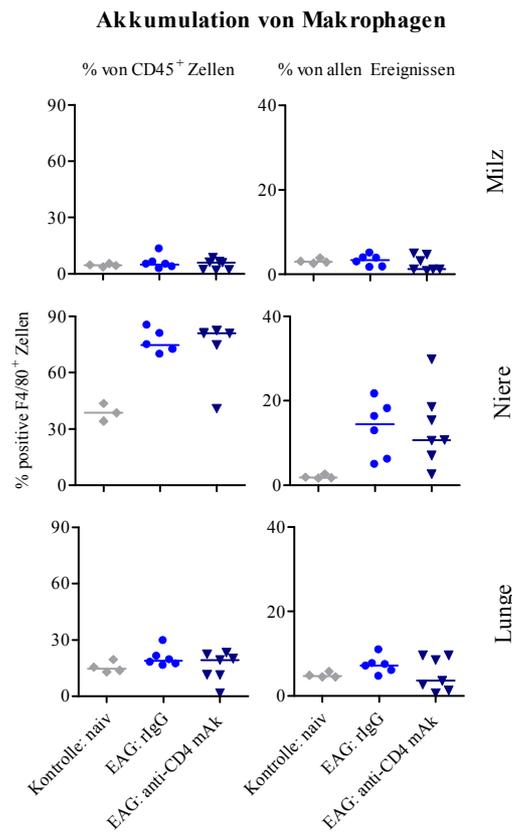


Abb. 21: FACS-Analyse von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in Milz, Niere und Lunge nach CD4-Depletion. Granulozyten wurden als $CD11b^+ F4/80^{niedrig} Gr-1^+$ Zellen und Makrophagen als $CD11b^+ F4/80^+ Gr-1^{niedrig}$ Zellen identifiziert. Die genaue Auswertestrategie ist in den Abschnitten 3.10.2 und 4.1.3 beschrieben. (A, B) Dargestellt ist die Akkumulation dieser Zellen im Verhältnis zu den $CD45^+$ Leukozyten und in Bezug auf alle im FACS analysierten Ereignisse. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Um sicher zu stellen, dass die CD4-Depletion mittels anti-CD4-Antikörper erfolgreich war, wurde dies zum Endzeitpunkt der EAG mittels FACS-Analyse überprüft. In Abbildung 22 ist die CD4/CD8-Ratio für Milz, Niere und Lunge für die verschiedenen Gruppen dargestellt. Die CD4/CD8-Ratio betrug in der depletierten Gruppe etwa 0,3 und in der Kontrollgruppe etwa 2,7 für alle Organe. Die Reduktion der $CD4^+$ T-Zellen war daher selbst in Tieren, die über einen Zeitraum von fünf Wochen mit dem anti-CD4 mAk behandelt wurden, noch sehr deutlich ausgeprägt und in allen analysierten Organen ähnlich.

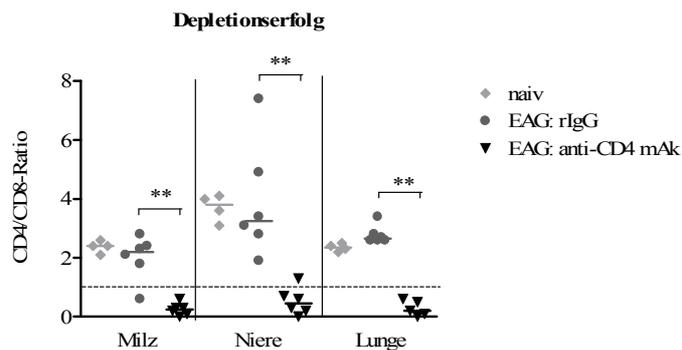


Abb. 22: FACS-Analyse von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen nach $CD4$ -Depletion zum Endzeitpunkt der EAG. In den analysierten Organen wurden die Prozentwerte der $CD4^+$ $CD11b^-$ und $CD8^+$ $CD11b^-$ T-Zellen in Bezug auf alle $CD45^+$ Zellen ermittelt. Dargestellt ist die $CD4/CD8$ -Ratio. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. $^{**}P < 0,01$.

Insgesamt ergaben die $CD4$ -Depletionsexperimente keine Hinweise auf eine Funktion der $CD4^+$ T-Zellen im späten Stadium der EAG-Entwicklung. Eine Funktion von $CD4^+$ T-Zellen kann aber trotzdem nicht ausgeschlossen werden. In unserem Ansatz wurde die Depletion erst zu einem sehr späten Zeitpunkt vorgenommen. Es könnte daher sein, dass die Nierenschädigung schon so weit fortgeschritten ist, dass $CD4^+$ T-Zellen keine Rolle mehr spielen. Unsere Depletion mit dem anti- $CD4$ mAk führte weiterhin zu einer globalen Entfernung der $CD4^+$ T-Zellen. Es ist daher auch möglich, dass neben nierenschädigenden $CD4^+$ T-Zellen auch schützende T-Zellen, z.B. regulatorische T-Zellen, entfernt werden und dadurch ein protektiver Effekt wieder aufgehoben wird.

4.3 Einfluss von IL-17A auf die Immunantwort im EAG-Mausmodell

4.3.1 IL-17A-Neutralisierung

Die Charakterisierung der $CD4^+$ T-Zellen in den Nieren zeigte eine Akkumulation von IL-17A-produzierenden Zellen im finalen Stadium der EAG. In der folgenden Serie von Experimenten sollte daher untersucht werden, ob das Zytokin IL-17A die Erkrankung und den damit verbundenen Nierenschaden begünstigt. Da IL-17A ein wichtiges Zytokin der Th17-Antwort ist, erlauben diese Experimente auch Aussagen zur generellen Funktion von Th17-Zellen in der Entwicklung der EAG. Zur Analyse der Funktion von IL-17A wurden Mäuse mit einem neutralisierenden anti-IL-17A mAk (Klon: MM17F3) behandelt (Uyttenhove & Van Snick, 2006). Bei diesem mAk handelt es sich um einen Maus-anti-Maus-IL-17A-Antikörper, der über einen längeren Zeitraum Mäusen verabreicht werden kann, ohne dass eine Neutralisierung des Antikörpers stattfindet.

Die Mäuse wurden wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben immunisiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. Tiere der einen Gruppe erhielten $500 \mu\text{g}$ des anti-IL-17A-Antikörpers, die Tiere der anderen Gruppe $500 \mu\text{g}$ von identisch aus Mausserum gereinigtem IgG. Die Gabe der Antikörper erfolgte i.p. ab Woche 0 bis 14 und wurde einmal pro Woche wiederholt. Tiere, die Zeichen einer EAG entwickelten, wurden getötet und analysiert. In Abbildung 23 ist der Versuchsaufbau gezeigt.

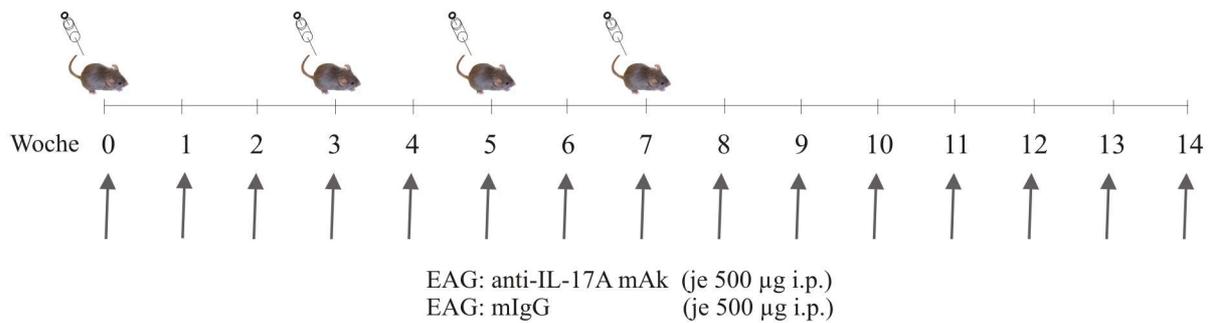


Abb. 23: EAG-Immunisierung und IL-17A-Neutralisierung. Für das Experiment wurden 16 männliche DBA/1J-Mäuse mit 30 µg rekombinantes h- α 3(IV)NC1 in komplettem Freundschens Adjuvans s.c. immunisiert. Die Boosterimmunisierungen mit jeweils 30 µg h- α 3(IV)NC1 erfolgten in Woche 3, 5 und 7 s.c. in inkomplettem Freundschens Adjuvans. Die Tiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Tiere der Neutralisierungsgruppe erhielten ab Woche 0 einmal pro Woche 500 µg anti-IL-17A-Antikörper (MM17F3) i.p. injiziert. Tiere der Kontrollgruppe wurden zeitgleich mit 500 µg eines Kontrollantikörpers (gereinigtes Maus-IgG, mIgG) i.p. behandelt. Alle Tiere wurden bis zum Auftreten von Zeichen der EAG mit dem anti-IL-17A mAk oder mIgG behandelt und dann getötet. Anschließend wurden das Blut der Tiere und deren Organe Milz, Niere und Lunge analysiert.

In Abbildung 24 ist der Krankheitsverlauf für beide Mausgruppen dargestellt. Beide Gruppen zeigten einen ähnlichen Verlauf ($P = 0,09$).

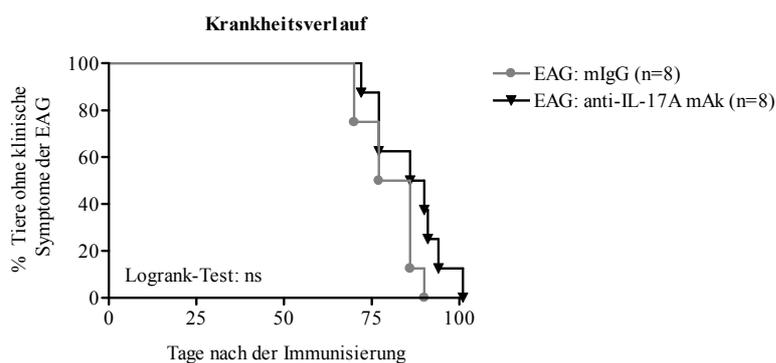


Abb. 24: Anzeichen der Nierenerkrankung nach IL-17A-Neutralisierung. Dargestellt ist der Krankheitsverlauf der Neutralisierungsgruppe und der Kontrollgruppe. ns: nicht signifikant.

Die Analyse des Proteingehalts im Urin mittels Albumin-ELISA ergab ähnliche Werte für beide Gruppen (Abb. 25A). Ab Woche 8 bis 9 waren die Tiere nephrotisch. Auch die Blut-Harnstoff-Stickstoff-Werte zeigten zum Endzeitpunkt der EAG in beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 25B).

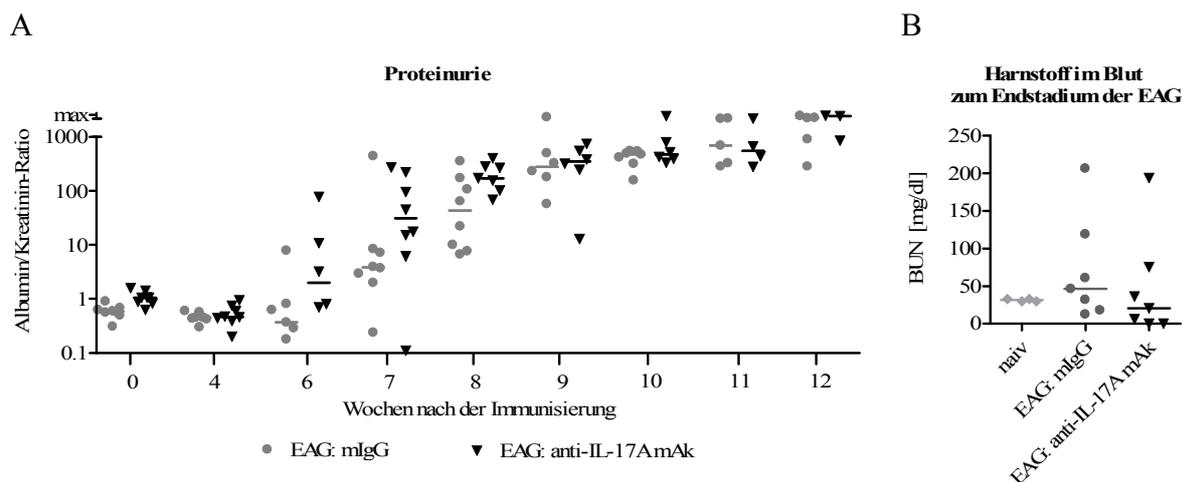


Abb. 25: Analyse der Nierenfunktion nach IL-17A-Neutralisierung. (A) Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin mittels ELISA. Die Werte wurden gegen Kreatinin aus dem Urin normalisiert (maximale Detektion 1000g/g). (B) Der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Gehalt wurde zum Endzeitpunkt der EAG bestimmt. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Abbildung 26 zeigt die Analyse der Plasma-Antikörper gegen m- α 3(IV)NC1. Für beide Gruppen ergab sich auch hier ein ähnlicher Verlauf in den Antikörpertitern.

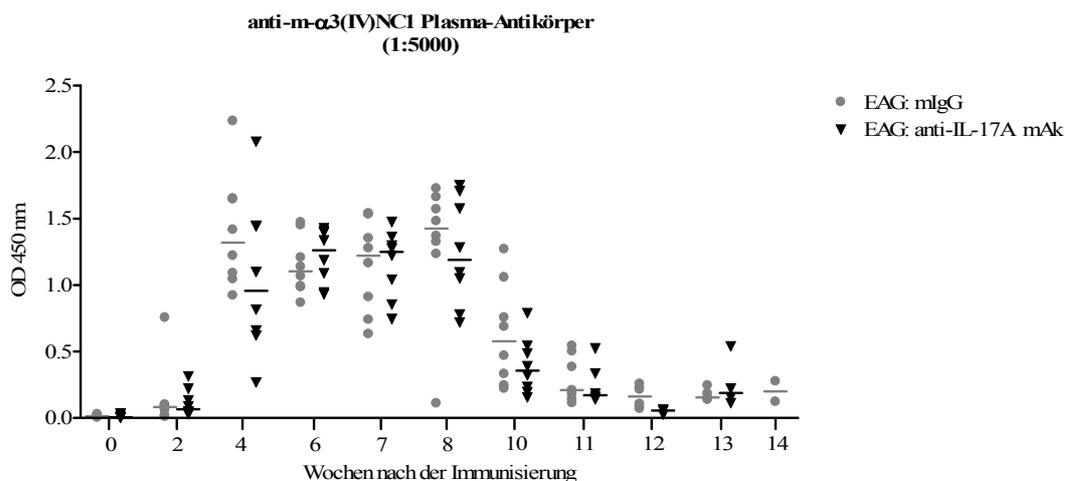


Abb. 26: Antikörperantwort nach IL-17A-Neutralisierung. Indirekter ELISA zum Nachweis von m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern im Plasma. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Die histologische Untersuchung der Niere wurde zum Endzeitpunkt der EAG durchgeführt (Abb. 27). Beide Gruppen zeigten vergleichbare Werte für die glomeruläre Halbmondbildung, die Fibrinablagerung und den tubulointerstitiellen Schaden.

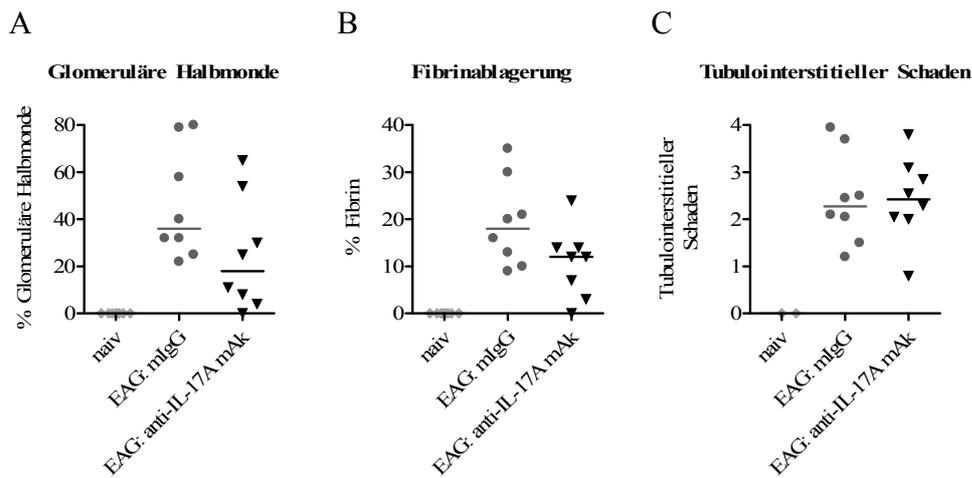


Abb. 27: Histologische Untersuchungen der Nieren nach IL-17A-Neutralisierung. (A) Dargestellt ist der Anteil der Glomeruli mit Halbmondbildung, ausgezählt auf PAS-gefärbten Nierenschnitten. (B) Dargestellt ist die Fibrinablagerung innerhalb der glomerulären Halbmonde, ausgezählt auf PAS-gefärbten Nierenschnitten. (C) Der tubulointerstitielle Schaden wurde semiquantitativ auf PAS-gefärbten Nierenschnitten bestimmt und mit 0 - 4 bewertet. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Die FACS-Analysen von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen aus Milz, Niere und Lunge zum Endzeitpunkt der EAG sind in Abbildung 28 zusammengefasst. In der Milz fanden sich jeweils nur niedrige Frequenzen an Granulozyten und Makrophagen. Sowohl die Immunisierung als auch die IL-17A-Neutralisierung führten zu keiner Veränderung dieser Frequenzen. Auch in der Niere fanden sich in beiden Mausgruppen nur niedrige Frequenzen an Granulozyten, die ebenfalls stabil blieben. Für die Makrophagen bestätigte sich das Ergebnis aus Abschnitt 4.1.3. In gesunden Nieren waren etwa 34% der Leukozyten Makrophagen. Dieser Wert stieg in beiden immunisierten Gruppen auf ähnliche Werte von etwa 64% an. In Bezug auf alle Ereignisse ergaben sich Werte von etwa 2% an Makrophagen in naiven Tieren und 10% in immunisierten Tieren beider Gruppen. In gesunden und anti-IL-17A behandelten Lungen waren ca. 14% der Leukozyten Granulozyten. Dieser Wert stieg signifikant auf 30% (**P < 0,01) in den EAG-Kontrolltieren an. Bezogen auf alle gemessenen Ereignisse zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg nach Immunisierung (*P < 0,05). Die Werte der Makrophagen in den naiven Tieren und immunisierten Tieren beider Gruppen blieben auf einem ähnlichen Niveau (etwa 13% der CD45⁺ Zellen und 4% aller Zellen).

