Die Rolle verschiedener T-Zellsubpopulationen in der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis der Maus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von
Stefanie Hünemörder

Hamburg, im November 2013

korrigierte Fassung

Erstgutachter:	Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf Institut für Immunologie
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Thomas Dobner Heinrich-Pette-Institut Abteilung Virale Transformation
Betreuer der Arbeit:	Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker
Tag der Disputation:	17. Januar 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. H.-W. MITTRÜCKER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. T. DOBNER
Tag der Disputation: 17. Januar 2014

Hamburg, den 02. Januar 2014

Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Eidestattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig verfasst und keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass diese Arbeit veröffentlicht werden darf.

Hamburg, den 21. November 2013

Stefanie Hünemörder

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung **1**

2 Einleitung **4**
2.1 Nierenfunktion und autoimmune Nierenerkrankungen 4
2.2 RPGN und Goodpasture-Syndrom 5
2.3 Aufbau des Goodpasture-Antigens 7
2.4 Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis (EAG) 9
2.5 T-Lymphozyten und Antigenpräsentation 10
2.6 Zielsetzung der Arbeit 13

3 Material und Methoden **14**
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien 14
3.1.1 Feinchemikalien, Enzyme, Antikörper und Oligonukleotide . . 14
3.1.2 Medien und Lösungen 16
3.1.3 Software 16
3.2 Methoden 17
3.2.1 Tierexperimentelles Arbeiten 17
3.2.1.1 Mauslinien 17
3.2.1.2 Immunisierung 17
3.2.1.3 Verlaufskontrolle der EAG 17
3.2.2 Zellbiologische Methoden 18
3.2.2.1 Zellisolierung aus Gewebe 18
3.2.2.2 *In vitro* Stimulation 18
3.2.2.3 Durchflusszytometrie 19
Intrazelluläre und Oberflächen-Färbung 19
Durchflusszytometrische Analyse 19
3.2.2.4 Zellkultur 20
3.2.3 Molekularbiologische Methoden 21
3.2.3.1 quantitative *Real-time* RT-PCR 21
3.2.3.2 RNA-Isolierung 22
3.2.3.3 c-DNA-Synthese 22
3.2.3.4 Durchführung und Auswertung der quantitativen *Real-time* PCR 23
3.2.4 Immunologische Methoden 24
3.2.4.1 ELISA 24
Albumin-ELISA 24
Indirekter Antikörper-ELISA 25
3.2.4.2 Immunohistochemie 25
3.2.4.3 Proteinaufreinigung 26
Reinigung der α3(IV)NC1-Peptide mittels anti-Flag-Affinitätschromatographie 26
3.2.5 Statistik 26
3.2.6 Gemeinsam durchgeführte Experimente 26

4 Ergebnisse **27**
4.1 Die Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis in DBA/1J Mäusen . . . 27
4.1.1 Induktion der EAG mit dem homologen Antigen in DBA/1J Mäusen . . . 27
4.1.2 Spezifische Autoantikörperbildung in EAG-Mäusen . . . 29
4.1.3 Pathologische Veränderungen der EAG-Niere . . . 30
4.1.4 Entzündungsparameter in EAG-Nieren . . . 31
4.1.5 Spezifische T-Zellantwort in EAG-Mäusen . . . 33
4.1.5.1 Frühe m-α3(IV)NC1-spezifische Antwort in der Milz . 33
4.1.5.2 Funktionale Analyse von spezifischen T-Zellen in der Spätphase der EAG . . . 37
4.2 Einfluss von verschiedenen T-Zellsubpopulationen auf die EAG . . . 41
4.2.1 Induktion der EAG in IFNgR-, IL-17A- und IL-23p19-KO DBA/1J Mäusen . . . 41
4.2.2 Spezifische Autoantikörper in allen KO-Mäusen . . . 43
4.2.3 Verringerte nephropathologische Veränderungen in KO- Mäusen 46
4.2.4 Renale Makrophageninfiltration in KO-Mäusen . . . 51
4.2.5 Spezifische T-Zellantwort in KO-Mäusen . . . 53
4.2.6 Expression von Chemokinen und NO-Synthase . . . 55