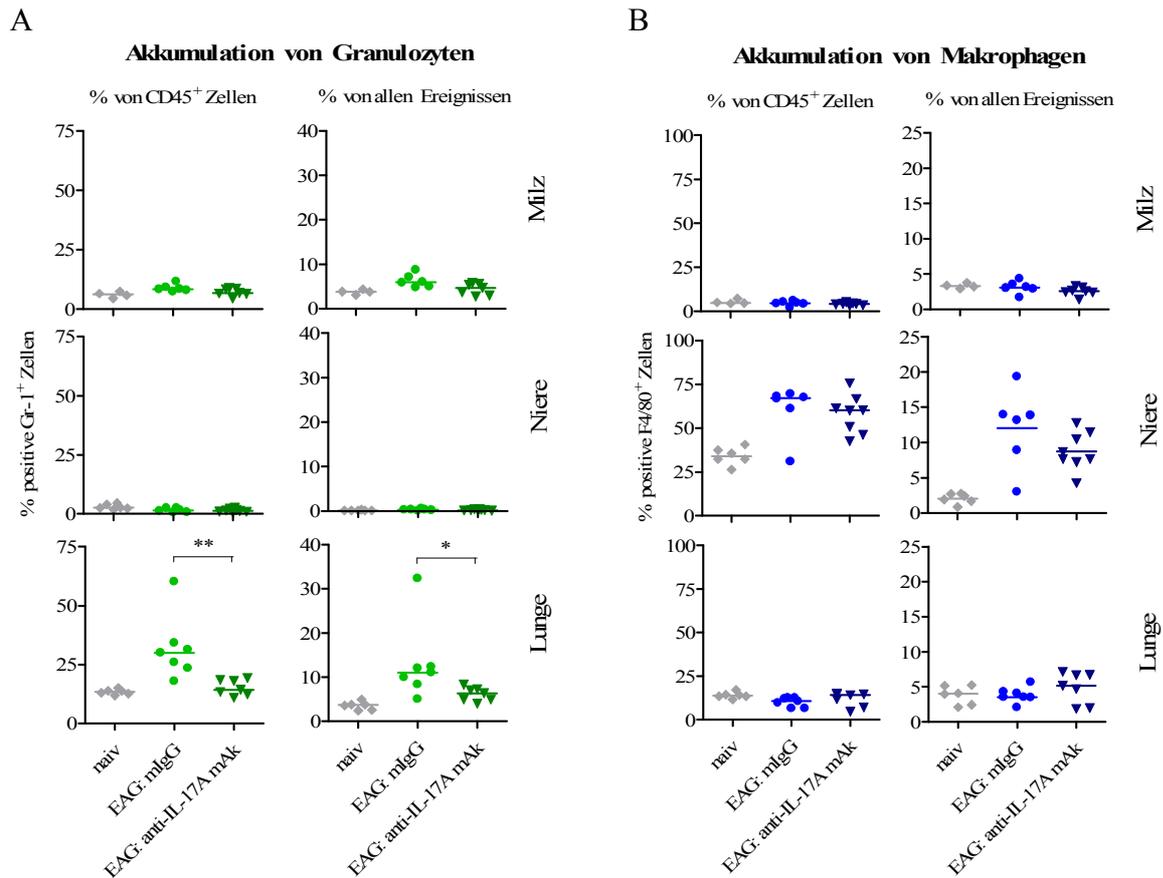


Abb. 28: FACS-Analyse von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in Milz, Niere und Lunge nach IL-17A-Neutralisierung. Granulozyten wurden als $CD11b^+ F4/80^{niedrig} Gr-1^+$ Zellen und Makrophagen als $CD11b^+ F4/80^+ Gr-1^{niedrig}$ Zellen identifiziert. Die genaue Auswertestrategie ist in den Abschnitten 3.10.2 und 4.1.3 beschrieben. (A, B) Dargestellt ist die Akkumulation dieser Zellen im Verhältnis zu den $CD45^+$ Leukozyten und in Bezug auf alle im FACS analysierten Ereignisse. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Die Analyse der Zytokinproduktion von T-Zellen aus Milz, Niere und Lunge zum Endzeitpunkt der EAG ist in Abbildung 29 zusammengefasst. In Milz und Lunge zeigten die $CD4^+$ T-Zellen unabhängig von der Immunisierung und Antikörperbehandlung in den einzelnen Tieren jeweils ähnliche Werte für $IFN\gamma$ und IL-17A. In der Niere war nach Immunisierung wieder ein Anstieg der Frequenzen an $IFN\gamma$ - und IL-17A-Produzenten zu beobachten, zwischen den beiden immunisierten Gruppen war aber kein Unterschied nachweisbar.

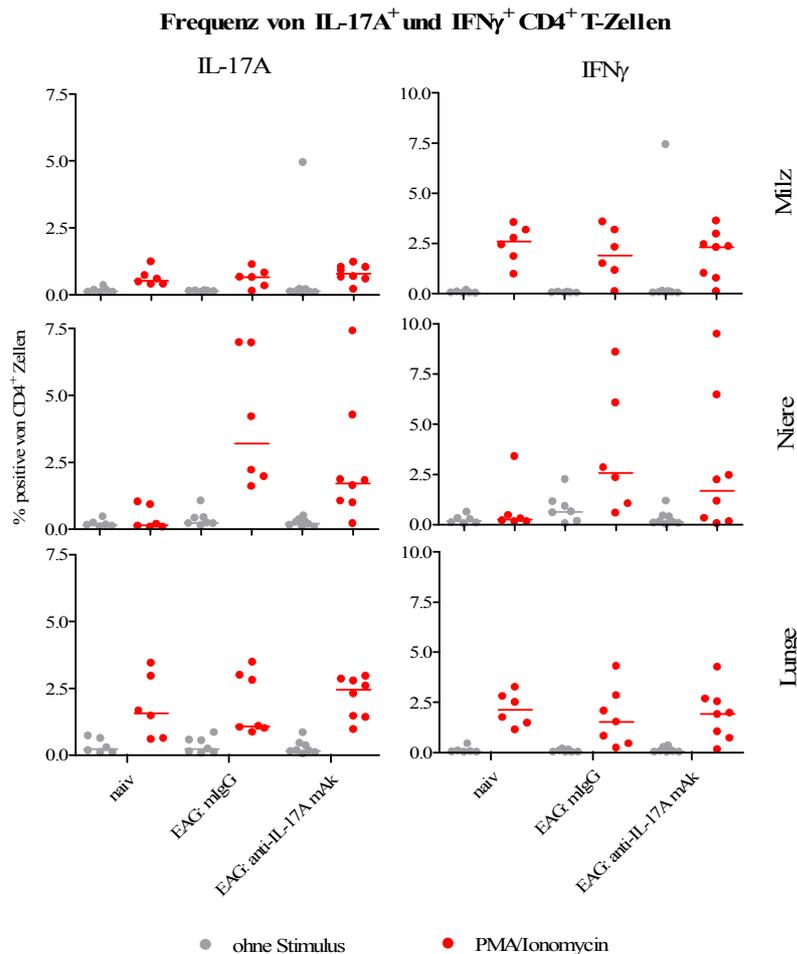


Abb. 29: Funktionale Charakterisierung von CD4⁺ T-Zellen nach IL-17A-Neutralisierung. Das Zytokinprofil der CD4⁺ T-Zellen wurde aus naiven und EAG-Mäusen mittels FACS-Analyse nach intrazellulärer Färbung von IL-17A und IFN γ bestimmt. Die Zellen wurden vorher *in vitro* polyklonal mit PMA + Ionomycin stimuliert. Die Frequenz der Zytokinproduzenten ist als Prozentwert der CD4⁺ T-Zellen angegeben. Für die Inkubation ohne Stimulation wurden z.T. Nierenzellen aus zwei Mäusen vereint. PMA + Ionomycin-Werte repräsentieren immer die Ergebnisse individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Zusammenfassend geben die Ergebnisse der IL-17A-Neutralisierung keine Hinweise auf eine Funktion von IL-17A in der EAG. Die Neutralisierung führt zwar zu einer Reduktion der neutrophilen Granulozyten in der Lunge, zeigte aber in keinem der analysierten Parameter der EAG eine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe.

4.3.2 Analyse in der IL-17A ko-Maus

Neben der IL-17A-Neutralisierung wurde noch ein zweiter Versuchsansatz durchgeführt, um die Funktion von IL-17A für die EAG-Entwicklung zu untersuchen. In diesem Versuchsansatz wurden IL-17A ko-Mäuse verwendet. Gegenüber der IL-17A-Neutralisierung kann in den IL-17A ko-Mäusen eine IL-17A-Wirkung komplett ausgeschlossen werden. Es besteht aber die Möglichkeit, dass die Mäuse in Abwesenheit von IL-17A kompensatorische Mechanismen entwickeln. Insofern ergänzen sich die Experimente in IL-17A ko-Mäusen und in Mäusen mit IL-17A-Neutralisierung.

Für die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe IL-17A-defiziente Mäuse (IL-17A knockout- bzw. IL-17A ko-Mäuse) für zehn Generationen in den DBA/1J-

Mausstamm gekreuzt. Diese IL-17A ko-Tiere und entsprechende Wildtyp (Wt)-Kontrollen wurden wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben immunisiert. Tiere, die Zeichen einer EAG entwickelten, wurden getötet und analysiert. In Abbildung 30 wird der Versuchsaufbau gezeigt.

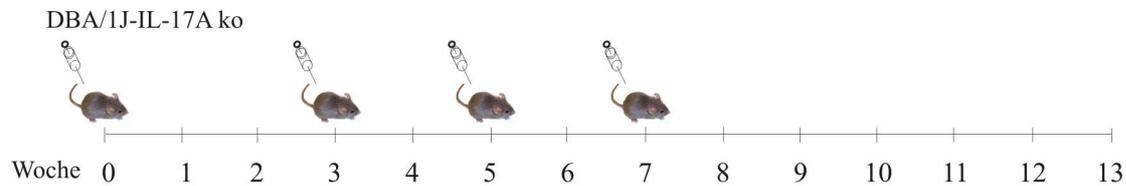


Abb. 30: EAG-Immunsierung in IL-17A ko-Mäusen. Für das Experiment wurden je acht männliche DBA/1J-IL-17A ko-Mäuse und Wildtyp-Mäuse mit 30 µg rekombinatem h-α3(IV)NC1 in komplettem Freundschens Adjuvans s.c. immunisiert. Die Boosterimmunisationen mit jeweils 30 µg h-α3(IV)NC1 erfolgten in Woche 3, 5 und 7 s.c. in inkomplettem Freundschens Adjuvans. Alle Tiere wurden beim Auftreten von Zeichen der EAG getötet und die jeweiligen Gewebe analysiert.

In Abbildung 31 sind die Krankheitsverläufe der immunisierten Tiere beider Gruppen dargestellt. Diese zeigen einen nahezu identischen Verlauf (P = 0,63).

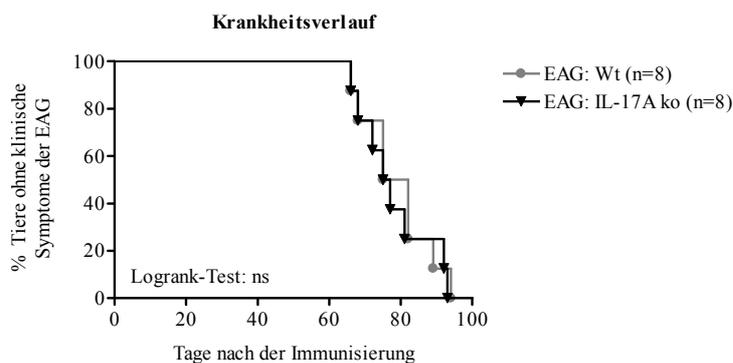


Abb. 31: Anzeichen der Nierenerkrankung in IL-17A ko-Mäusen. Dargestellt ist der Krankheitsverlauf der IL-17A ko-Gruppe und der Wt-Gruppe. ns: nicht signifikant.

Die Analyse des Proteingehalts im Urin mittels Albumin-ELISA ergab ähnliche Werte für beide Gruppen (Abb. 32A). Alle Tiere waren ab Woche 8 nephrotisch. Auch die Blut-Harnstoff-Stickstoff-Werte zeigten zum Endzeitpunkt der EAG in beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 32B).

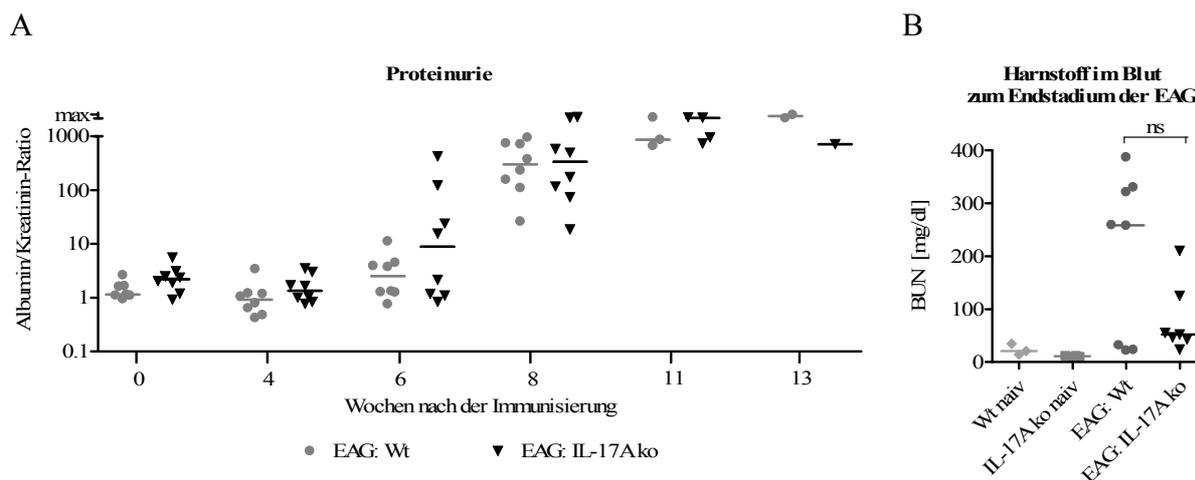


Abb. 32: Analyse der Nierenfunktion in IL-17A ko-Mäusen. (A) Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin mittels ELISA. Die Werte wurden gegen Kreatinin aus dem Urin normalisiert (maximale Detektion 1000g/g). (B) Der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Gehalt wurde zum Endzeitpunkt der EAG bestimmt. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. ns: nicht signifikant.

Abbildung 33 zeigt die Analyse der Plasma-Antikörper gegen h- α 3(IV)NC1. Für beide Gruppen ergab sich auch hier ein ähnlicher Verlauf in den Antikörpertitern.

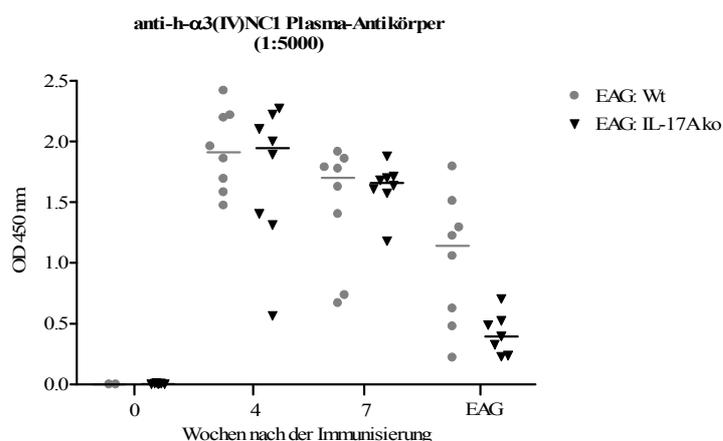


Abb. 33: Antikörperantwort in IL-17A ko-Mäusen. Indirekter ELISA zum Nachweis von h- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern im Plasma. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Die FACS-Analysen von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen aus Milz, Niere und Lunge zum Endzeitpunkt der EAG sind in Abbildung 34 zusammengefasst. In den Milzen fanden sich jeweils nur niedrige Frequenzen an Makrophagen. Sowohl die Immunisierung der Wt-Mäuse als auch die Immunisierung der IL-17A ko-Mäuse führte zu keiner Veränderung dieser Frequenzen. In den Milzen der IL-17A ko-Mäuse waren die Frequenzen der Granulozyten im Vergleich zu den Wt-Tieren etwas erniedrigt, die Immunisierung führte aber zu keiner Veränderung der Werte. Auch in den Nieren fanden sich in beiden Mausgruppen nur niedrige Frequenzen an Granulozyten, die ebenfalls stabil blieben. Für die Makrophagen bestätigte sich das Ergebnis aus Abschnitt 4.1.3. In gesunden Nieren waren etwa 44% der Leukozyten Makrophagen. Dieser Wert stieg in beiden immunisierten Gruppen auf vergleichbare Werte von 60% an. In Bezug auf alle Ereignisse ergaben sich Werte von etwa

2% an Makrophagen in naiven Tieren und 8% in immunisierten Tieren beider Gruppen. In gesunden Lungen der Wt-Mäuse waren ca. 18% und in IL-17A ko-Mäusen etwa 12% der Leukozyten Granulozyten. Diese Werte stiegen auf etwa 26% in den Wt-Tieren und auf 18% in den IL-17A ko-Tieren an. Aufgrund der großen Streuung innerhalb der Gruppen erreichte dieser Unterschied jedoch keine Signifikanz. Bezogen auf alle gemessenen Ereignisse zeigte sich ebenfalls ein leichter Anstieg nach Immunisierung. In gesunden Lungen der Wt-Mäuse waren etwa 11% und in IL-17A ko-Mäusen etwa 15% der Leukozyten Makrophagen. Diese Werte stiegen auf ca. 14% in den Wt-Tieren und auf 17% in den IL-17A ko-Tieren an. Bezogen auf alle Ereignisse ergaben sich Werte von etwa 6% an Makrophagen in naiven Tieren und 7% in immunisierten Tieren beider Gruppen.

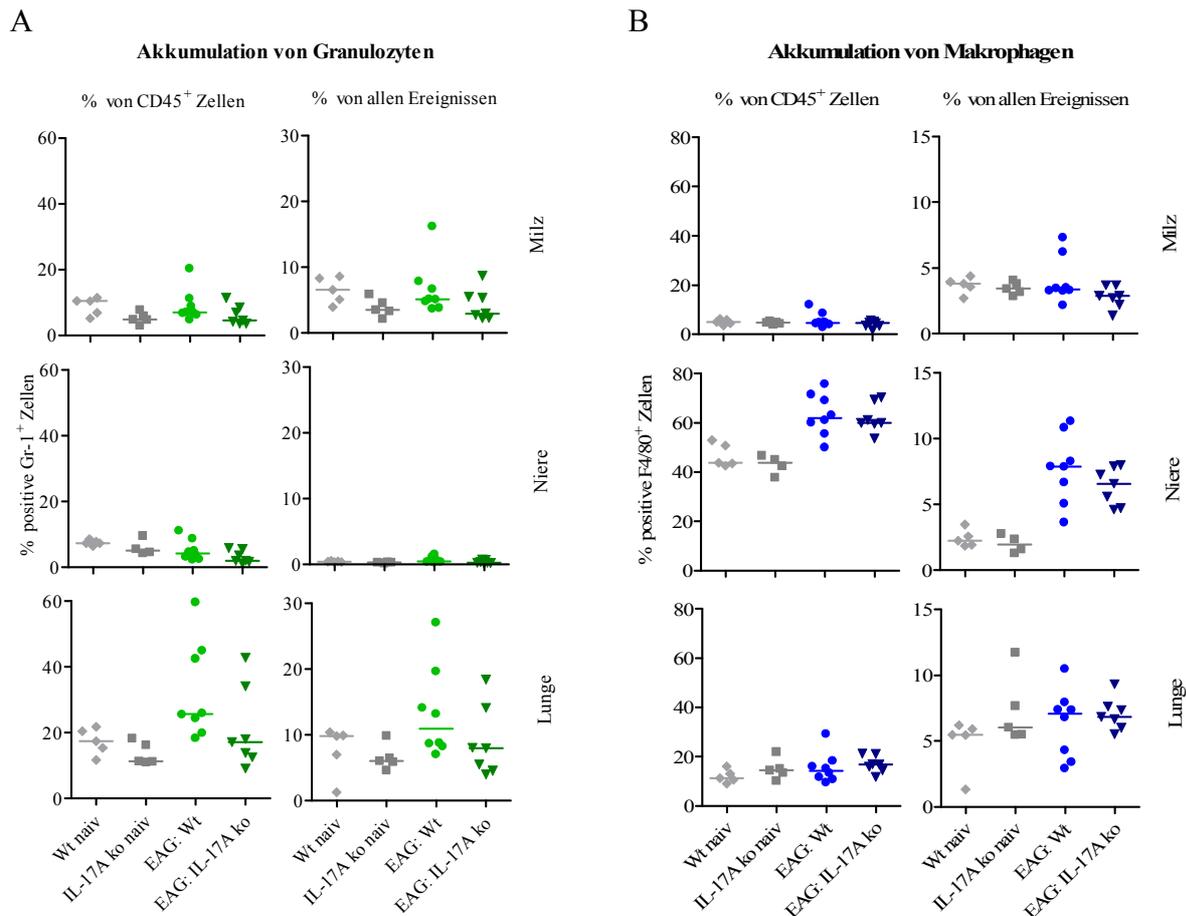


Abb. 34: FACS-Analyse von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in Milz, Niere und Lunge von IL-17A ko-Mäusen. Granulozyten wurden als $CD11b^+ F4/80^{\text{niedrig}} Gr-1^+$ Zellen und Makrophagen als $CD11b^+ F4/80^+ Gr-1^{\text{niedrig}}$ Zellen identifiziert. Die genaue Auswertestrategie ist in den Abschnitten 3.10.2 und 4.1.3 beschrieben. (A, B) Dargestellt ist die Akkumulation dieser Zellen im Verhältnis zu den $CD45^+$ Leukozyten und in Bezug auf alle im FACS analysierten Ereignisse. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Die Analyse der Zytokinproduktion von T-Zellen aus Milz, Niere und Lunge zum Endzeitpunkt der EAG ist in Abbildung 35 zusammengefasst. In Milz und Lunge der immunisierten Tiere beider Gruppen zeigten sich ähnliche Frequenzen von $IFN\gamma$ -produzierenden Th1-Zellen (etwa 2% der $CD4^+$ T-Zellen). In diesen Organen konnte sowohl in naiven als auch in kranken Wt-Tieren eine niedrige Frequenz von $IL-17A^+$ Zellen nachgewiesen werden. In den IL-17A ko-Tieren lagen die %-Werte der $IL-17A^+$ Zellen immer bei dem Wert der nicht stimulierten Kontrollen, was ein Hinweis darauf ist, dass es sich überwiegend um falsch-positive Ereignisse handelte. Die Analyse der Nieren der EAG-

Kontrolltiere bestätigte die Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.5. In den EAG-Nieren zeigten sich Frequenzen von etwa 12% an IL-17A-produzierenden Th17-Zellen und von etwa 3% an IFN γ -produzierenden Th1-Zellen. Wie auch in den anderen Organen lagen die %-Werte für IL-17A in den IL-17A ko-Tieren in der Niere jeweils im Bereich der nicht stimulierten Kontrollen.

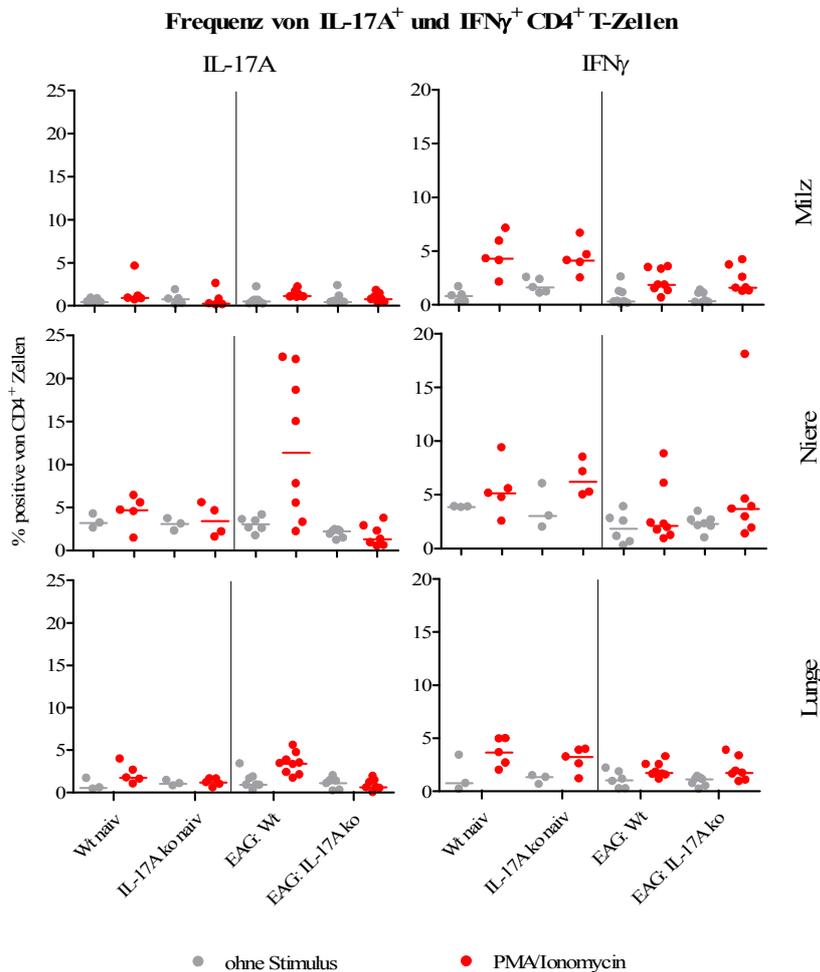


Abb. 35: Funktionale Charakterisierung von CD4⁺ T-Zellen in IL-17A ko-Mäusen. Das Zytokinprofil der CD4⁺ T-Zellen wurde aus naiven und EAG-Mäusen mittels FACS-Analyse nach intrazellulärer Färbung von IL-17A und IFN γ bestimmt. Die Zellen wurden vorher *in vitro* polyklonal mit PMA + Ionomycin stimuliert. Die Frequenz der Zytokinproduzenten ist als Prozentwert der CD4⁺ T-Zellen angegeben. Für die Inkubation ohne Stimulation wurden z.T. Nierenzellen aus zwei Mäusen vereint. PMA + Ionomycin-Werte repräsentieren immer die Ergebnisse individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Zusammenfassend bestätigen die Experimente mit IL-17A ko-Mäusen die Ergebnisse der IL-17A-Neutralisierung. IL-17A scheint daher keine Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf der EAG zu haben.

4.4 Einfluss der regulatorischen T-Zellen auf die Immunantwort im EAG-Mausmodell

Neben T-Zellen, die eine Immunantwort vorantreiben, gibt es auch T-Zellen, die Immunantworten unterdrücken können. Eine wichtige suppressive T-Zellpopulation bilden die regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen). Diese T-Zellen sind $CD4^+$ und in der Maus durch eine selektive Expression des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein 3 (FoxP3) gekennzeichnet.

Um die Funktion dieser Zellen in der EAG zu untersuchen, wurden DEREГ-Mäuse (depletion of regulatory T cells) verwendet, die für zehn Generationen in den DBA/1J-Mausstamm gekreuzt wurden. DEREГ-Mäuse sind transgen für ein Genomfragment, welches das FoxP3-Gen und größere 5'- und 3'-Genombereiche enthält. In diesem Fragment wurde der für FoxP3 kodierende Bereich durch eine Sequenz ersetzt. Diese Sequenz kodiert für ein Fusionsprotein aus dem humanen Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) und einem grün fluoreszierenden Protein (GFP). In Treg-Zellen wird dieses Fusionsprotein durch den noch im Transgen vorhandenen FoxP3-Promotor selektiv exprimiert. Als Folge können Treg-Zellen über die Expression von GFP per FACS-Analyse identifiziert werden. Da Mäuse im Gegensatz zum Menschen relativ resistent gegenüber Diphtherietoxin (DTX) sind, können die DTR-transgenen Treg-Zellen weiterhin spezifisch durch eine Injektion von DTX entfernt werden (Lahl *et al.*, 2007).

Für dieses Experiment wurden heterozygot transgene DEREГ-Mäuse und nicht transgene Geschwistertiere als Kontrollen verwendet. Da eine nephrotoxische Wirkung von DTX nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte, wurden für beide Gruppen auch Kontrollimmunisierungen (KFA und IFA ohne $\alpha 3(IV)NC1$) durchgeführt. Tiere aller Gruppen wurden mit DTX behandelt. Da der Fokus dieser Arbeit auf dem späten Entzündungsgeschehen in der Niere lag, wurde die Depletion der Treg-Zellen erst nach Ende der Immunisierung ab Woche 8 durchgeführt. Zur Depletion wurde den Mäusen zweimal pro Woche je 0,5 μg DTX i.p. verabreicht. In Vorversuchen konnte für diese DTX-Dosis in DBA/1J-DEREГ-Mäusen eine 90 - 95%ige Entfernung der Treg-Zellen gezeigt werden. Die Dosis führte auch zu keiner nachweisbaren Proteinurie. Der detaillierte Versuchsaufbau ist in Abbildung 36 gezeigt.

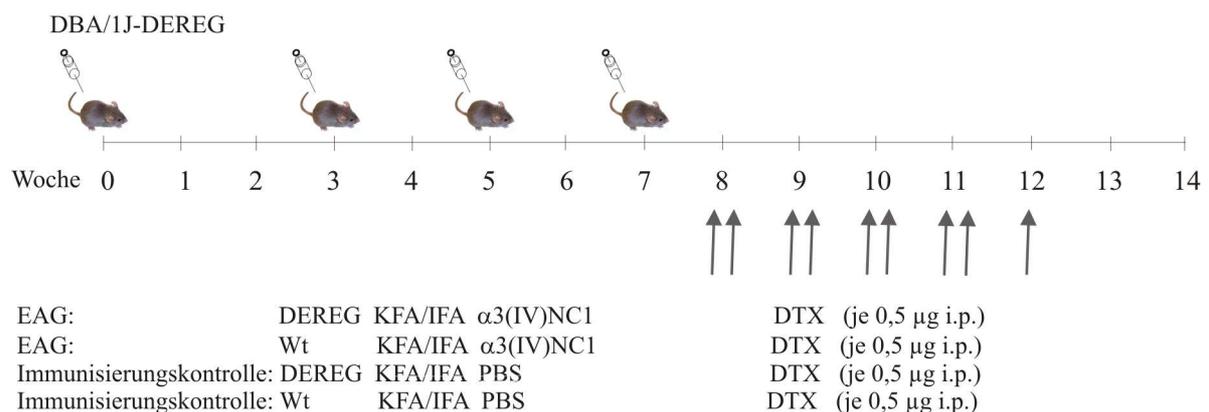


Abb. 36: EAG-Immunisierung und Depletion der Treg-Zellen. Für das Experiment wurden je sechs männliche DBA/1J-DEREГ- und sechs Wt-Mäuse mit 30 μg rekombinantem h- $\alpha 3(IV)NC1$ in komplettem Freundschens Adjuvans s.c. immunisiert. Die Boosterimmunisierungen mit jeweils 30 μg h- $\alpha 3(IV)NC1$ erfolgten in Woche 3, 5 und 7 s.c. in inkomplettem Freundschens Adjuvans. Für beide Gruppen wurden nach dem gleichen Schema Immunisierungskontrollen (KFA und IFA mit PBS) durchgeführt. Ab Woche 8 erhielten alle Mäuse zweimal pro Woche je 0,5 μg DTX i.p. injiziert. Alle Tiere wurden bis zum Auftreten von Zeichen der EAG mit dem DTX behandelt und dann getötet. Anschließend wurde das Blut der Tiere und deren Organe Milz, Niere und Lunge analysiert. Die Immunisierungskontrollen wurden in Woche 14 untersucht.

In Abbildung 37 sind die Krankheitsverläufe der immunisierten Tiere beider Gruppen dargestellt. Beide Gruppen wiesen einen ähnlichen Verlauf auf ($P = 0,46$). Die kontrollimmunisierten Mäuse beider Gruppen zeigten bis Woche 14 keine Krankheitsanzeichen.

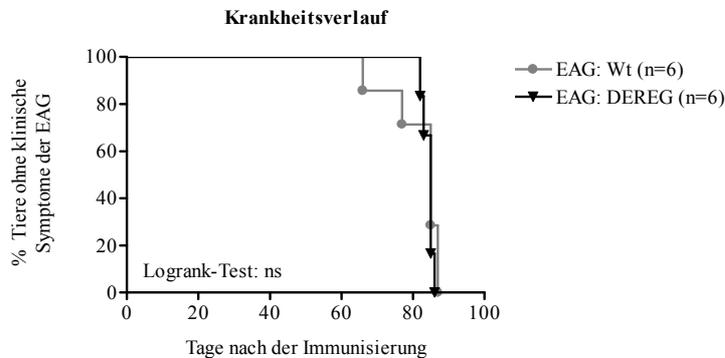
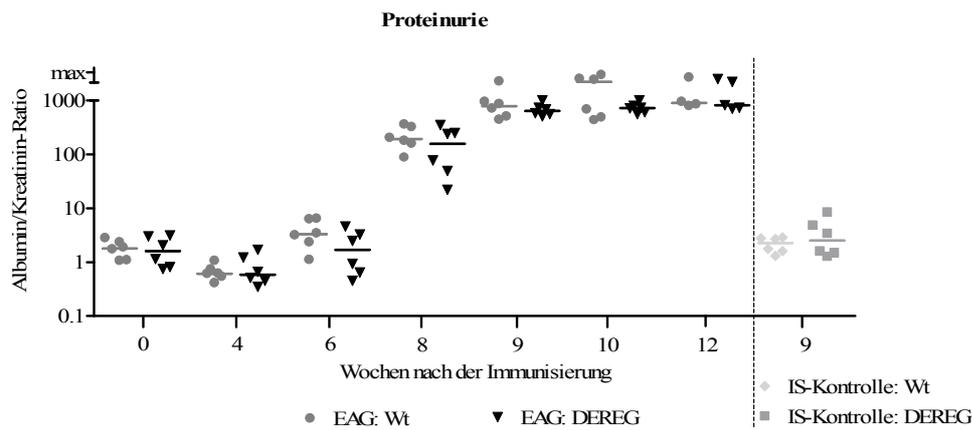


Abb. 37: Anzeichen der Nierenerkrankung nach Depletion der Treg-Zellen. Dargestellt ist der Krankheitsverlauf der DERE-Gruppe und der Wt-Gruppe. ns: nicht signifikant.

Die Analyse des Proteingehalts im Urin mittels Albumin-ELISA ergab ähnliche Werte für beide immunisierten Gruppen (Abb. 38A). Ab Woche 9 waren alle Tiere nephrotisch. Auch die Blut-Harnstoff-Stickstoff-Werte zeigten zum Endzeitpunkt der EAG in beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 38B). Die Immunisierungskontrollen hatten zu keinem Zeitpunkt erhöhte Proteinwerte im Urin und die Blut-Harnstoff-Stickstoff-Werte zum Zeitpunkt der Analyse waren auf dem Niveau gesunder Mäuse.

A



B

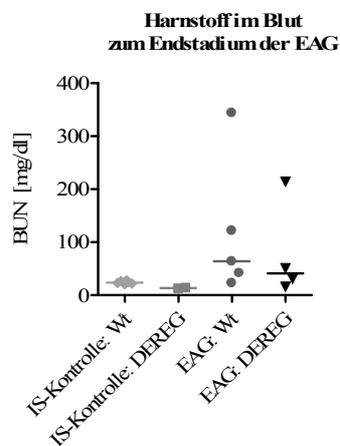


Abb. 38: Analyse der Nierenfunktion nach Depletion der Treg-Zellen. (A) Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin mittels ELISA. Die Werte wurden gegen Kreatinin aus dem Urin normalisiert (maximale Detektion 1000g/g). (B) Der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Gehalt wurde zum Endzeitpunkt der EAG bestimmt. IS-Kontrolle: Immunisierungskontrolle nach 14 Wochen. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Abbildung 39 zeigt die Analyse der Plasma-Antikörper gegen h- α 3(IV)NC1. Für beide immunisierten Gruppen ergab sich auch hier ein ähnlicher Verlauf in den Antikörpertitern. Die Immunisierungskontrollen zeigten zum Zeitpunkt der Analysen in Woche 2, 8 und 14 keine Veränderungen der Antikörperkonzentrationen und ein vergleichbares Niveau gesunder Mäuse (Daten nicht gezeigt).

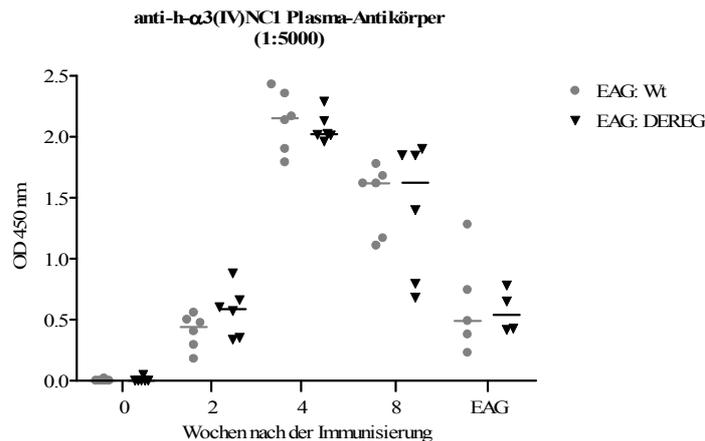


Abb. 39: Antikörperantwort nach Depletion der Treg-Zellen. Indirekter ELISA zum Nachweis von h- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern im Plasma. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Die FACS-Analysen der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen aus Milz, Niere und Lunge zum Endzeitpunkt der EAG sind in Abbildung 40 zusammengefasst. In den kontrollimmunisierten DERE- und Wt-Milzen waren etwa 4% der Leukozyten Granulozyten. Dieser Wert stieg in beiden immunisierten Gruppen auf ca. 13% an. In Bezug auf alle gemessenen Ereignisse zeigte sich ebenfalls ein Anstieg nach Immunisierung. Für die Makrophagen konnte nur in der immunisierten DERE-Gruppe ein leichter Anstieg in den Frequenzen beobachtet werden. In den Nieren zeigten die Tiere beider immunisierten Gruppen und die kontrollimmunisierte DERE-Gruppe vergleichbar niedrige Frequenzen an Granulozyten. Dieser Wert war in der kontrollimmunisierten Wt-Gruppe erhöht. Bezogen auf alle gemessenen Ereignisse zeigten sich aber in den vier Gruppen nur relativ niedrige Frequenzen. In gesunden Nieren waren etwa 30% der Leukozyten Makrophagen. Dieser Wert stieg in beiden immunisierten Gruppen auf 50 - 70% an. Bezogen auf alle Ereignisse ergaben sich Werte von etwa 1% an Makrophagen in kontrollimmunisierten Tieren und 13% in immunisierten Tieren beider Gruppen. Zwischen den beiden immunisierten Gruppen zeigte sich kein Unterschied. In der Lunge fanden sich in kontrollimmunisierten Mäusen sowie in immunisierten DERE-Mäusen ähnliche Frequenzen an Granulozyten. In immunisierten Wt-Tieren war dieser Wert aber signifikant erhöht (* $P < 0,05$). Bezogen auf alle gemessenen Ereignisse ergab sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg (* $P < 0,05$). In den Lungen kontrollimmunisierter Wt-Mäuse waren etwa 11% und in DERE-Mäusen etwa 19% der Leukozyten Makrophagen. Dieser Unterschied erreichte eine Signifikanz von ** $P < 0,01$. Die Immunisierung der Tiere führte in beiden Gruppen zu einer Erhöhung der Frequenzen und der Unterschied zwischen Wt- und DERE-Mäusen blieb erhalten (* $P < 0,05$). Diese signifikanten Unterschiede in den Makrophagen zeigten sich auch in Bezug auf alle Ereignisse (** $P < 0,01$ und * $P < 0,05$).