5 Diskussion **60**
5.1 Die Induktion der EAG mit dem homologen m-α3(IV)NC1 . . . 60
5.1.1 Krankheitsverlauf und klinische Parameter der EAG . . . 61
5.1.2 Spezifische T-Zellantwort in der EAG . . . 61
5.2 Die Induktion der EAG in verschiedenen KO-Mäusen . . . 62
5.2.1 Der Verlauf der EAG in DB1-IFNgRKO-Mäusen . . . 62
5.2.2 Die EAG in DB1-IL17AKO- und DB1-IL23p19KO-Mäusen . . 65

6 Ausblick **67**

7 Literaturverzeichnis **68**

8 Abkürzungen **75**

9 Publikationen **77**

Korrekturen **79**

Abbildungsverzeichnis

1 **Aufbau eines Glomerulus** 5
2 **Das Kollagennetzwerk** 7
3 **Aufbau des Goodpasture-Antigens** 8
4 **Zytokinprofil und Transkriptionsfaktoren von verschiedenen CD4$^+$ T-Zellsubpopulationen** 11
5 **Eingrenzung der lebenden CD4$^+$ T-Helferzellen im FACS** . . 20
6 **Reaktionszyklen der Programme für die qRT-PCR** 23
7 **Kinetik der PCR-Reaktion** 24
8 **Immunisierungsschema** 28
9 **Krankheitsverlauf der EAG** 28
10 **Antikörperantwort in EAG-Mäusen** 29
11 **Verlust der Nierenfunktion** 30
12 **Histologische Analyse der Nieren von EAG-Mäusen** 31
13 **qRT-PCR Expressionsanalyse von Entzündungsmarkern** . . . 32
14 **Zytokinproduktion von spezifisch stimulierten Milzzellen aus EAG-Tieren** 35
15 **FACS-Analyse der Zytokinproduktion in Milzzellen von EAG-Mäusen** 36
16 **FACS-Analyse der spezifischen Zytokinproduktion in Milzzellen von schwer kranken EAG-Mäusen** 38
17 **FACS-Analyse der spezifischen Zytokinproduktion in Nierenzellen von schwer kranken EAG-Mäusen** 39
18 **Immunisierungsschema** 42
19 **Krankheitsverlauf der EAG in *knockout*-Mäusen** 42
20 **Antikörperantwort in KO-Mäusen** 43
21 **Vergleich der Antikörpersubklassen in KO-Mäusen** 44
22 **IgG-Ablagerungen auf KO-Nierenschnitten** 45
23 **Verlust der Nierenfunktion in KO-Mäusen** 46
24 **Nierenschnitte von KO-Mäusen** 47
25 **Histologische Analyse der Nieren von KO-Mäusen** 49
26 **Lineare Regressionsanalyse des Blutharnstoffs gegen die glomeruläre Halbmondbildung** 50
27 **Lineare Regressionsanalyse des Blutharnstoffs gegen den tubulointerstitiellen Schaden** 51
28 **F4/80$^+$ Zellen auf KO-Nierenschnitten** 52
29 **FACS-Analyse der Zytokinproduktion in KO-Mäusen** 54
30 **qRT-PCR Expressionsanalyse von *Inos* und *Cxcl9* in KO-Mäusen** 56
31 **qRT-PCR Expressionsanalyse von *Cxcl1, Cxcl2* und *Cxcl5* in KO-Mäusen** 57

Tabellenverzeichnis

1 Primer für die quantitative *Real-time*-PCR 15
2 TaqMan Expressionsassays für die quantitative *Real-time*-PCR 15
3 Antikörper für Immunhistochemie und ELISA 15
4 Anti-Maus Antikörper für die Durchflusszytometrie 16
6 Reaktionsansätze für die quantitative *Real-time* PCR 23