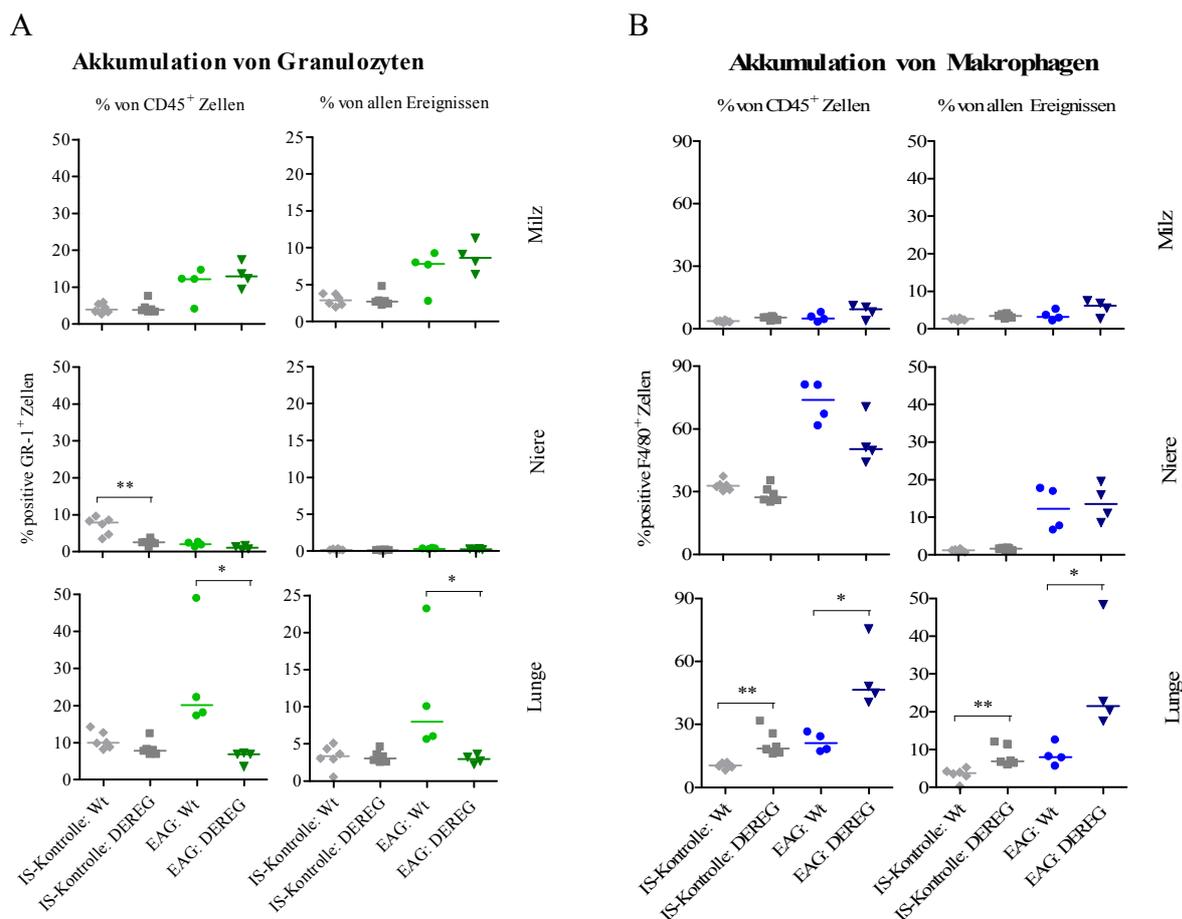


Abb. 40: FACS-Analyse von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in Milz, Niere und Lunge nach Depletion der Treg-Zellen. Granulozyten wurden als $CD11b^+ F4/80^{\text{niedrig}} Gr-1^+$ Zellen und Makrophagen als $CD11b^+ F4/80^+ Gr-1^{\text{niedrig}}$ Zellen identifiziert. Die genaue Auswertestrategie ist in den Abschnitten 3.10.2 und 4.1.3 beschrieben. (A, B) Dargestellt ist die Akkumulation dieser Zellen im Verhältnis zu den $CD45^+$ Leukozyten und in Bezug auf alle im FACS analysierten Ereignisse. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. IS-Kontrolle: Immunisierungskontrolle nach 14 Wochen. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Die DTX-Behandlung in Wt- und DEREg-Mäusen hatte weder in den immunisierten noch in den kontrollimmunisierten Tieren einen Einfluss auf die Frequenzen der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in der Milz (Abb. 41). In den kontrollimmunisierten Tieren führte die Treg-Zelldepletion zu einem leichten Anstieg der T-Zellfrequenzen in der Lunge. In der Niere zeigten sich deutliche Unterschiede. Im Vergleich zu Wt-Mäusen, führte hier die DTX-Behandlung in DEREg-Mäusen zu einem kräftigen Anstieg der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowohl in kontrollimmunisierten als auch in $\alpha 3(IV)NC1$ -immunisierten Mäusen. In Bezug auf alle Ereignisse beobachteten wir in immunisierten DEREg-Tieren Werte von 5% für die $CD4^+$ T-Zellen und 3% für die $CD8^+$ T-Zellen gegenüber 1% und 0,3% in immunisierten Wt-Mäusen (* $P < 0,05$ für $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen).

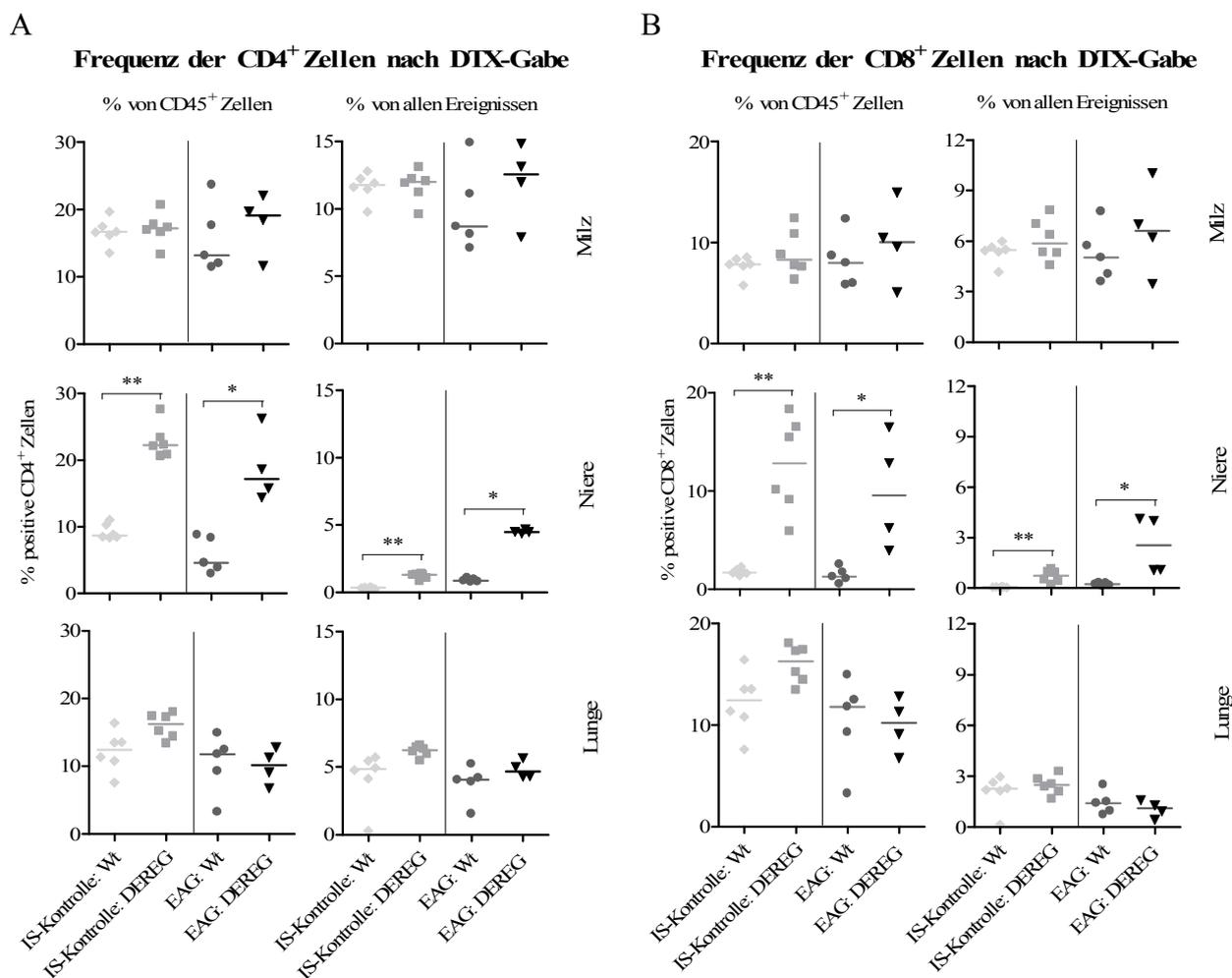


Abb. 41: FACS-Analyse von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Milz, Niere und Lunge nach Depletion der Treg-Zellen. CD4⁺ T-Zellen wurden als CD11b⁻ CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als CD11b⁻ CD8⁺ identifiziert. (A, B) Dargestellt ist die Akkumulation dieser Zellen im Verhältnis zu den CD45⁺ Leukozyten und in Bezug auf alle im FACS analysierten Ereignisse. Die Symbole repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse. Die Balken geben den Median an. IS-Kontrolle: Immunisierungskontrolle nach 14 Wochen. *P < 0,05; **P < 0,01.

Die Analyse der Zytokinproduktion von T-Zellen aus Milz, Niere und Lunge nach Treg-Zelldepletion ist in Abbildung 42 zusammengefasst. In Milz und Lunge von kontrollimmunisierten und immunisierten Mäusen führte die Treg-Depletion zu einem deutlichen Anstieg der Frequenzen der IFN γ -Produzenten. Für die IL-17A-Produzenten wurden nur minimale Veränderungen beobachtet. In den Nieren führte die Treg-Depletion zu einer Abnahme der IL-17A-Produzenten, sowohl in kontrollimmunisierten als auch in immunisierten Mäusen. Die Frequenzen der IFN γ -Produzenten waren in den depletierten Kontrollmäusen erniedrigt und blieben in den immunisierten Tieren konstant. Berücksichtigt man aber die deutlich veränderten Frequenzen der CD4⁺ T-Zellen nach einer Treg-Zelldepletion (siehe Abb. 41), so kann selbst bei leicht niedrigeren oder ähnlichen Frequenzen an IL-17A- und IFN γ -Produzenten noch von einer Zunahme dieser Zellen in diesen Nieren ausgegangen werden.

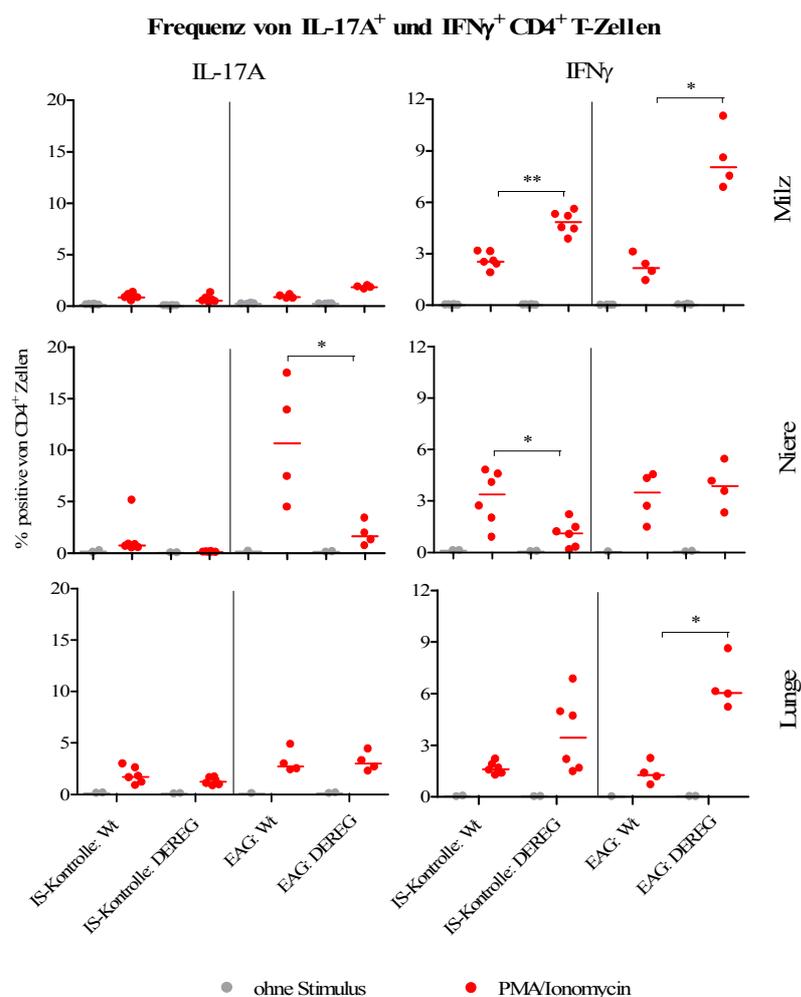


Abb. 42: Funktionale Charakterisierung von CD4⁺ T-Zellen nach Depletion der Treg-Zellen. Das Zytokinprofil der CD4⁺ T-Zellen wurde aus kontrollimmunisierten und EAG-Mäusen mittels FACS-Analyse nach intrazellulärer Färbung von IL-17A und IFN γ bestimmt. Die Zellen wurden vorher *in vitro* polyklonal mit PMA + Ionomycin stimuliert. Die Frequenz der Zytokinproduzenten ist als Prozentwert der CD4⁺ T-Zellen angegeben. Für die Inkubation ohne Stimulation wurden z.T. Nierenzellen aus mehreren Mäusen vereint. PMA + Ionomycin-Werte repräsentieren immer die Ergebnisse individuell analysierter Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. IS-Kontrolle: Immunisierungskontrolle nach 14 Wochen. *P < 0,05; **P < 0,01.

Die Ergebnisse der Akkumulation von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen sowie das Zytokinprofil der CD4⁺ T-Zellen während der EAG zeigten in den DTX-behandelten DEREK-Mäusen Unterschiede gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe. Die Depletion der Treg-Zellen hatte aber keine Auswirkungen auf die Antikörperproduktion und die Verminderung der Nierenfunktion. Auch in der Histologie zeigten sich keine deutlichen Unterschiede in der Schädigung der Niere (Daten nicht gezeigt) zwischen der depletierten Gruppe und der Kontrollgruppe. Abschließend kann gesagt werden, dass in dem hier verwendeten EAG-Modell, Treg-Zellen zumindest zum späten Zeitpunkt keinen deutlich nachweisbaren Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen.

4.5 $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische CD4^+ T-Zellantwort im EAG-Mausmodell

In dem hier verwendeten Mausmodell der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis wurden hochaktivierte CD4^+ T-Zellen in der Niere nachgewiesen. Anhand ihres Zytokinprofils konnte ein Teil dieser Zellen als Th1- und Th17-Zellen identifiziert werden. Unsere Ergebnisse erlauben bisher aber keine Aussage zur Spezifität dieser CD4^+ T-Zellen.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollten Testsysteme zum Nachweis von spezifischen T-Zellen etabliert werden, um dann mit diesen Tests die $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische CD4^+ T-Zellantwort im EAG-Modell zu untersuchen. Für diese Serie von Experimenten wurde ein modifiziertes EAG-Modell verwendet, in dem die Mäuse nicht mit dem humanen- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, sondern mit dem Maus- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ immunisiert wurden. Aus Vorarbeiten eines Kooperationspartners war bekannt, dass die Immunisierung mit m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ gegenüber der Immunisierung mit h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ einen um etwa zwei Wochen verzögerten, ansonsten aber vergleichbaren Krankheitsverlauf verursacht.

4.5.1 Induktion der EAG mit Maus- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$

In Vorversuchen wurden Milzzellen von m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ immunisierten Tieren mit m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ *in vitro* restimuliert und die spezifische Immunantwort mittels Proliferationstest, $\text{IFN}\gamma$ -ELISA und $\text{IFN}\gamma$ -ELISpot untersucht. In diesen Experimenten zeigte nur der $\text{IFN}\gamma$ -ELISpot eine ausreichende Sensitivität und Reproduzierbarkeit. Die Ergebnisse dieser ELISpot-Analysen sind im Nachfolgenden gezeigt.

Für das folgende Experiment wurden drei männliche Mäuse mit 30 μg rekombinantem m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ in KFA s.c. immunisiert. Die Mäuse der Kontrollgruppe erhielten PBS in KFA s.c. injiziert. Die Tiere wurden 11 Tage nach Immunisierung getötet und deren Milz entnommen. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 43 gezeigt.

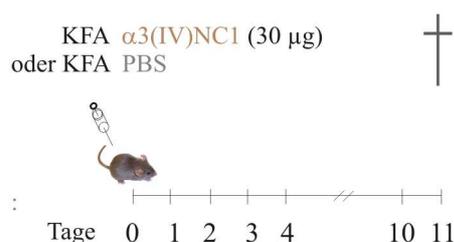


Abb. 43: Immunisierung mit m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. Für das Experiment wurden drei männliche DBA/1J-Mäuse mit 30 μg rekombinantem Maus- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ in komplettem Freundschens Adjuvans s.c. immunisiert. In der Kontrollgruppe wurden drei männliche DBA/1J-Mäuse mit PBS in komplettem Freundschens Adjuvans s.c. behandelt. Den Tieren wurde an Tag 11 die Milz entnommen.

Für den ELISpot wurden Milzzellen der immunisierten Mäuse und der Kontrollmäuse in mit anti- $\text{IFN}\gamma$ mAk beschichteten Platten inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde hierbei mit $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ stimuliert. Als Positivkontrolle diente eine polyklonale Stimulation durch einen anti- CD3 mAk. Nach 3 Tagen wurden die Platten entwickelt und die Anzahl der $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten anhand der Spots ermittelt. Bei den anti- CD3 mAk-Kontrollen war die Dichte der Spots normalerweise so hoch, dass eine Auswertung nicht möglich war. Das Ergebnis ist in Abbildung 44 dargestellt.

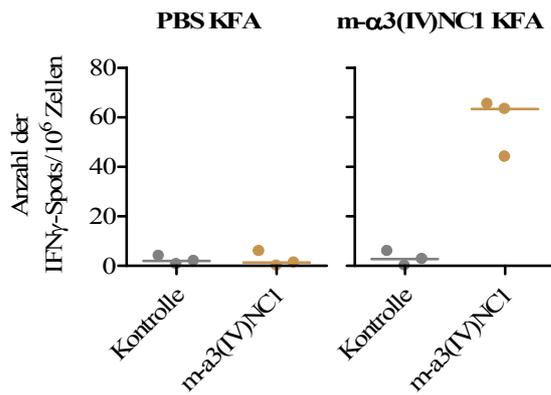


Abb. 44: Nachweis der IFN γ -Produktion von α 3(IV)NC1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus der Milz immunisierter Mäuse im ELISpot. Milzzellen von immunisierten Mäusen und Kontrollmäusen wurden *in vitro* für 3 Tage jeweils mit m- α 3(IV)NC1 und ohne Stimulus inkubiert. Dargestellt ist die Anzahl der IFN γ -produzierenden Zellen bzw. IFN γ -Spots bezogen auf 1×10^6 Milzzellen. Die Punkte repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse gemittelt aus einer Dreifachbestimmung. Die Querbalken geben den Median an.

In den Milzen der Kontrollmäuse führte die Inkubation mit und ohne m- α 3(IV)NC1 zu einer vergleichbar niedrigen Zahl an IFN γ -Spots (< 2 Spots/ 1×10^6 Zellen). Ohne Stimulation zeigten sich ebenfalls sehr niedrige Zahlen an IFN γ -Spots in den Milzzellen der immunisierten Mäuse. Die Inkubation mit m- α 3(IV)NC1 führte aber zu einem deutlichen Anstieg an IFN γ -Spots auf Werte von etwa 60 Spots/ 1×10^6 Zellen. Geht man von etwa 20% CD4⁺ T-Zellen in der Milz aus, bedeutet dieses Ergebnis, dass etwa eine in 3000 CD4⁺ T-Zellen spezifisch für m- α 3(IV)NC1 wäre.