1 Zusammenfassung

Die anti-glomeruläre Basalmembran Glomerulonephritis (anti-GBM GN) ist eine Form der rapid progredienten Glomerulonephritiden. Sie gehört zu den wenigen Autoimmunkrankheiten, für die das Antigen bekannt ist. Es handelt sich um die Nichtkollagen-Domäne 1 der α3-Kette des Typ IV Kollagens, kurz α3(IV)NC1. Durch die Immunisierung von Mäusen oder Ratten mit gereinigtem oder rekombinantem α3(IV)NC1 ist es möglich, eine Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis (EAG) hervorzurufen. Die EAG entspricht in den wesentlichen klinischen Parametern der anti-GBM-GN und wird daher als Modell zur Untersuchung der Pathogenese und des Einflusses verschiedener Immunzellen auf den Verlauf der Krankheit genutzt. In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Modell etabliert, in dem DBA/1J-Mäuse nach wiederholter Immunisierung mit rekombinantem humanem (h-)α3(IV)NC1 eine EAG entwickelten [20]. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden nun Immunisierungsexperimente mit dem "echten" Autoantigen Maus- (m-)α3(IV)NC1 durchgeführt und der Verlauf der Erkrankung untersucht. Neben der Analyse von klinischen Krankheitsparametern und der Autoantikörperantwort lag ein Schwerpunkt auf der Charakterisierung von α3(IV)NC1-spezifischen T-Zellen. Nach Immunisierung mit m-α3(IV)NC1 zeigten die Tiere ein nephrotisches Syndrom mit Albuminurie und Ablagerung von Autoantikörpern in den Glomeruli. Im späten Stadium ging die Erkrankung in eine rapid progrediente Glomerulonephritis über. Im Vergleich zur Immunisierung mit dem h-α3(IV)NC1 war der Verlauf der Erkrankung milder. Die Ausbildung von schweren Krankheitsanzeichen war verzögert und die histologische Analyse zeigte eine verminderte Halbmondbildung und einen geringeren Gewebeschaden. Bereits nach einer Immunisierung konnten α3(IV)NC1-spezifische IFN-γ^+ Th1- und IL-17A$^+$ Th17-Zellen aus der Milz isoliert werden. Im Endstadium der Erkrankung waren diese autoreaktiven Th1- und Th17-Zellen auch in der Niere nachweisbar. Zur Untersuchung des Einflusses dieser T-Zellen auf die Entstehung der Erkrankung und die Ausprägung des Nierenschadens wurden die EAG in *knockout*-Mäusen induziert, deren Th1- bzw. Th17-Antwort gestört war. Tiere ohne funktionellen Rezeptor für IFN-γ entwickelten a3(IV)NC1-spezifische Antikörper, IgG-Ablagerungen entlang der Basalmembran und eine Entzündung im tubulointerstitiellen Raum. Diese führten wie bei den Wildtyp-Tieren zu einer schweren Proteinurie, die die Bildung von massiven Ödemen zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu zeigte die histologische Untersuchung der Glomeruli nur bei wenigen Tieren eine geringe Halbmondbildung, die mit einem erhöhten Harnstoffwert im Blut einherging. Durch die Expressionsanalyse von iNOS und die immunhistochemische Anfärbung von F4/80$^+$ Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die für die EAG typische massive Akkumulation von Makrophagen in diesen Tieren deutlich abgeschwächt war. Aufgrund der fehlenden Entzündungsreaktion in der Niere wurde die Erkrankung als membranöse GN eingestuft. In ähnlicher Weise verlief auch bei den untersuchten IL-17A- und IL-23p19-defizienten Mäusen mit einer eingeschränkten Th17 Antwort die EAG mit deutlich geringerem Entzündungsgeschehen gegenüber den Wildtyp-Tieren. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Immunisierung sowohl mit dem homologen als auch mit dem heterologen Antigen die Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis induziert. Die klinischen Manifestationen treten bei

Verwendung des m-α3(IV)NC1 aber verzögert auf und sind etwas milder ausgeprägt. Die Untersuchung in Mäusen mit eingeschränkter Th1- oder Th17-Antwort bestätigt den zweiphasigen Verlauf der EAG. Die Grunderkrankung beruht auf einer Ablagerung von anti-GBM-Antikörpern und Komplement entlang der GBM. Dies führt zu einer schweren Proteinurie und schlussendlich zum Nierenversagen. Im späten Stadium der EAG zeigt sich dann eine schwere Entzündung der Niere mit Halbmondbildung in den Glomeruli, die erhöhte Blutharnstoffwerte zur Folge hat. Diese Entzündungsreaktion ist von einer intakten Th1 und Th17-Antwort abhängig.

Summary

The antiglomerular basement membrane glomerulonephritis (anti-GBM GN) is a form of rapid progressive glomerulonephritis. The autoantigen in anti-GBM GN has been identified as the α3NC1 domain of collagen type IV (α3(IV)NC1). α3(IV)NC1 has been used to induce the experimental autoimmune glomerulonephritis (EAG) in susceptible mouse and rat strains. The EAG model recapitulates the hallmark features of the human anti-GBM GN and allows the study of pathogenesis and the role of cellular immune mechanisms in the course of the disease. EAG induced in DBA/1J mice using human recombinant (h-)α3(IV)NC1 has been described by our group [20]. In the first part of the project, mouse- (m-)α3(IV)NC1 was used to characterize the development of renal disease in response to the genuine autoantigen. Analyses focused on different parameters of renal disease but also on the generation of α3(IV)NC1-specific $CD4^+$ T cells. Following immunization with m-α3(IV)NC1, mice developed a membranous GN characterized by deposition of IgG along the GBM and severe proteinuria. In the endstage of EAG, disease progressed to crescentic glomerulonephritis with crescents in a large fraction of glomeruli and tubulointerstitial damage. Compared to h-α3(IV)NC1, immunization with m-α3(IV)NC1 was less effective. The time course of disease was extended by one or two weeks and histological analyses revealed fewer crescents and less tissue damage. α3(IV)NC1-spezific IFN-γ^+ Th1 and IL-17A^+ Th17 cells could be isolated from spleen already after the first immunization. In the endstage of disease, both autoreactive Th-cell populations could also be detected in the inflamed kidney. To investigate the impact of autoreactive T cells in the development of disease and in renal pathology, animals without a functional IFN-γ receptor were imunized with h-α3(IV)NC1. These mice generated α3(IV)NC1-specific antibodies that deposited along the GBM and caused interstitiel damage. Similar to wildtype mice, IFN-γR-deficient mice developed severe proteinuria and eventually massive edema. However, in contrast to wildtype mice only few IFN-γR-deficient mice showed crescent formation and the number of crescents was low. These mice also showed only marginally elevated BUN levels. Furthermore, there was attenuated macrophage accumulation and only a low level of iNOS expression in the kidney. Due to the absence of overt inflammation, the disease in IFN-γR-deficient mice was classified as membranous GN. The induction of EAG was likewise impaired in IL-17A and IL-23p19-deficient mice which both lack effective Th17 responses. In both mouse strains, repeated immunizations with α3(IV)NC1 resulted in membranous GN but only mild crescent formation and tubulointerstitial damage. In conclusion, these results show that immunization with both the homologous m-α3(IV)NC1 and the heterologous h-α3(IV)NC1 can cause EAG in DBA/1J mice. With m-α3(IV)NC1 the manifestation of impaired renal functions was delayed and less severe. Examination of lacking an intact Th1 or Th17 responses confirmed the biphasic course of the disease. In all mice, immunization with α3(IV)NC1, causes deposition of IgG and complement along the GBM. Consequences are proteinuria and eventually complete loss of renal function. Only in the final stage, disease progresses to crescentic GN with massive tubulointerstital inflammation, crescent formation and elevated blood urea levels, and this transformation from membranous to crescentic GN depends on Th1 and Th17 cells.

2 Einleitung

2.1 Nierenfunktion und autoimmune Nierenerkrankungen

Die Nieren sind ein paarig angelegtes Organ in Wirbeltieren, sie bilden die wichtigste funktionelle Einheit des Harnsystems. Ihre wichtigste Aufgabe neben der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalt sowie des Säure-Base-Haushalts ist die Reinigung des Blutes von Stoffwechselprodukten und Giftstoffen durch Produktion von Harn.