4.5.2 Induktion der EAG mit dem immundominanten Peptid P71

In Vorarbeiten eines Kooperationspartners konnte ein potentiell immundominantes Peptid (P71, AS 208-222) aus dem Maus- α 3(IV)NC1 in einem Epitop-Scan mittels Peptidbibliothek identifiziert werden. Im nachfolgenden Experiment sollte nun getestet werden, ob die Immunisierung mit m- α 3(IV)NC1 bzw. mit dem P71-Peptid zu einer P71-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort führt.

Für das Experiment wurden je drei männliche Mäuse mit 30 μ g rekombinatem m- α 3(IV)NC1 oder mit 200 μ g Peptid P71 in KFA s.c. immunisiert. Um die T-Zellantwort zu verstärken, wurden die Tiere mit der gleichen Menge an m- α 3(IV)NC1 bzw. Peptid in IKA nach 3 Wochen boosterimmunisiert. Eine Woche später wurden die Milzzellen analysiert. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 45 gezeigt.

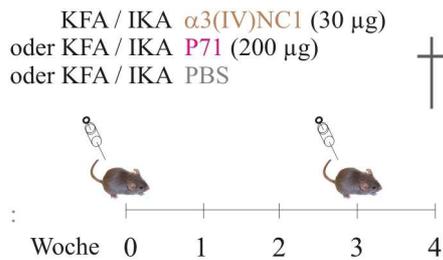


Abb. 45: Immunisierung mit dem immundominanten Peptid P71. Für das Experiment wurden je drei männliche DBA/1J-Mäuse mit 30 μg rekombinantem Maus- $\alpha 3(IV)NC1$ oder 200 μg Peptid P71 in komplettem Freundschens Adjuvans s.c. immunisiert. In Woche 3 erfolgte die Boosterimmunisierung s.c. in inkomplettem Freundschens Adjuvans. In der Kontrollgruppe erhielten drei männliche DBA/1J-Mäuse PBS in KFA in Woche 0 sowie PBS in IFA in Woche 3. Den Tieren wurde 4 Wochen nach Erstimmunisierung die Milz entnommen. Eine Maus der Kontrollgruppe verstarb aus unbekanntem Grund kurz nach der Boosterimmunisierung.

Zur Identifizierung der spezifischen T-Zellen wurde der in Abschnitt 3.11 beschriebene $IFN\gamma$ -ELISpot-Test verwendet. Die Zellen wurden mit $\alpha 3(IV)NC1$ und zusätzlich mit dem Peptid P71 und einem Kontrollpeptid (P15: m- $\alpha 3(IV)NC1$ AS 40-54) inkubiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 46 dargestellt.

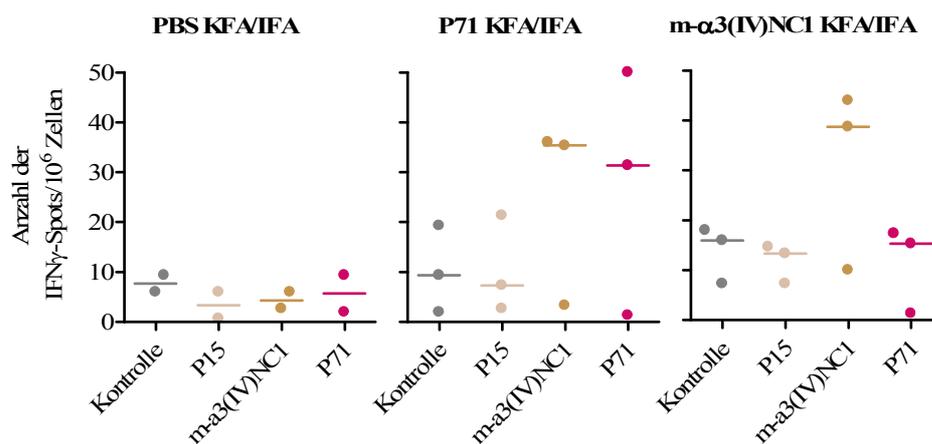


Abb. 46: Nachweis der $IFN\gamma$ -Produktion von $\alpha 3(IV)NC1$ - und P71-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen aus der Milz immunisierter Mäuse im ELISpot. Milzzellen von $\alpha 3(IV)NC1$ - und P71-immunisierten Mäusen sowie von mit PBS-behandelten Kontrollmäusen wurden *in vitro* für 3 Tage jeweils mit m- $\alpha 3(IV)NC1$, Peptid P71, Kontrollpeptid P15 und ohne Stimulus inkubiert. Dargestellt ist die Anzahl der $IFN\gamma$ -produzierenden Zellen bzw. $IFN\gamma$ -Spots bezogen auf 1×10^6 Milzzellen. Die Punkte repräsentieren die Werte individuell analysierter Mäuse gemittelt aus einer Dreifachbestimmung. Die Querbalken geben den Median an.

Bei den Milzzellen der Kontrollmäuse lag die Zahl der $IFN\gamma$ -Spots, unabhängig vom Stimulus, bei Werten unter 10. In den Milzzellen der mit P71-immunisierten Tiere konnte sowohl nach Stimulation mit P71- als auch mit m- $\alpha 3(IV)NC1$ ein Anstieg an $IFN\gamma$ -Spots gezeigt werden (ca. 30 Spots/ 1×10^6 Zellen). Die Inkubation mit dem Kontrollpeptid P15 führte zu keinem Anstieg. In den Milzzellen der mit m- $\alpha 3(IV)NC1$ immunisierten Tiere wurde nach Stimulation mit m- $\alpha 3(IV)NC1$ eine erhöhte Zahl an $IFN\gamma$ -Spots beobachtet, erstaunlicherweise zeigte sich aber kein Anstieg nach Inkubation mit dem P71-Peptid.

Zusammenfassend konnten im $IFN\gamma$ -ELISpot-Test m- $\alpha 3(IV)NC1$ -spezifische T-Zellen in den Milzen von mit m- $\alpha 3(IV)NC1$ -immunisierten Mäusen und P71-spezifische T-Zellen in Milzen von mit P71-immunisierten Mäusen nachgewiesen werden. Nach der P71-Immunisierung wurden auch $\alpha 3(IV)NC1$ -spezifische T-Zellen gefunden, der Nachweis von

P71-spezifischen T-Zellen gelang aber nicht nach $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Immunisierung. Die Gründe hierfür sind unklar. Insgesamt fanden sich mit einer in 17.000 - 33.000 Milzzellen nur sehr niedrige Frequenzen an spezifischen Zellen. Bezogen auf die CD4^+ T-Zellen ergeben sich Werte von einer in 3.000 - 7.000 Zellen. Wobei dieser Wert mit Vorsicht zu betrachten ist, da eine Produktion von $\text{IFN}\gamma$ durch CD8^+ T-Zellen nicht ausgeschlossen werden kann.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Mausmodells für die anti-GBM-Glomerulonephritis. In diesem Modell der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis (EAG) (Hopfer *et al.*, 2003) sollten dann verschiedene Aspekte der Pathogenese und der Immunantwort untersucht werden. Schwerpunkt waren die generelle Rolle der CD4⁺ T-Zellen sowie die Funktion der Th17-Zellen und der Treg-Zellen. Weiterhin sollte versucht werden autoreaktive T-Zellen direkt in der Maus nachzuweisen. Unsere zentrale Hypothese war, dass CD4⁺ T-Zellen den Verlauf der Erkrankung und den damit verbundenen Nierenschaden beeinflussen.

Aus den Experimenten im EAG-Mausmodell ergaben sich drei wichtige Ergebnisse:

1. Das EAG-Modell zeigte einen zweiphasigen Verlauf. In den ersten Wochen nach Immunisierung entwickelten die Tiere eine schwere Proteinurie und zeigten eine deutliche Antikörperantwort mit hohen Plasmatitern an $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen Antikörpern und einer Ablagerung von Antikörpern und Komplement entlang der Basalmembranen. Erst zu sehr späten Zeitpunkten bildete sich eine schwere Nierenentzündung, gekennzeichnet durch eine Halbmondbildung und einen fulminanten tubulointerstitiellen Schaden.
2. Im Endstadium der EAG konnte eine massive Akkumulation von Makrophagen und aktivierten Th1- und Th17-Lymphozyten in den Nieren nachgewiesen werden.
3. Nach Immunisierung mit m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ und dem m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Peptid P71 konnten spezifische IFN γ -produzierende T-Zellen in der Milz nachgewiesen werden.

Bisher konnten wir keinen Einfluss von Th17-Zellen und Treg-Zellen auf den Krankheitsverlauf nachweisen, dieses Ergebnis bedarf weiterer Analysen, um eine sichere Aussage treffen zu können.

5.1 Krankheitsverlauf der EAG

Die Immunisierung der DBA/1J-Mäuse mit h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ führte ab Woche 5 zu einer Antikörperablagerung entlang der GBM und ab Woche 6 entwickelten die Tiere eine fortschreitende Proteinurie. Bis Woche 8 zeigten die Mäuse aber nur geringe pathologische Veränderungen im Glomerulum und Tubulointerstitium. Erst ab Woche 9 konnten glomeruläre Halbmonde in der Bowman-Kapsel nachgewiesen werden. Bis Woche 13 zeigten alle Tiere diese schwere Nierenschädigung und mussten aufgrund der Erkrankung getötet werden. Insgesamt ergibt sich ein Verlauf, der lange histologisch unauffällig ist und dann in eine kurze finale Phase übergeht, in der sich die schwere Nierenschädigung ausbildet. Der Übergang in diese finale Phase findet vermutlich innerhalb von wenigen Tagen statt.

Insgesamt ähnelt unser Modell sehr den Umständen der humanen anti-GBM-GN. In Patienten werden zirkulierende und abgelagerte Autoantikörper spezifisch für das $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Autoantigen nachgewiesen. Weiterhin zeigen die Glomeruli meist ein ähnliches Stadium der Halbmondbildungen. Dies deutet daraufhin, dass auch hier die Halbmondbildung kein chronischer Prozess ist, der über mehrere Wochen verläuft, sondern dass auch hier die Schädigung innerhalb weniger Tage abläuft (Pettersson *et al.*, 1984; Reynolds *et al.*, 2005; Kuhlmann *et al.*, 2008; Peto & Salama, 2011; Roth und Falk, 2011).

Unser Modell unterscheidet sich deutlich von anderen Glomerulonephritis-Modellen. Kitching *et al.* beobachten nach der EAG-Induktion in C57BL/6-Mäusen einen sehr milden Verlauf der GN. Dieser ist verbunden mit einer geringen Halbmondbildung und milden glomerulären sowie interstitiellen Leukozyteninfiltration (Kitching *et al.*, 2004). Die Halbmondbildung ist in nur etwa 2% der Glomeruli in drei von acht Mäusen aufgetreten. Im Modell der Nephrotoxischen Nephritis (NTN), in dem Mäuse mit anti-GBM-Antikörpern aus

dem Schaf behandelt werden, beschreiben Panzer und Mitarbeiter zwar schwerwiegende glomeruläre und tubulointerstitielle Schäden mit massiven renalen Leukozyteninfiltrationen, der Krankheitsverlauf ist hier aber auf zwei bis drei Wochen begrenzt (Panzer *et al.*, 2007). Schließlich ergeben Untersuchungen von Reynolds *et al.* in Wistar-Kyoto (WKY)-Ratten zwar einen schwerwiegenden Verlauf der GN mit Halbmondbildungen in 85% der Glomeruli, dieses Modell unterscheidet sich aber deutlich in der Nierenpathologie von der humanen Erkrankung und unserem EAG-Modell (siehe unten; Reynolds *et al.*, 1998; Reynolds *et al.*, 2005).

5.2 Spezifische Antikörperantwort in EAG-Mäusen

Bereits zwei Wochen nach Immunisierung der DBA/1J-Mäuse konnten Antikörper gegen das Human- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Peptid nachgewiesen werden. Die Antikörper erreichten nach 4 Wochen sehr hohe Titer. Die Titer der h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Antikörper fielen bis zum Endzeitpunkt der EAG wieder ab. Wahrscheinlich beruhte dies auf einer Ausscheidung durch die defekte Niere. Diese Hypothese wurde durch den Nachweis von h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Antikörpern im Urin unterstützt. In den Mäusen zeigten die Seren eine Kreuzreaktivität gegenüber dem Maus- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. Weiterhin konnten Antikörperablagerungen entlang der GBM ab Woche 5 nachgewiesen werden, beides Hinweise für die Induktion von echten Autoantikörpern gegen das Maus- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$.

Eine nähere Analyse der Antikörperablagerung in der Niere zeigte sowohl eine lineare als auch granuläre Ablagerung entlang der GBM (Hopfer *et al.*, 2003). Lineare Ablagerungen gelten als ein Hinweis auf eine direkte Bindung von Antikörpern an die GBM. Im Gegensatz dazu weist die granuläre Färbung auf eine Ablagerung von zirkulierenden Immunkomplexen oder auf eine *in situ* Bildung von Immunkomplexen im Gewebe hin. In der humanen anti-GBM-GN finden sich typischerweise lineare Ablagerungen, es werden aber auch Fälle mit granulärer Ablagerung beobachtet (Pettersson *et al.*, 1984; Kuhlmann *et al.*, 2008). Um die Ursache der granulären Ablagerung zu untersuchen, wurde Plasma der Tiere mittels ELISA auf zirkulierende Immunkomplexe untersucht. Größere Mengen von Immunkomplexen konnten aber nicht detektiert werden, was eine Ablagerung von Immunkomplexen weitgehend ausschließt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Hopfer *et al.* und Zhang *et al.* zeigen jedoch subepitheliale Immunablagerungen innerhalb der GBM in immunisierten DBA/1J-Mäusen. Eine *in situ* Immunkomplexbildung kann daher nicht ausgeschlossen werden (Hopfer *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2012).

Auch in diesem Aspekt unterscheidet sich unser DBA/1J-EAG-Modell von anderen Modellen. Zum Beispiel beobachteten Kitching *et al.* in ihrem EAG-Modell in C57BL/6-Mäusen ausschließlich lineare Antikörperablagerungen (Kitching *et al.*, 2004). Andererseits führt eine Immunisierung von Ratten mit gereinigten NC1-Komplexen aus Schaf-GBM zu linearen und granulären Antikörperablagerungen (Reynolds *et al.*, 1998). Die Mechanismen der unterschiedlichen Ablagerungstypen sind bisher unklar.

Schließlich wurden die IgG-Ablagerungen in der Niere noch auf ihren Isotyp hin analysiert. Es konnten Ablagerungen von IgG1, IgG2a und IgG2b nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen von Hopfer *et al.* und Zhang *et al.*, die im gleichen Modell Maus- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische Antikörper dieser Immunglobulin-Subklassen nachweisen konnten (Hopfer *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2012). Der Nachweis von IgG ist außerdem ein wichtiger Hinweis für die Beteiligung von T-Zellen an der Antikörperentstehung, da ein Klassenwechsel von IgM nach IgG nur mit T-Zellhilfe effizient abläuft.

Die Rolle der Antikörper in der EAG wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. In der humanen anti-GBM-GN ist die Erkennung von kryptischen Epitopen von $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, den Goodpasture-Epitopen, entscheidend. Im Menschen sind die Mechanismen der Entstehung von Autoantikörpern gegen diese Epitope unklar. Auch die Wirkmechanismen der Autoantikörper sind nur unzureichend geklärt. In der GBM bilden die NC1-Domänen Hexamere, die durch S=N-Verbindungen stabilisiert werden und in denen das GP-Epitop für Antikörper nicht frei zugänglich ist (Luo *et al.*, 2010; Vanacore *et al.*, 2011). Untersuchungen von Borza *et al.* zeigen für die menschlichen Nieren, dass GBM-Hexamere dissoziieren können. Die bessere Zugänglichkeit der GP-Epitope spielt dann vermutlich eine wichtige Rolle bei der anti-GBM-GN (Borza *et al.*, 2005). Die Ausbildung der S=N-Verbindungen in der Maus scheint sehr viel umfassender zu sein, mit der Folge, dass es wahrscheinlich nur sehr wenige freie GP-Epitope gibt (Luo *et al.*, 2010). In den Mausmodellen sowie auch in den Rattenmodellen ist wahrscheinlich eine Störung der GBM mit einer Freilegung der GP-Epitope eine Voraussetzung für die Entstehung der Nierenschäden (Bolton *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

5.3 Renale Lymphozyteninfiltration in EAG-Mäusen

Sowohl in der immunhistologischen Analyse, die von unserem Pathologen durchgeführt wurde, als auch in der Durchflusszytometrie konnte eine Infiltration von inflammatorischen Zellen in die Niere nachgewiesen werden. Hierfür ergab sich aber ein biphasischer Verlauf. Bis etwa Woche 8 - 10 wurden nur geringe Zeichen einer Entzündung mit einer marginalen Infiltration von Leukozyten beobachtet. In der darauf folgenden Phase kam es zu einer fulminanten renalen Infiltration. Diese war gekennzeichnet durch eine Halbmondbildung in den Glomeruli und einer schweren tubulointerstitiellen Entzündung, die innerhalb weniger Tage zum Funktionsverlust der Nieren führte. Sowohl die durchflusszytometrische als auch die immunhistochemische Untersuchung ergab, dass diese massive Infiltration überwiegend aus Makrophagen bestand. Zusätzlich konnte ein Anstieg von T-Zellen gezeigt werden. Makrophagen reicherten sich in den Glomeruli (Daten nicht gezeigt) und im Interstitium an. Im Gegensatz dazu konnte für T-Zellen nur eine Anreicherung im Interstitium nachgewiesen werden. Die in unserem Modell beobachtete Infiltration entspricht zum Teil der, die in Nierenbiopsien von Patienten mit anti-GBM-GN beobachtet werden. In einigen Patienten werden T-Zellen ebenfalls im Glomerulum gefunden (Bolton *et al.*, 1987; Nolasco *et al.*, 1987).

Unser Modell unterscheidet sich demgegenüber von einem EAG-Rattenmodell, in dem der Influx von Makrophagen und auch T-Zellen vor allem für das Glomerulum beschrieben wird (Reynolds *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2005).

5.4 Phänotypische und funktionale Charakterisierung von renalen T-Zellen in EAG-Mäusen

Die Mehrfarbenanalyse in der Durchflusszytometrie erlaubte eine nähere Charakterisierung der infiltrierenden T-Zellen. CD4^+ T-Zellen zeigten in gesunden Nieren, nicht aber in Lunge und Milz, eine deutliche $\text{CD44}^{\text{hoch}} \text{CD62L}^-$ -Population. In den EAG-Tieren hatten beinahe alle renalen CD4^+ T-Zellen diesen Phänotyp. Der $\text{CD44}^{\text{hoch}} \text{CD62L}^-$ -Phänotyp kennzeichnet aktivierte T-Zellen. In der entzündeten Niere fand eine Akkumulation von aktivierten CD4^+ T-Zellen statt. Hervorzuheben ist auch, dass sich die renalen CD4^+ T-Zellen in diesem Phänotyp deutlich von den T-Zellen in Milz und Lunge unterscheiden. Die T-Zellen im Blut und Milz verhalten sich phänotypisch sehr ähnlich. Dieses Ergebnis bedeutet auch, dass die

isolierten CD4⁺ T-Zellen wirklich aus Nierengewebe stammen und nur in geringem Umfang durch im Blut zirkulierende Zellen kontaminiert wurden. Der direkte Vergleich von isolierten Zellen aus Blut und Niere ergab ein vergleichbares Resultat. Diese Daten wurden in dieser Arbeit nicht gezeigt.