Die Nierenrinde des Menschen besteht aus über einer Million Nephronen, in welchen die Harnbildung stattfindet. Jedes Nephron wird in Nierenkörperchen und Tubulus unterteilt. Im Nierenkörperchen umschließt die Bowman-Kapsel ein Gefäßknäuel, das sogenannte Glomerulum, in dem das Blut filtriert wird. Der schematische Aufbau eines Glomerulus ist in Abb. 1 gezeigt. Die Glomerulumkapillaren sind von einer Basalmembran umgeben, deren Hauptkomponente Kollagen ist. Auf dieser Membran sitzen Podozyten und umfassen mit ihren primären Fortsätzen die Kapillaren. Sekundäre Fortsätze, die von diesen ausgehen, verzahnen sich eng mit denen benachbarter Podozyten und bilden dadurch die sogenannte Schlitzmembran.

Bei der Primärharnbildung wird das Blut durch das fenestrierte Endothel der Kapillarschleifen und die 20-30 nm breiten Spalten der Schlitzmembran filtriert. Dabei gelangen Wasser und kleine Moleküle ($<$ 50 kDa) sowie Elektrolyte in den Kapselraum. Der Primärharn fließt dann durch den Tubulus, wo einige Bestandteile rückresorbiert und weitere harnpflichtige Stoffe sezerniert werden, danach erfolgt eine Konzentration. Eine Aussage über die Nierenfunktion kann daher anhand von Menge und Konzentration des Urins sowie der Konzentration harnpflichtiger Stoffe im Blut getroffen werden.

Erkrankungen, die zum Ausfall der Nierenfunktion führen können, sind lebensbedrohlich. Krankhafte Veränderungen der Nierentubuli resultieren meist aus Vergiftungen oder Infektionen, während Glomeruli durch autoimmune Prozesse angegriffen werden. Glomerulonephritiden (GN) sind Entzündungen der Glomeruli, von denen stets beide Nieren betroffen sind. Sie sind eine der häufigsten Ursachen für terminale Niereninsuffizienz. Sekundär können sie im Rahmen systemischer Grunderkrankungen, wie z.B. dem Systemischen Lupus erythematodes, auftreten. Primäre Formen manifestieren sich direkt am Glomerulum. Die Einteilung orientiert sich an der Ursache, der Histologie und dem klinischen Verlauf der Krankheit.

Anhand der Symptome und klinischen Parameter werden das nephritische und das nephrotische Syndrom unterschieden. Als nephrotisch wird ein Patient beurteilt, wenn er eine starke Proteinurie von über 3,5 g/ 24h aufweist, was zu Hypoalbuminämie und konsekutiv zur Bildung von Ödemen führt. Weiterhin entwickelt sich eine Hyperlipidämie u.a. als Folge kompensatorischer Überproduktion von Lipoproteinen. Eine Proteinurie entsteht, wenn die Podozyten geschädigt werden und ihre Fußfortsätze mit dem Zellkörper verschmelzen. Dieses “effacement” führt zur Aufweitung der Schlitzmembran und folglich dem Verlust von Proteinen und anderen Molekülen aus dem Blut [73]. Beim nephritischen Syndrom ist der Nierenfunktionsverlust zentral, oft begleitet von Hypertonie. Durch Rupturen in den Glomeruli

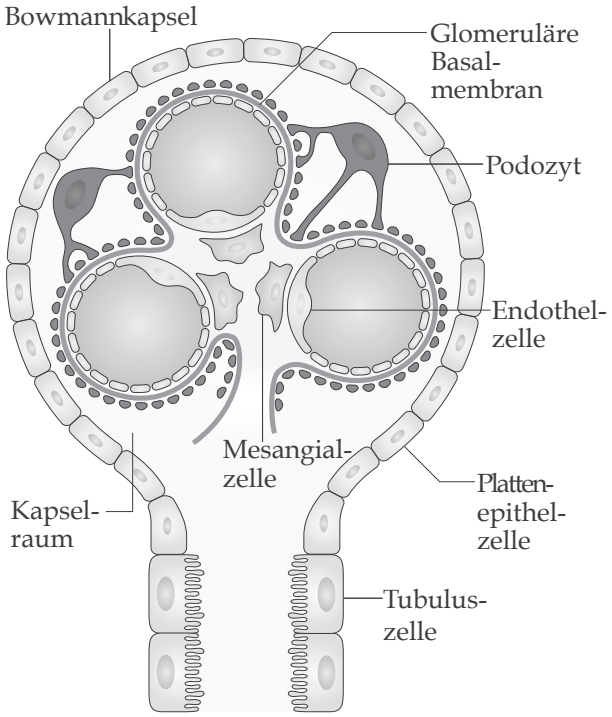

Abbildung 1: Aufbau eines Glomerulus
Das Glomerulum ist die Filtrationseinheit der Niere, in der der Primärharn gebildet wird. Schematische Darstellung modifiziert nach [32].

kommt es zur Hämaturie. Proteinurie und Ödembildung zeigen milde bis mäßige Ausprägung. Die Therapie erfolgt je nach genauer Ursache mit Immunsuppressiva und durch supportive Behandlung der klinischen Symptome.

2.2 RPGN und Goodpasture-Syndrom

Eine aggressive und klinisch besondere Form des nephritischen Syndroms ist die rapid progrediente Glomerulonephritis (RPGN). Unbehandelt kann ein kompletter Nierenfunktionsverlust durch Zerstörung der Glomeruli innerhalb von Tagen bis Wochen eintreten. Ein besonderes Kennzeichen dieses Krankheitsverlaufs ist der histologische Befund der halbmondförmigen extrakapillären Proliferation in der Bowman-Kapsel, die nach Ruptur der glomerulären Basalmembran (GBM) auftritt. Häufig sind auch Zellnekrosen mit Fibrinablagerungen zu finden. Die Erkrankung kann von Symptomen des nephrotischen Syndroms begleitet werden. Nach ihrer Pathogenese kann man die RPGN in drei Gruppen einteilen [74], [10]:

1) Die anti-GBM-GN ist in 10 bis 20 % der RPGN-Patienten die Ursache für den Nierenfunktionsverlust, insgesamt macht sie etwa 1-5% der aller Glomerulonephritiden aus [30]. Bei gleichzeitiger Lungenbeteiligung wird der Begriff „Goodpasture-Syndrom“ verwendet. Der Patient bildet Autoantikörper gegen die glomeruläre Basalmembran, welche zirkulierend im Blut und als lineare Ablagerungen entlang der GBM nachgewiesen werden können. Es zeigen sich jedoch keine Immunkomplexe in

der Niere. Ebenfalls linear abgelagert finden sich der Komplementfaktor C3.

2) Der Immunkomplex-vermittelten RPGN liegen verschiedene systemische Autoimmunerkrankungen zu Grunde. Im Falle der IgA-Nephropathie bilden sich Immunkomplexe aus abnormen IgA-Molekülen und den gegen sie gerichteten Antikörpern. Bei dem Systemischen Lupus erythematodes liegt eine autoaggressive Reaktion vor allem gegen Bestandteile von Zellkernen vor. Die Immunkomplexe bilden typische granuläre Ablagerungen entlang der GBM, begleitet von Komplementablagerungen.

3) Die ANCA - assoziierten Glomerulonephritiden bilden den größten Anteil der RPGN. Bei dieser Erkrankung werden Autoantikörper gegen Antigene in neutrophilen Granulozyten (*anti neutrophil cytoplasmatic antibodies*, ANCA) gebildet. Die GN zeigen histologisch keine oder nur geringe glomeruläre Ablagerungen und werden daher auch als pauci-immun bezeichnet.