Aus den Nieren isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden auch mit PMA und Ionomycin polyklonal aktiviert und dann nach intrazellulärer Antikörperfärbung deren Zytokinprofil bestimmt. Die Analysen umfassten die Zytokine IFN γ und IL-17A, wobei IFN γ das Leitzytokin für Th1-Zellen und IL-17A das Leitzytokin für Th17-Zellen ist. In vielen humanen und experimentellen Autoimmunerkrankungen werden Th1-Zellen für eine zellvermittelte Gewebeschädigung verantwortlich gemacht (Schwartz *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2002; Odobasic *et al.*, 2007; Tipping & Holdsworth, 2006; Phoon *et al.*, 2008; Paust *et al.*, 2009). Mit den vor einigen Jahren entdeckten Th17-Zellen wurde eine weitere Th-Subpopulation beschrieben. Diese nimmt ebenfalls eine wichtige Rolle bei humanen und experimentellen Autoimmunerkrankungen ein, wie z.B. bei der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), der Experimentellen Autoimmunen Uveoretinitis (EAU) und der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) (Chabaud *et al.*, 1999 ; Matuszewicz *et al.*, 1999; Nakae *et al.*, 2003; Hofstetter *et al.*, 2005; Komiyama *et al.*, 2006; Luger *et al.*, 2008).

Nach polyklonaler Stimulation konnten IFN γ - und IL-17A-produzierende CD4⁺ T-Zellen in der Niere nachgewiesen werden, welche auf die Anwesenheit von Th1- und Th17-Zellen schließen lassen. Th1-Zellen konnten bereits zu frühen Zeitpunkten nach Immunisierung in den Nieren nachgewiesen werden und die Zahl der Zellen stieg kontinuierlich im Verlauf der Erkrankung an. Durch die Produktion von bestimmten Chemokinen können T-Zellen Makrophagen rekrutieren und IFN γ führt zusammen mit Tumornekrosefaktor- α (TNF α) zu einer Aktivierung dieser Zellen (Geng & Hansson, 1992). Eine renale Th1-Antwort würde daher auch sehr gut zu der von Makrophagen dominierten Entzündung in den EAG-Nieren passen.

Ein Anstieg der Th17-Zellen wurde ausschließlich zum Endzeitpunkt der EAG detektiert. Th17-Zellen stehen in Verbindung mit der Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene und verstärken unter anderem durch IL-17A die Mobilisierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die entzündeten Gewebe (Romagnani *et al.*, 2009). In unserem Modell beobachteten wir zu keinem Zeitpunkt eine deutliche Anreicherung von Granulozyten. Die Funktion der Th17-Zellen in der Niere ist daher unklar.

5.5 Einfluss verschiedener CD4⁺ T-Zellsubpopulationen auf die Immunantwort im EAG-Modell

Wie zuvor aufgeführt, weisen zahlreiche Studien auf eine Funktion von T-Zellen in der Entstehung und dem Verlauf der anti-GBM-GN und dem Goodpasture-Syndrom hin. Auch in unserem Modell wurde eine Anreicherung von aktivierten T-Zellen in der Niere beobachtet. Die Funktion von T-Zellen in der anti-GBM-GN und dem Goodpasture-Syndrom ist aber nach wie vor unklar.

Um die Rolle von CD4⁺ T-Zellen näher zu charakterisieren, wurden im EAG-Mausmodell Zellablationsexperimente und Experimente mit gendefizienten Mäusen durchgeführt. Hierfür wurden die gendefizienten Mäuse auf den DBA/1J-Hintergrund zurückgekreuzt. Die Hypothese bei diesen Experimenten postuliert einen veränderten Verlauf der Erkrankung und den damit verbundenen Nierenschaden in den gendefizienten bzw. in den mit Antikörper-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren.

5.5.1 Einfluss von CD4⁺ T-Zellen auf die Immunantwort im EAG-Modell

Um die generelle Funktion von CD4⁺ T-Zellen auf die Entwicklung der EAG zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, in denen CD4⁺ T-Zellen mittels eines anti-CD4-Antikörpers aus den Mäusen entfernt wurden. Kurz vor Auftreten der ersten Nierenschäden in der späten Phase wurde die Gabe durchgeführt. Durch diesen Ansatz sollte die Ausbildung der Antikörperantwort nicht beeinflusst werden. Die Analyse richtet sich daher auf die Funktion der T-Zellen in der Phase mit der schweren Nierenschädigung.

Die Depletion der CD4⁺ T-Zellen mit dem anti-CD4-Antikörper wurde in den Mäusen ab einem Proteinwert im Urin von 300 mg/dl durchgeführt und alle sechs Tage wiederholt. Die Tiere wurden bis zum Auftreten von Zeichen der EAG behandelt und dann getötet. Der Erfolg der Depletion wurde mittels FACS-Analyse im peripheren Blut und zum Zeitpunkt der Analyse der Tiere in Milz, Lunge und Niere bestätigt.

Erstaunlicherweise führte die CD4-Depletion zu keiner Veränderung in der Nierenschädigung bezüglich der Parameter BUN, Halbmondbildung, Fibrinablagerung und tubulointerstitiellen Schaden im Vergleich zu den EAG-Kontrolltieren. Auf den ersten Blick würde dieses Ergebnis bedeuten, dass CD4⁺ T-Zellen nicht an der Schädigung der Niere in unserem EAG-Modell beteiligt sind. Eine Rolle der CD4⁺ T-Zellen kann aber trotz unseres Ergebnisses nicht ausgeschlossen werden. In unserem Ansatz wurde die CD4-Depletion zu einem sehr späten Zeitpunkt gewählt. Es kann daher sein, dass der Prozess der Nierenzerstörung bereits ein Stadium erreicht hat, das unabhängig von CD4⁺ T-Zellen ist. Weiterhin ist möglich, dass mit dem Einsatz des anti-CD4 mAk nicht nur pathogene CD4⁺ T-Zellen, sondern auch schützende T-Zellen, wie z.B. regulatorische T-Zellen entfernt werden und somit ein schützender Effekt aufgehoben wird. Aufgrund dieser Annahmen wäre es sinnvoll Tiere zu untersuchen, in denen mit der CD4-Depletion zu einem früheren Zeitpunkt begonnen wird.

Für eine Rolle der CD4⁺ T-Zellen in der Nierenschädigung sprechen auch die Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen. Reynolds und Pusey können im EAG-Rattenmodell mit einer anti-CD4-Therapie eine Erkrankung verhindern (Reynolds & Pusey, 1994). Huang *et al.* erzielen ein ähnliches Ergebnis im NTN-Rattenmodell. Die CD4-Depletion in der Effektorphase verhindert hier die glomeruläre Makrophagenrekrutierung und Halbmondbildung (Huang *et al.*, 1997). Andererseits kann in der Ratte allein durch einen passiven Transfer von Antikörpern aus kranken Tieren eine Glomerulonephritis in den Empfängertieren verursacht werden. In diesem Modell hatte die Behandlung mit anti-CD4-Antikörpern keinen Effekt auf die Rekrutierung von Makrophagen und Entzündung der Niere. Hierbei scheinen CD4⁺ T-Zellen nicht an der Nierenschädigung beteiligt zu sein (Huang *et al.*, 1994).

5.5.2 Einfluss von Th17-Zellen auf die Immunantwort im EAG-Modell

In experimentellen Modellen für die Glomerulonephritis, aber auch in der humanen Erkrankung gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Th17-Zellen am Krankheitsverlauf (Wong *et al.*, 2000; Abdulahad *et al.*, 2008; Crispin *et al.*, 2008; Doreau *et al.*, 2009; Gan *et al.*, 2010). Auch der Nachweis von IL-17A-produzierenden renalen CD4⁺ T-Zellen in unserem EAG-Modell deutet auf eine potentielle Funktion von Th17-Zellen in der Nierenschädigung. Die funktionelle Bedeutung der Th17-Zellen während der EAG wurde von uns sowohl durch eine Neutralisierung von IL-17A als auch in IL-17A-defizienten Tieren untersucht. Gegenüber der IL-17A-Neutralisierung kann in den IL-17A-Mäusen eine IL-17A-Wirkung komplett ausgeschlossen werden. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass die Mäuse in Abwesenheit von IL-17A kompensatorische Mechanismen entwickeln. Dementsprechend ergänzen sich die Experimente in IL-17A ko-Mäusen und in Mäusen mit IL-17A-

Neutralisierung. IL-17A ist ein zentrales Zytokin der Th17-Antwort, daher erlauben diese Experimente auch Aussagen zur generellen Funktion von Th17-Zellen in der Entwicklung der EAG.

Die IL-17A-Neutralisierung erfolgte bereits vor der ersten Immunisierung und wurde über den gesamten Versuchszeitraum einmal pro Woche wiederholt. In den Mäusen führte die IL-17A-Neutralisierung zu einer signifikanten Reduktion der neutrophilen Granulozyten in der Lunge. Da IL-17A die Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten unterstützt, bestätigt diese Beobachtung die Wirksamkeit der Neutralisierung. (Lindén *et al.*, 2005; Iwakura *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch in keinem der analysierten Parameter der EAG eine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe.

Auch in den IL-17A ko-Mäusen konnte keine Veränderung in den analysierten Parametern der EAG gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Somit bestätigten die Experimente mit IL-17A ko-Mäusen die Ergebnisse der IL-17A-Neutralisierung.

Unsere Ergebnisse stehen auch hier im Gegensatz zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Im NTN-Mausmodell von Paust und Mitarbeiter zeigen IL-17A ko-Mäuse eine weniger schwer entwickelte GN mit einer Verminderung des Nierenschadens, der Leukozytenrekrutierung, der BUN-Level und der Proteinurie (Paust *et al.*, 2009). Studien im NTN-Mausmodell von Odobasic *et al.* demonstrieren, dass IL-17A ko-Mäuse zu einem frühen Stadium der GN vor der Nierenentzündung geschützt sind. Im Gegensatz dazu entwickeln die Tiere zu einem späten Stadium der GN einen stärker ausgeprägten Nierenschaden, verbunden mit einer gesteigerten T-Zellakkumulation, Fibrinablagerung und Th1-Antwort im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (Odobasic *et al.*, 2011). Weiterhin wird für verschiedene Glomerulonephritis-Modelle beschrieben, dass IL-17A tubuläre und mesangiale Zellen zur Chemokinproduktion stimuliert, die eine Rekrutierung von T-Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten auslöst (Van Kooten *et al.*, 1998; Iyoda *et al.*, 2009; Paust *et al.*, 2009).

Das Zytokin IL-23 ist wichtig für die Stabilisierung der Th17-Antwort (Kastelein *et al.*, 2007). IL-23 ist ein Heterodimer und besteht aus einer p40- und p19-Untereinheit. Das Zytokin IL-12 spielt eine zentrale Rolle in der Th1-Differenzierung und verwendet die gleiche p40-Untereinheit in Kombination mit einer p35-Untereinheit. Tiere mit einer p40-Defizienz zeigen in vielen Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen, z.B. die EAE, ein Modell für die Multiple Sklerose, mildere Krankheitsverläufe. Auch für ein EAG-Modell wird eine verminderte Nierenschädigung beschrieben. Da in diesem Modell für IFN γ keine Funktion beobachtet wird, deutet dies auf eine wichtige Funktion von IL-23 im Krankheitsverlauf hin (Ferber *et al.*, 1996; Cua *et al.*, 2003; Kitching *et al.*, 2004). Diese Annahme wird in Experimenten mit p19-defizienten Mäusen bestätigt, die ebenfalls vor einer Glomerulonephritis geschützt sind (Cua *et al.*, 2003; Ooi *et al.*, 2009).

Im Hinblick auf unsere Ergebnisse wäre es daher sinnvoll auch Experimente mit IL-23p19-defizienten Mäusen durchzuführen. Da diese Tiere keine Th17-Antworten generieren können, würden Ergebnisse aus diesen Experimenten unsere Ergebnisse zur Funktion von IL-17A ergänzen. Auch eine Analyse der Rolle von Th1-Zellen in unserem EAG-Modell wäre interessant. Um diese Experimente durchzuführen, werden IL-23p19- und IFN γ R-defiziente Tiere zurzeit in unserem Labor auf den DBA/1J-Hintergrund zurückgekreuzt.

5.5.3 Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die Immunantwort im EAG-Modell

Neben nierenschädigenden CD4⁺ T-Zellen gibt es für die Glomerulonephritis auch Hinweise auf schützende CD4⁺ T-Zellen, wie z.B. die regulatorischen T-Zellen (Salama *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 2009; Bonelli *et al.*, 2010). Diese Treg-Zellen sind in der Maus durch eine selektive Expression gekennzeichnet. Die selektive Expression kann zum Nachweis von Treg-

Zellen verwendet werden. Für unser EAG-Modell gibt es ebenfalls Hinweise auf eine Beteiligung von Treg-Zellen am Krankheitsgeschehen. In histologischen Untersuchungen können FoxP3-positive Zellen in entzündeten Nieren nachgewiesen werden. In diesen Nieren finden sich erhöhte mRNA-Werte für IL-10 und FoxP3 (Hünemörder *et al.*, bisher nicht publizierte Ergebnisse).

Um die Funktion dieser Zellen in der EAG während der Effektorphase zu untersuchen, wurden DEREK-Mäuse (depletion of regulatory T cells) verwendet, welche für zehn Generationen auf den DBA/1J-Hintergrund zurückgekreuzt wurden. DEREK-Mäuse sind transgen für ein Genomfragment, welches das FoxP3-Gen und größere 5'- und 3'-Genombereiche enthält. In diesem Fragment wurde der für FoxP3 kodierende Bereich durch eine Sequenz ersetzt, die für ein Fusionsprotein aus dem humanen Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) und einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) kodiert. Dieses Fusionsprotein wird durch den noch im Transgen vorhandenen FoxP3-Promotor selektiv in Treg-Zellen exprimiert. Als Folge können Treg-Zellen über die Expression von GFP per FACS-Analyse identifiziert werden. Da Mäuse im Gegensatz zum Menschen relativ resistent gegenüber Diphtherietoxin (DTX) sind, können die DTR-transgenen Treg-Zellen weiterhin spezifisch durch eine Injektion von DTX entfernt werden (Lahl *et al.*, 2007).

Die Depletion der Treg-Zellen wurde in den DEREK-Mäusen ab Woche 8 durchgeführt und zweimal pro Woche wiederholt. Der Erfolg der Depletion wurde mittels FACS-Analyse des peripheren Blutes bestätigt. Die Tiere wurden bis zum Auftreten von Zeichen der EAG mit DTX behandelt und dann getötet.

Die Treg-Depletion hatte in den DTX-behandelten DEREK-Mäusen verschiedene Auswirkungen. Gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe zeigten die Tiere eine veränderte Akkumulation von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen in verschiedenen Geweben sowie ein verändertes Zytokinprofil der CD4⁺ T-Zellen. Im Gegensatz dazu hatte die Depletion der Treg-Zellen aber keine Auswirkungen auf die Antikörperproduktion und die Verminderung der Nierenfunktion in der EAG. Auch in der Histologie wurden keine deutlichen Unterschiede in der Schädigung der Niere zwischen der DTX-behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe gefunden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigte sich, dass in dem hier verwendeten EAG-Modell Treg-Zellen zumindest zum späten Zeitpunkt keinen nachweisbaren Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen.

Unsere Ergebnisse decken sich auch hier nicht mit denen anderer Arbeitsgruppen. Für das NTN-Mausmodell von Paust und Mitarbeiter wird berichtet, dass nach Treg-Depletion eine gesteigerte systemische und renale Expression von IFN γ sowie eine erhöhte Rekrutierung von IFN γ -produzierenden Th1-Zellen in die Niere stattfindet. Die erhöhte Th1-Antwort nach Treg-Depletion korreliert mit einem schwereren Verlauf der GN, gemessen an der Halbmondbildung innerhalb der Glomeruli (Paust *et al.*, 2011). Ein ähnliches Ergebnis im gleichen Modell wird von Ooi *et al.* beschrieben. Die Treg-Depletion resultiert hier in einer gesteigerten T-Zelleffektorantwort und einem verstärkten Nierenschaden. In Abwesenheit von Treg-Zellen zeigen Tiere eine erhöhte systemische T-Zellantwort, einschließlich einer ansteigenden IFN γ - und IL-17A-Produktion, jedoch keine Veränderung in den Antikörpertitern. Verglichen mit isolierten FoxP3⁺ Treg-Zellen von naiven Mäusen, produzieren Treg-Zellen immunisierter Mäuse vermehrt IL-10 und können dadurch effektiv CD4⁺ T-Effektorzellen regulieren (Ooi *et al.*, 2011).

Die Funktion von Treg-Zellen kann von Wolf und Mitarbeiter auch durch einen Transfer dieser Zellen aufgezeigt werden. In einem modifizierten NTN-Modell führt ein adoptiver Transfer von CD4⁺ CD25⁺ Treg-Zellen zu einer Abschwächung der durch ein anti-GBM-Kaninchenserum induzierten GN. Nach einer Analyse des mRNA-Levels von FoxP3

schlussfolgern die Autoren, dass die meisten der transferierten Treg-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe und nicht in die entzündeten Nieren einwandern (Wolf *et al.*, 2005).

5.6 $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische CD4^+ T-Zellantwort im EAG-Modell

Sowohl aus Patienten mit anti-GBM-GN als auch aus Tiermodellen für diese Erkrankung gibt es Hinweise auf eine spezifische T-Zellantwort gegen Epitope im $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. In Patienten mit Goodpasture-Syndrom konnten zwei immundominante $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Peptide $\alpha 3(71 - 90)$ und $\alpha 3(131 - 150)$ identifiziert werden, welche eine Produktion von $\text{IFN}\gamma$ in T-Zellen induzieren (Cairns *et al.*, 2003).

In Rattenmodellen für die anti-GBM-GN können ebenfalls spezifische T-Zellantworten demonstriert werden. In WKY-Ratten können nach Immunisierung mit Maus- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ für dieses Antigen spezifische T-Zellen in der Niere nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 2001). Weiterhin führt der Transfer von aus diesen Tieren gewonnenen $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen Th1-Zellen zu einer Glomerulonephritis in den Rezipienten. In den Rezipienten werden hierbei weder IgG- noch Komplement-Ablagerungen beobachtet (Wu *et al.*, 2002). Eine nähere Charakterisierung der T-Zellantwort in EAG-Ratten durch Reynolds und Mitarbeiter führte zur Identifizierung eines immundominanten Peptids $\alpha 3(24 - 38)$ im N-Terminus des $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Peptids. Die Immunisierung mit diesem Peptid induziert in Ratten eine anti-GBM-GN (Reynolds *et al.*, 2008). Lou *et al.* erzielten durch die Immunisierung von Ratten mit einem 24-mer Peptid $\alpha 3(28 - 51)$ vom N-Terminus des $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ eine milde Glomerulonephritis (Luo *et al.*, 2002). Demgegenüber zeigen Arbeiten von Wu und Kollegen, dass das 13-mer Peptid $\alpha 3(28 - 40)$ ein T-Zellepitop vom $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ enthält, welches eine schwere Glomerulonephritis in Ratten erzeugt (Wu *et al.*, 2003). In diesem Modell führt die Immunisierung mit dem T-Zellepitop $\alpha 3(28 - 40)$ auch zu einer anti-GBM-Antikörperbildung, die aber nicht gegen das $\alpha 3(28 - 40)$ -Peptid gerichtet ist. Man vermutet daher ein „Epitope-Spreading“, d.h. die Schädigung der GBM durch nephritogene T-Zellen führt zu einer Freisetzung von GBM-Bestandteilen, welche dann eine Autoantikörperantwort auslösen (Wu *et al.*, 2004; Bolton *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

Für das von uns verwendete DBA/1J-EAG-Modell konnten Hopfer und Mitarbeiter zeigen, dass Milzzellen nach *in vitro* Restimulation mit $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ $\text{IFN}\gamma$ produzieren (Hopfer *et al.*, 2003). Eine Stimulation dieser Milzzellen mit überlappenden 15-mer Peptiden des Maus- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ induzierte ebenfalls eine $\text{IFN}\gamma$ -Produktion. Hierdurch konnte das immundominante Peptid P71 ($\alpha 3(208 - 222)$) identifiziert werden (Hopfer *et al.*, bisher nicht publizierte Ergebnisse).

Im letzten Teil der Arbeit wurde versucht, dieses Ergebnis zu reproduzieren und die spezifische T-Zellantwort gegen das P71-Peptid bzw. gegen das komplette $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Peptid näher zu charakterisieren. Nach einer P71-Immunisierung fanden sich sowohl P71-spezifische als auch $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische T-Zellen in der Milz. Jedoch gelang der Nachweis von P71-spezifischen T-Zellen nicht nach $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Immunisierung. Insgesamt wurden nur sehr niedrige Frequenzen an $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen Zellen in der Milz beobachtet. Wir gehen bisher davon aus, dass in erster Linie CD4^+ T-Zellen für die spezifische $\text{IFN}\gamma$ -Produktion verantwortlich sind. Im ELISpot können aber CD8^+ T-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Neuere Arbeiten aus dem Labor, in dem ein Nachweis der spezifischen T-Zellen mittels FACS-Analyse durchgeführt wurde, bestätigen aber CD4^+ T-Zellen als $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten (Hünemörder *et al.*, bisher nicht publizierte Ergebnisse). Der Grund für die Diskrepanz zwischen der T-Zellantwort nach einer Immunisierung mit P71 und $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ ist unklar. Da P71 ein Teil des $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Peptids ist, sollten sowohl nach Immunisierung mit P71 als auch nach Immunisierung mit $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ jeweils P71- und $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -reaktive T-Zellen nachweisbar sein. Ein Grund für den fehlenden Nachweis an P71-spezifischen Zellen nach

$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Immunisierung könnte an der verteilten T-Zellantwort auf verschiedenen Epitopen des $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ liegen. Aufgrund dessen fällt vermutlich die Teilantwort gegen P71 unter die Nachweisgrenze unseres Testsystems. Zusätzlich könnten andere Epitope aus $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ die T-Zellantwort dominieren und die Antwort gegen das P71-Epitop abschwächen. Im Gegensatz dazu führt die Immunisierung nur mit P71 automatisch auf eine Fokussierung der T-Zellantwort auf dieses Epitop. Diese T-Zellen sollten dann auch auf das komplette $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ reagieren.

Interessant wären der Nachweis und die nähere Charakterisierung dieser $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen T-Zellen in EAG-Nieren. Hopfer *et al.* konnten bereits das Vorhandensein dieser Zellen in der Niere zeigen (Hopfer *et al.*, 2012). Die Funktion der spezifischen Zellen in der Nierenentzündung ist aber weiter unklar. Eine Untersuchung von Heymann und Mitarbeiter zeigt, dass renale dendritische Zellen glomeruläres Antigen den T-Helferzellen im Interstitium sowie in den drainierenden Lymphknoten präsentieren (Heymann *et al.*, 2009; Hochheiser *et al.*, 2011). In einem vergleichbaren Prozess könnte auch Material der geschädigten GBM in das Interstitium gelangen und dort zu einer Aktivierung von $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen T-Zellen führen. Die Aktivierung der T-Zellen würde zu einer Rekrutierung von weiteren Entzündungszellen und als Konsequenz zu einer interstitiellen Schädigung führen. Eine Aktivierung der T-Zellen im Interstitium könnte weiter erklären, warum wir eine Akkumulation von T-Zellen im Interstitium und nicht im Glomerulum sehen.

5.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das EAG-Modell in der DBA/1J-Maus im Labor etabliert werden. Nachfolgende Untersuchungen in diesem Modell zeigten eine Akkumulation von Th1- und Th17-Zellen in den entzündeten Nieren. In den Milzen der immunisierten Tiere gelang weiterhin der Nachweis von $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen T-Zellen.

Unsere Ergebnisse lassen bisher nur eingeschränkte Aussagen zur Funktion der CD4^+ T-Zellen in der Nierenschädigung zu. Die Depletion dieser Zellen zu einem späten Zeitpunkt führte zu keiner Veränderung des Krankheitsverlaufs. Hier wären sicher weitere Depletionsexperimente, insbesondere zu früheren Zeitpunkten, sinnvoll. Als Alternative könnten Transferexperimente durchgeführt werden, in denen T-Zellen aus erkrankten Tieren entweder separat oder in Kombination mit Antikörpern in gesunde Tiere übertragen werden und diese dann auf eine mögliche Nierenschädigung hin untersucht werden.

Trotz eines Nachweises von Th17-Zellen konnte keine Funktion von IL-17A in unserem Modell gezeigt werden. Um zu bestätigen, dass Th17-Zellen wirklich keine Bedeutung in unserem EAG-Modell haben, sind weitere Experimente notwendig. In jedem Fall sollten Tiere mit einer Defizienz in IL-23p19 in die Analysen aufgenommen werden. Aufgrund der mangelnden Bedeutung von Th17-Zellen treten Th1-Zellen in den Fokus. Für eine Funktion von Th1-Zellen spricht auch die deutliche Rekrutierung von Makrophagen in die entzündeten Nieren. Entscheidende Experimente wären hier Analysen von Tieren mit fehlender Th1-Zellfunktion, etwa $\text{IFN}\gamma^-$, $\text{IFN}\gamma\text{R}^-$ oder IL-12p35-defiziente Tiere.

Um eine Funktion von $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen T-Zellen in der Schädigung der Niere zu zeigen, wäre schließlich ein Nachweis dieser T-Zellen in der Niere erforderlich. Für diesen Nachweis wäre es aber erst einmal sinnvoll, sensitivere Methoden zur Identifizierung der Zellen zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

- Abdulahad WH, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CG.
Skewed distribution of Th17 lymphocytes in patients with Wegener's granulomatosis in remission.
Arthritis Rheum. 2008; 58: 2196-2205.
- Aumailley M, Pesch M, Tunggal L, Gaill F, Fässler R.
Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in β 1 integrin-deficient embryoid bodies.
J Cell Sci. 2000; 113: 259-268.
- Bolton WK, Benton FR, Lobo PI.
Requirement of functional T cells in the production of autoimmune glomerulotubular nephropathy in mice.
Clin exp Immunol. 1978; 33: 474-477.
- Bolton WK, Innes Jr DJ, Sturgill BC, Kaiser DL.
T cells and macrophages in rapidly progressive glomerulonephritis: clinicopathologic correlations.
Kidney Int. 1987; 44: 869-876.
- Bolton WK, May WJ, Sturgill BC.
Proliferative autoimmune glomerulonephritis in rats: a model for autoimmune glomerulonephritis in humans.
Kidney Int. 1993; 44: 294-306.
- Bolton WK, Chen L, Hellmark T, Wieslander J, Fox JW.
Epitope spreading and autoimmune glomerulonephritis in rats induced by a T-cell epitope of Goodpasture's antigen.
J Am Soc Nephrol. 2005; 16: 2657-2666.
- Bonelli M, Smolen JS, Scheinecker C.
Treg and lupus.
Ann Rheum Dis. 2010; 69 (Suppl. 1): i65-i66.
- Borza DB, Bondar O, Todd P, Sundaramoorthy M, Sado Y, Ninomiya Y, Hudson BG.
Quaternary organization of the goodpasture autoantigen, the α 3(IV) collagen chain: sequestration of two cryptic autoepitopes by intrapromoter interactions with the α 4 and α 5 NC1 domains.
J Biol Chem. 2002; 277: 40075-40083.
- Borza DB, Bondar O, Colon S, Todd P, Sado Y, Neilson EG, Hudson BG.
Goodpasture autoantibodies unmask cryptic epitopes by selectively dissociating autoantigen complexes lacking structural reinforcement.
J Biol Chem. 2005; 280: 27147-27154.

Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, Stassi G, Sireci G, Fournié JJ, Dieli F.

Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human V γ 9V δ 2 T cells. *Blood*. 2011; 118: 129-138.

Cairns LS, Phelps RG, Bowie L, Hall AM, Saweirs WW, Rees AJ, Barker RN.

The fine specificity and cytokine profile of T-helper cells responsive to the α 3 chain of type IV collagen in Goodpasture's disease.

J Am Soc Nephrol. 2003; 14: 2801-2812.

Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P.

Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium.

Arthritis Rheum. 1999; 42: 963-970.

Chen L, Hellmark T, Pedchenko V, Hudson BJ, Pusey CD, Fox JW, Bolton WK.

A nephritogenic peptide induces intermolecular epitope spreading on collagen IV in experimental autoimmune glomerulonephritis.

J Am Soc Nephrol. 2006; 17: 3076-3081.

Crispin JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC.

Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys.

J Immunol. 2008; 181: 8761-8766.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD.

Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain.

Nature. 2003; 421: 744-748.

Cunningham M, Huang XR, Dowling JP, Tipping P, Holdsworth S.

Prominence of cell-mediated immunity effectors in "pauci-immune" glomerulonephritis.

J Am Soc Nephrol. 1999; 10: 499-506.

Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE.

Use of Ly-6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice.

J Leukoc Biol. 2008; 83: 64-70.

Daly C, Conlon PJ, Medwar W, Walshe JJ.

Characteristics and outcome of anti-glomerular basement membrane disease: a single-center experience.

Ren Fail. 1996; 18: 105-112.

Dean EG, Wilson GRA, Li M, Edgton KL, O'Sullivan KM.

Experimental autoimmune Goodpasture's disease: a pathogenetic role for both effector cells and antibody in injury.

Kidney Int. 2005; 67: 566-575.

Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, Fabien N, Cochat P, Pouteil-Noble C, Trolliet P, Durieu I, Tebib J, Kassai B, Ansieau S, Puisieux A, Eliaou JF, Bonnefoy-Berard N.

Interleukin-17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus.

Nat Immunol. 2009; 10: 778-785.

Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman, Dalton D, Fathman CG.

Mice with a disrupted IFN γ gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

J Immunol. 1996; 156: 5-7.

Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS.

TGF- β induces FoxP3⁺ T-regulatory cells from CD4⁺ CD25⁻ precursors.

Am J Transplant. 2004; 4: 1614-1627.

Gan PY, Steinmetz OM, Tan DS, O'Sullivan KM, Ooi JD, Iwakura Y, Kitching AR, Holdsworth SR.

Th17 cells promote autoimmune anti-myeloperoxidase glomerulonephritis.

J Am Soc Nephrol. 2010; 21: 925-931.

Geng YJ, Hansson GK.

IFN γ inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages.

J Clin Invest. 1992; 89: 1322-1330.

Goodpasture EW.

The significance of certain pulmonary lesions in relation at the etiology of influenza.

Am J Med Sci. 1919; 158: 863-870.

Greten H.

Innere Medizin, 11. Auflage.

Thieme Verlag.

Stuttgart, 2002.

Haas M, Eustace J.

Immune complex deposits in ANCA-associated crescentic glomerulonephritis: a study of 126 cases.

Kidney Int. 2004; 65: 2145-2152.

Haller H, Gross WL.

Glomerulonephritis.

Internist. 2003; 44: 1073-1074.

Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X.

Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b.

Nat Immunol. 2010; 11: 734-742.

- Heymann F, Meyer-Schwesinger C, Hamilton-Williams EE, Hammerich L, Panzer U, Kaden S, Quaggin SE, Floege J, Gröne HJ, Kurts C.
Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury.
J Clin Invest. 2009; 119: 1286-1297.
- Hochheiser K, Engel DR, Hammerich L, Heymann F, Knolle PA, Panzer U, Kurts C.
Kidney dendritic cells become pathogenic during crescentic glomerulonephritis with proteinuria.
J Am Soc Nephrol. 2011; 22: 306-316.
- Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, Gold R.
Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis.
Cell Immunol. 2005; 237: 123-130.
- Hopfer H, Maron R, Butzmann U, Helmchen U, Weiner HL, Kalluri R.
The importance of cell-mediated immunity in the course and severity of autoimmune anti-glomerular basement membrane disease in mice.
FASEB J. 2003; 17: 860-868.
- Hopfer H, Holzer J, Hünemörder S, Paust HP, Sachs M, Meyer-Schwesinger C, Turner JE, Panzer U, Mittrücker HW.
Characterization of the renal CD4⁺ T-cell response in experimental autoimmune glomerulonephritis.
Kidney Int. 2012; 82: 60-71.
- Hopp TP, Prickett KS, Price V, Libby RT, March CJ, Cerretti P, Urdal DL, Conlon PJ.
A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification.
Biotechnology. 1988; 6: 1205-1210.
- Hori S.
Regulatory T-cell plasticity: beyond the controversies.
Trends Immunol. 2011; 32: 295-300.
- Huang XR, Holdsworth SR, Tipping PG.
Evidence for delayed-type hypersensitivity mechanisms in glomerular crescent formation.
Kidney Int. 1994; 46: 69-78.
- Huang XR, Tipping PG, Apostolopoulos J, Oettinger C, D'Souza M, Milton G, Holdsworth SR.
Mechanisms of T cell-induced glomerular injury in anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in rats.
Clin Exp Immunol. 1997; 109: 134-142.
- Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P.
Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice.
J Infect Dis. 2004; 190: 624-631.

Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG.
Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen.
N Engl J Med. 2003; 348: 2543-2556.

Igarashi Y, Kojima K, Oka M, Kaneko O, Hidaka S, Shimomura M, Nagase M, Sado Y.
Anti-GBM-associated crescentic glomerulonephritis with discrete IgG deposition, but with no electron-dense material in glomeruli.
Nephrol Dial Transplant. 1996; 11: 2070-2073.

Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H.
The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens.
Immunol Rev. 2008; 226: 57-79.

Iyoda M, Shibata T, Kawaguchi M, Hizawa N, Yamaoka T, Kokubu F, Akizawa T.
IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF- α and IL-1 β .
Am J Physiol Renal Physiol. 2009; 298: F779-F787.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M.
Immunologie, 5. Auflage.
Spektrum Akademischer Verlag.
Heidelberg/Berlin, 2002.

Jindal K.
Management of idiopathic crescentic and diffuse proliferative glomerulonephritis: evidence-based recommendations.
Kidney Int. 1999; 55: 33-40.

Kalluri R, Danoff TM, Okada H, Neilson EG.
Susceptibility to anti-glomerular basement membrane disease and Goodpasture syndrome is linked to MHC class II genes and the emergence of T cell-mediated immunity in mice.
J Clin Invest. 1997; 100: 2263-2275.

Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ.
Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation.
Annu Rev Immunol. 2007; 25: 221-242.

Kitching AR, Turner AL, Semple T, Li M, Edgton KL, Wilson G, Timoshanko JR, Hudson BG, Holdsworth S.
Experimental autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis: a protective role for IFN γ .
J Am Soc Nephrol. 2004; 15: 1764-1774.

Kitching AR, Turner AL, Wilson GR, Semple T, Odobasic D, Timoshanko JR, O'Sullivan KM, Tipping PG, Takeda K, Akira S, Holdsworth SR.
IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment.
J Am Soc Nephrol. 2005; 16: 2023-2033.

- Kluth D, Rees AJ.
Anti-glomerular basement membrane disease.
J Am Soc Nephrol. 1999; 10: 2446-2453.
- Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ.
The transcription factor T-bet controls regulatory T-cell homeostasis and function during type 1 inflammation.
Nat Immunol. 2009; 10: 595-602.
- Kohda T, Okada S, Hayashi A, Kanzaki S, Ninomiya Y, Taki M, Sado Y.
High nephritogenicity of monoclonal antibodies belonging to IgG2a and IgG2b subclasses in rat anti-GBM nephritis.
Kidney Int. 2004; 66: 177-86.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y.
IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.
J Immunol. 2006; 177: 566-573.
- Kuhlmann U, Walb D, Böhler J, Luft FC.
Nephrologie: Pathophysiologie - Klinik - Nierenersatzverfahren, 5. Auflage.
Georg Thieme Verlag.
Stuttgart, 2008.
- Kuhn A, Beissert S, Krammer PH.
CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in human lupus erythematosus.
Arch Dermatol Res. 2009; 301: 71-81.
- Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, Hamann A, Wagner H, Huehn J, Sparwasser T.
Selective depletion of FoxP3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease.
J Exp Med. 2007; 204: 57-63.
- Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC.
Local macrophage proliferation in the pathogenesis of glomerular crescent formation in rat anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis.
Clin Exp Immunol. 1997; 110: 233-240.
- Lebel SP, Chen Y, Gingras D, Chung AE, Bendayan M.
Morphofunctional studies of the glomerular wall in mice lacking entactin-1.
JHC. 2003; 51: 1467-1478.
- Lerner RA, Glassock RJ, Dixon FJ.
The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis.
J Exp Med. 1967; 126: 989-1004.
- Levy JB, Turner AN, Rees AJ, Pusey CD.
Long-term outcome of anti-glomerular basement membrane antibody disease treated with plasma exchange and immunosuppression.
Ann Intern Med. 2001; 134: 1033-1042.

- Lindén A, Laan M, Anderson GP.
Neutrophils, interleukin-17A and lung disease.
Eur Respir J. 2005; 25: 159-172.
- Luger D, Silver PB, Tang J, Cua D, Chen Z, Iwakura Y, Bowman EP, Sgambellone NM, Chan CC, Caspi RR.
Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category.
J Exp Med. 2008; 205: 799-810.
- Luo AM, Fox JW, Chen L, Bolton WK.
Synthetic peptides of Goodpasture's antigen in antiglomerular basement membrane nephritis in rats.
J Lab Clin Med. 2002; 139: 303-310.
- Luo W, Wang XP, Kashtan CE, Borza DB.
Alport alloantibodies but not Goodpasture autoantibodies induce murine glomerulonephritis: protection by quinary crosslinks locking cryptic $\alpha3(\text{IV})$ collagen autoepitopes in vivo.
J Immunol. 2010; 185: 3520-3528.
- Madaio MP, Harrington JT.
The diagnosis of glomerular diseases: acute glomerulonephritis and the nephrotic syndrome.
Arch Intern Med. 2001; 161: 25-34.
- Matusevicius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H.
Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis.
Mult Scler. 1999; 5: 101-104.
- Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y.
Antigen-specific T-cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses.
Immunity. 2002; 17: 375-387.
- Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y.
Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice.
J Immunol. 2003; 171: 6173-6177.
- Neale TJ, Tipping PG, Carson SD, Holdsworth SR.
Participation of cell-mediated immunity in deposition of fibrin in glomerulonephritis.
Lancet. 1988; 2: 421-424.
- Nilson B, Björck L, Akerström B.
Detection and purification of rat and goat immunoglobulin G antibodies using protein G-based solid-phase radioimmunoassays.
J Immunol Methods. 1986; 91: 275-281.

- Ninomiya Y, Kagawa M, Iyama K, Naito I, Kishiro Y, Seyer JM, Sugimoto M, Oohashi T, Sado, Y.
Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4 α 6 and COL4 α 5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies.
J Cell Biol. 1995; 130: 1219-1229.
- Nolasco FE, Cameron JS, Hartley B, Coelho A, Hildreth G, Reuben R.
Intraglomerular T cells and monocytes in nephritis: study with monoclonal antibodies.
Kidney Int. 1987; 31: 1160-1166.
- Odobasic D, Kitching AR, Semple TJ, Holdsworth SR.
Endogenous myeloperoxidase promotes neutrophil-mediated renal injury, but attenuates T-cell immunity inducing crescentic glomerulonephritis.
J Am Soc Nephrol. 2007; 18: 760-770.
- Odobasic D, Gan PY, Summers SA, Semple TJ, Muljadi RCM, Iwakura Y, Kitching AR, Holdsworth SR.
Interleukin-17A promotes early but attenuates established disease in crescentic glomerulonephritis in mice.
Am J Pathol. 2011; 179: 1188-1198.
- Ooi JD, Phoon RKS, Holdsworth SR, Kitching AR.
IL-23, not IL-12, directs autoimmunity to the goodpasture antigen.
J Am Soc Nephrol. 2009; 20: 980-989.
- Ooi JD, Snelgrove SL, Engel DR, Hochheiser K, Ludwig-Portugall I, Nozaki Y, O'Sullivan KM, Hickey MJ, Holdsworth SR, Kurts C, Kitching AR.
Endogenous FoxP3⁺ T-regulatory cells suppress anti-glomerular basement membrane nephritis.
Kidney Int. 2011; 79: 977-986.
- Orth SR, Ritz E.
The nephrotic syndrome.
N Engl J Med. 1998; 338: 1202-1211.
- Panzer U, Steinmetz OM, Paust HJ, Meyer-Schwesinger C, Peters A, Turner JE, Zahner G, Heymann F, Kurts C, Hopfer H, Helmchen U, Haag F, Schneider A, Stahl RA.
Chemokine receptor CXCR3 mediates T-cell recruitment and tissue injury in nephrotoxic nephritis in mice.
J Am Soc Nephrol. 2007; 18: 2071-2084.
- Panzer U, Kurts C.
T-cell cross-talk with kidney dendritic cells in glomerulonephritis.
J Mol Med. 2010; 88: 19-26.
- Paul WE, Zhu J.
How are Th2-type immune responses initiated and amplified.
Nature Reviews Immunology. 2010; 10: 225-235.

- Paust HJ, Turner JE, Steinmetz OM, Peters A, Heymann F, Hölscher C, Wolf G, Kurts C, Mittrücker HW, Stahl RA, Panzer U.
The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis.
J Am Soc Nephrol. 2009; 20: 969-979.
- Paust HJ, Ostmann A, Erhardt A, Turner JE, Velden J, Mittrücker HW, Sparwasser T, Panzer U, Tiegs G.
Regulatory T cells control the Th1 immune response in murine crescentic glomerulonephritis.
Kidney Int. 2011; 80: 154-164.
- Pedchenko V, Bondar O, Fogo AB, Vanacore R, Voziyan P, Kitching AR, Wieslander J, Kashtan C, Borza DB, Neilson EG, Wilson CB, Hudson BG.
Molecular architecture of the goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis.
N Engl J Med. 2010; 363: 343-354.
- Pesnel S, Pillon A, Créancier L, Lerondel S, Le Pape A, Recher C, Demur C, Guilbaud N, Kruczynski A.
Optical imaging of disseminated leukemia models in mice with near-infrared probe conjugated to a monoclonal antibody.
PLoS One. 2012; 7: e30690.
- Pettersson E, Törnroth T, Miettinen A.
Simultaneous anti-glomerular basement membrane and membranous glomerulonephritis: case report and literature review.
Clin Immunol Immunopathol. 1984; 31: 171-180.
- Peto P, Salama, AD.
Update on antiglomerular basement membrane disease.
Curr Opin Rheumatol. 2011; 23: 32-37.
- Phoon RKS, Kitching AR, Odobasic D, Jones LK, Semple TJ, Holdsworth SR.
T-bet deficiency attenuates renal injury in experimental crescentic glomerulonephritis.
J Am Soc Nephrol. 2008; 19: 477-485.
- Pusey CD, Holland MJ, Cashman SJ, Sinico RA, Lloveras JJ, Evans DJ, Lockwood CM.
Experimental autoimmune glomerulonephritis induced by homologous and isologous glomerular basement membrane in Brown-Norway rats.
Nephrol Dial Transplant. 1991; 6: 457-465.
- Reynolds J, Pusey CD.
In vivo treatment with a monoclonal antibody to T-helper cells in experimental autoimmune glomerulonephritis in the BN rat.
Clin Exp Immunol. 1994; 95: 122-127.
- Reynolds J, Mavromatidis K, Cashman SJ, Evans DJ, Pusey CD.
Experimental autoimmune glomerulonephritis (EAG) induced by homologous and heterologous glomerular basement membrane in two substrains of Wistar-Kyoto rat.
Nephrol Dial Transplant. 1998; 13: 44-52.

Reynolds J, Cook PR, Ryan JJ, Norsworthy PJ, Glazier AM, Duda MA, Evans DJ, Aitman TJ, Pusey CD.

Segregation of experimental autoimmune glomerulonephritis as a complex genetic trait and exclusion of Col4 α 3 as a candidate gene.

Exp Nephrol. 2002; 10: 402-407.

Reynolds J, Moss J, Duda MA, Smith J, Karkar AM, Macherla V, Shore I, Evans DJ, Woodrow DF, Pusey CD.

The evolution of crescentic nephritis and alveolar haemorrhage following induction of autoimmunity to glomerular basement membrane in an experimental model of Goodpasture's disease.

J Pathol. 2003; 200: 118-129.

Reynolds J, Prodromidi EI, Juggapah JK, Abbott DS, Holthaus KA, Kalluri R, Pusey CD.

Nasal administration of recombinant rat α 3(IV)NC1 prevents the development of experimental autoimmune glomerulonephritis in the WKY rat.

J Am Soc Nephrol. 2005; 16: 1350-1359.

Reynolds J, Haxby J, Juggapah JK, Evans DJ, Pusey CD.

Identification of a nephritogenic immunodominant B and T-cell epitope in experimental autoimmune glomerulonephritis.

Clin Exp Immunol. 2008; 155: 311-319.

Reynolds J.

Strain differences and the genetic basis of experimental autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis.

Int J Exp Path. 2011; 92: 211-217.

Robertson H, Wheeler J, Morley AR.

Anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in the mouse: the role of macrophages.

Int J Exp Path. 1995; 76: 157-162.

Rocklin RE, Lewis EJ, David JR.

In vitro evidence for cellular hypersensitivity to glomerular basement membrane antigens in human glomerulonephritis.

N Engl J Med. 1970; 283: 497-501.

Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L, Annunziato F.

Properties and origin of human Th17 cells.

Mol Immunol. 2009; 47: 3-7.

Roth A, Falk R.

Autoantibodies: what's in their teeth.

J Am Soc Nephrol. 2011; 22: 1783-1784.

Ryan JJ, Reynolds J, Norgan VA, Pusey CD.

Expression and characterization of recombinant rat α 3(IV)NC1 and its use in induction of experimental autoimmune glomerulonephritis.

Nephrol Dial Transplant. 2001; 15: 253-261.

- Sado Y, Okigaki T, Takamiya H, Seno S.
Experimental autoimmune glomerulonephritis with pulmonary hemorrhage in rats. The dose-effect relationship of the nephritogenic antigen from bovine glomerular basement membrane.
J Clin Lab Immunol. 1984; 15: 199-204.
- Sado Y, Boutaud A, Kagawa M, Naito I, Ninomiya Y, Hudson BG.
Induction of anti-GBM nephritis in rats by recombinant $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ and $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ of type IV collagen.
Kidney Int. 1998; 53: 664-71.
- Salama AD, Chaudhry AN, Holthaus KA, Mosley K, Kalluri R, Sayegh MH, Lechler RI, Pusey CD, Lightstone L.
Regulation by $\text{CD}25^+$ lymphocytes of autoantigen-specific T-cell responses in Goodpasture's (anti-GBM) disease.
Kidney Int. 2003; 64: 1685-1694.
- Salant DJ.
Immunopathogenesis of crescentic glomerulonephritis and lung purpura.
Kidney Int. 1987; 32: 408-425.
- Salant DJ.
Goodpasture's disease: new secrets revealed.
N Engl J Med. 2010; 363: 388-391.
- Sasaki T, Fässler R, Hohenester E.
Laminin: the crux of basement membrane assembly.
J Cell Biol. 2004; 164: 959-963.
- Savage COS, Pusey CD, Bowman C, Rees AJ.
Anti-glomerular basement membrane antibody mediated disease in the British Isles 1980-4.
BMJ. 1986; 292: 301-304.
- Schaller E, Macfarlane AJ, Rupec RA, Gordon S, McKnight AJ, Pfeffer K.
Inactivation of the F4/80 glycoprotein in the mouse germ line.
Mol Cell Biol. 2002; 22: 8035-8043.
- Schuster M, Wasserbauer E, Einhauer A, Ortner C, Jungbauer A, Hammerschmid F, Werner G.
Protein expression strategies for identification of novel target proteins.
J Biomol Screen. 2000; 5: 89-97.
- Schwarting A, Wada T, Kinoshita K, Tesch G, Kelley VR.
 $\text{IFN}\gamma$ receptor signaling is essential for the initiation, acceleration, and destruction of autoimmune kidney disease in MRL-Fas^{lpr} mice.
J Immunol. 1998; 161: 494-503.
- Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJ.
Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures.
Nature. 1989; 337: 181-184.

Stebly RW.

Glomerulonephritis induced in sheep by injections of heterologous glomerular basement membrane and Freund's complete adjuvant.

J Exp Med. 1962; 116: 253-272.

Summers SA, Steinmetz OM, Li M, Kausman JY, Semple T, Edgton KL, Borza DB, Braley H, Holdsworth SR, Kitching AR.

Th1 and Th17 cells induce proliferative glomerulonephritis.

J Am Soc Nephrol. 2009; 20: 2518-2524.

Sundaramoorthy M, Meiyappan M, Todd P, Hudson BG.

Crystal structure of NC1 domains: structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes.

J Biol Chem. 2002; 277: 31142-31153.

Teague CA, Doak PB, Simpson IJ, Rainer SP, Herdson PB.

Goodpasture's syndrome: an analysis of 29 cases.

Kidney Int. 1978; 13: 492-504.

Tipping PG, Holdsworth SR.

T cells in glomerulonephritis.

Springer Semin Immunopathol. 2003; 24: 377-393.

Tipping PG, Holdsworth SR.

T cells in crescentic glomerulonephritis.

J Am Soc Nephrol. 2006; 17: 1253-1263.

Trowbridge IS, Thomas ML.

CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development.

Annu Rev Immunol. 1994; 12: 85-116.

Turner JE.

Glomerulonephritis therapy: is there a role for green tea.

Kidney Int. 2011; 80: 563-564.

Uyttenhove C, Van Snick J.

Development of an anti-IL-17A autovaccine that prevents experimental autoimmune encephalomyelitis.

Eur J Immunol. 2006; 36: 2868-2874.

Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, Fossiez F, Banchereau J, Lebecque S, Bruijn JA, De Fijter JW, Van Es LA, Daha MR.

Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection.

J Am Soc Nephrol. 1998; 9:1526-1534.

Vanacore R, Pedchenko V, Bhave G, Hudson BG.

Sulphilimine cross-links in Goodpasture's disease.

Clin Exp Immunol. 2011; 164 (Suppl. 1): 4-6.

- Wan YY, Flavell RA.
TGF- β and regulatory T cell in immunity and autoimmunity.
J Clin Immunol. 2008; 28: 647-659.
- Welsch U.
Lehrbuch Histologie, 2. Auflage.
Urban & Fischer Verlag.
München, 2006.
- Wolf G.
Rasch progrediente Glomerulonephritis: Ein nephrologischer Notfall.
Dtsch Arztebl. 2003; 100: A-2123.
- Wolf D, Hochegger K, Wolf AM, Rumpold HF, Gastl G, Tilg H, Mayer G, Gunsilius E, Rosenkranz AR.
CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice.
J Am Soc Nephrol. 2005; 16: 1360-1370.
- Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CW.
Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus.
Lupus. 2000; 9: 589-593.
- Wu J, Hicks J, Ou CN, Singleton D, Borillo J, Lou YH.
Glomerulonephritis induced by recombinant collagen IV α 3 chain noncollagen domain 1 is not associated with glomerular basement membrane antibody: a potential T cell-mediated mechanism.
J Immunol. 2001; 167: 2388-2395.
- Wu J, Hicks J, Borillo J, Glass WF, Lou YH.
CD4⁺ T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis.
J Clin Invest. 2002; 109: 517-524.
- Wu J, Borillo J, Glass WF, Hicks J, Ou CN, Lou YH.
T-cell epitope of α 3 chain of type IV collagen induces severe glomerulonephritis.
Kidney Int. 2003; 64: 1292-1301.
- Wu J, Ardens J, Borillo J, Zhou C, Merszei J, McMahon J, Lou YH.
A self T-cell epitope induces autoantibody response: mechanism for production of antibodies to diverse glomerular basement membrane antigens.
J Immunol. 2004; 172: 4567-4574.
- Zhang JJ, Malekpour M, Luo W, Ge L, Oлару F, Wang XP, Bah M, Sado Y, Heidet L, Kleinau S, Fogo AB, Borza DB.
Murine membranous nephropathy: immunization with α 3(IV) collagen fragment induces subepithelial immune complexes and Fc γ R-independent nephrotic syndrome.
J Immunol. 2012; 188: 3268-3277.

7 Anhang

Publizierte Ergebnisse**Publikation in Fachzeitschrift**

Hopfer H*, Holzer J*, Hünemörder S*, Paust HJ, Sachs M, Meyer-Schwesinger C, Turner JE, Panzer U, Mittrücker HW.

Characterization of the renal CD4⁺ T-cell response in experimental autoimmune glomerulonephritis.

Kidney Int. 2012; 82: 60-71.

* gleicher Beitrag (contributed equally)

Kongressbeitrag – Vortrag

Holzer J, Hünemörder S, Panzer U, Hopfer H, Mittrücker HW.

Characterization of the T-cell response in the experimental autoimmune glomerulonephritis of the mouse.

40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI). 2010, Leipzig.

Kongressbeitrag – Poster

Holzer J, Hünemörder S, Panzer U, Hopfer H, Mittrücker HW.

The function of CD4 lymphocytes in experimental autoimmune glomerulonephritis.

40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI). 2010, Leipzig.

Abstractband. p. 64.

Holzer J, Hünemörder S, Paust HJ, Panzer U, Hopfer H, Mittrücker HW.

The function of CD4 lymphocytes in experimental autoimmune glomerulonephritis.

3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie. 2011, Berlin.

Hünemörder S, Holzer J, Paust HJ, Panzer U, Hopfer H, Mittrücker HW.

The function of CD4 lymphocytes in experimental autoimmune glomerulonephritis.

41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI). 2011, Riccione.

Minerva Medica. 102 (Suppl. 1): 83.

Hünemörder S, Holzer J, Paust HJ, Panzer U, Hopfer H, Mittrücker HW.

Charakterisierung der renalen CD4⁺ T-Zellantwort in der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis.

4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie. 2012, Hamburg.

(bei Abgabe der Arbeit eingereicht)

Gefahrstoffe

Die im Verlauf dieser Dissertation verwendeten Gefahrstoffe sind im Folgenden aufgelistet. Nach dem „Global harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien“ (GHS, Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals) ist jede Substanz mit den GHS-Gefahrenpiktogrammen sowie den H-Sätzen (Hazard Statements) und P-Sätzen (Precautionary Statements) beschrieben.

Im Folgenden sind die GHS-Gefahrenpiktogramme aufgeführt:



Tab. 6: Verwendete Substanzen mit Gefahreinstufung und Sicherheitshinweisen nach GHS.

Substanz	Gefahr	H-Sätze	P-Sätze
Ammoniumchlorid	GHS07	H302, 319	P305+351+338
Brefeldin A	GHS06	H301	P301+310
β-Mercaptoethanol	GHS05/06/09	H301, 310, 330, 315, 318, 410	P280, 273, 302+352, 304+340, 305+351+338, 309, 310
Coomassie-Brilliant-Blau	GHS07	H302, 312, 332	P261, 280, 322, 301+312, 304+340, 501
DTT	GHS07	H302, 315, 319	P302+352, 305+351+338
EDTA	GHS07	H319	P305+351+338
Ethanol	GHS02	H225	P210
Ethidiumbromid	GHS06/08	H341, 330, 302	P281, 302+352, 305+351+338, 304+340, 309, 310
Formalin	GHS05/06/08	H351, 331, 311, 301, 314, 317	P301+310, 303+361+353, 305+351+338 320, 361, 405, 501
Gentamycin	GHS08	H317, 334	P261, 280, 342+311
Ionomycin	GHS07	H302	P273, 309, 310

Natriumazid	GHS06/09	H300, 400, 410	
Natriumcarbonat	GHS07	H319	P260, 305+351+338
Paraformaldehyd (PFA)	GHS02/07/08	H228, 302, 332, 351, 335, 315, 319, 317	P281, 302+352, 305+351+338, 308+313, 304+340
Penicillin/ Streptomycin	GHS07/08	H302, 332, 334, 317	P261, 302+352, 304+341, 312
Phorbol-12-Myristat- 13-Azetat (PMA)	GHS07	H315,312	P302+352, 280
Puromycin- Dihydrochlorid	GHS07	H302	
Rauchende HCl	GHS05/07	H314, 335	P260, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 405, 501
Saponin	GHS07	H319, 335	P261, 280, 304+340, 305+351+338, 312, 337+313
Schwefelsäure	GHS05	H314	P280, 301+330+331, 309, 310, 305+351+338
SDS	GHS02/06	H228, 311, 302, 335, 315, 319	P210, 280, 304+340, 305+351+338, 309+310
Tris	GHS07	H315, 319, 335	P261, 305+351+338
Trypanblau	GHS08	H350	P201, 308+313
Trypsin	GHS07/08	H315, 319, 335	P261, 280, 302+352, 305+351+338, 337+313,342+311

Danksagung

Ich möchte mich bei Allen bedanken, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben, insbesondere den nachfolgenden Personen.

Prof. Dr. Hans-Willi Mitrücker danke ich für seine exzellente Betreuung, seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und die gründliche Durchsicht der Dissertation. Die in seinem Labor verbrachte Zeit zur Anfertigung meiner Arbeit war wissenschaftlich und menschlich eine große Bereicherung für mich, wofür ich sehr dankbar bin.

Prof. Dr. Peter Heisig danke ich für seine Betreuung und für die Erstellung des Erstgutachtens.

Dr. Helmut Hopfer danke ich für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen und für die ausgezeichnete Kooperation.

Der Klinischen Forschergruppe (KFO) 228 „Immunpathogenesis and Therapy of Glomerulonephritis“ danke ich für die finanzielle Unterstützung, die mir die Durchführung dieses Forschungsprojektes ermöglichte.

Dipl. Biochemikerin Stefanie Hünemörder danke ich für die Zusammenarbeit. Ich bin froh eine so loyale und liebenswürdige Person kennen gelernt zu haben.

Der nephrologischen Abteilung, besonders Prof. Dr. Ulf Panzer, Dr. Hans-Joachim Paust, Anett Peters und Marlies Sachs danke ich für die hervorragende Kooperation und Hilfsbereitschaft.

Mariola Reczka danke ich für die Hilfe bei der Paraffineinbettung der Organe.

Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte, Prof. Dr. Friedrich Haag und Dr. Eva Tulosa danke ich für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Ideen bei praktischen Problemen.

Dem Laborteam danke ich. Valéa danke ich für die Genotypisierungen der hier genutzten Mäuse und für die tollen Gespräche. Friederike, Kira, Merete, Matthias, Judith, Isabell, Timo, Mandy, Philine, Gudrun und allen aus dem Institut danke ich für die schöne Zeit und das tolle Arbeitsklima.

Ilona und Elli danke ich für das „fachfremde“ Korrekturlesen.

Meinen Eltern Katharina und Georg danke ich für die liebevolle Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit. Ganz besonders dafür, dass Sie immer alles Erdenkliche getan haben, um mir zu helfen. Meiner Schwester Judith danke ich für die seelische Stütze vor allem zu Beginn der Doktorarbeit.

Meinem Freund Sven danke ich für seine großartige Unterstützung in allen Phasen der Doktorarbeit.