Die Kombination einer anti-GBM-Nephritis mit Lungenbluten wurde nach Ernest W. Goodpasture benannt. Er beschrieb 1919 ein pulmo-renales Syndrom nach Influenza-Infektion. Heute bezeichnet das Goodpasture-Syndrom (engl. *Goodpasture's disease*) eine Autoimmunkrankheit, bei der Antikörper gegen einen bestimmten Teil der Basalmembran gebildet werden [9]. Diese Antikörper, typischerweise vom Isotyp IgG1 [71], zirkulieren in hohen Konzentrationen im Blut und lagern sich entlang der GBM ab. Zum Teil weisen die Patienten zusätzlich ANCA auf, weiterhin können transplantierte Patienten mit Alport-Syndrom anti-GBM Antikörper entwickeln. Das Goodpasture-Syndrom ist eine äußerst schwere Autoimmunerkrankung, die als Hypersensitivität Typ II eingeordnet wird [48]. Sie tritt mit 0,5 bis 1 Fall je 1 Millionen Einwohner pro Jahr sehr selten auf [53]. Das Antigen, gegen das die Autoantikörper gebildet werden, konnte auf molekularer Ebene von der Arbeitsgruppe um Billy Hudson analysiert werden [24], [70], [69]. Es handelt sich um die Nicht-Kollagen Domäne NC1 der α3-Kette des Typ IV Kollagens (α3(IV)NC1). Die Bindung der Antikörper an die GBM löst eine Aktivierung des Komplementsystems aus und führt zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen [46]. Passive Transfermodelle wurden bereits 1967 eingesetzt, um die pathogenen Eigenschaften dieser Antikörper zu bestätigen [34].

Sowohl in Patienten als auch in Tiermodellen konnte eine Beteiligung von Immunzellen an der Pathogenese des Goodpasture-Syndroms gezeigt werden. T-Zellen sind im Patienten am Klassenwechsel der Antikörper zum Isotyp IgG1 beteiligt. Weiterhin konnten in Biopsien entzündeter Nieren $CD4^+$-Zellen nachgewiesen werden [4], [18]. Im Blut von Patienten wurden zirkulierende antigen-spezifische T-Zellen identifiziert. Durch die Kartierung mit Peptiden wurden zwei immunogene T-Zellepitope entdeckt: α3 (71-90) und α3 (131-150). Die Stimulation mit diesen Peptiden führte in peripheren Blutlymphozyten zur Proliferation und zur Produktion von Interferon-γ [7]. Weiterhin wurde festgestellt, dass diese Peptide bevorzugt über MHCII präsentiert werden. Weitere Studien belegen eine Assoziation des Goodpasture-Syndroms mit dem humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-Genlokus. Eine genetische Prädisposition liegt für das Allel DRB1*1501 vor, welches in Patienten 3,5-mal so häufig auftritt wie in der normalen Bevölkerung. Einen schützenden Effekt scheinen hingegen die Allele DRB1*01 und DRB1*07 zu bieten, da diese sehr selten in Patienten auftreten [54].

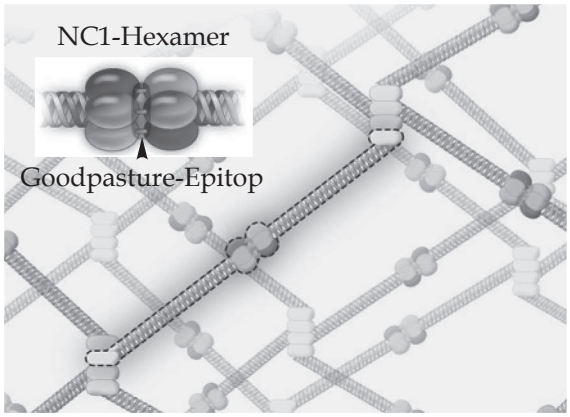

Abbildung 2: Das Kollagennetzwerk
Die Nicht-Kollagen-Domänen NC1 der Kollagenketten α3(IV), α4(IV) und α5(IV) bilden Hexamere und führen dadurch zur Kreuzvernetzung der Protomere. Schematische Darstellung adaptiert nach [63].

2.3 Aufbau des Goodpasture-Antigens

Die glomeruläre Basalmembran ist eine dünne Schicht aus extrazellulärer Matrix, die jedes glomeruläre Gefäßknäuel umgibt. Sie besteht aus Laminin, Nidogen (Entaktin), Heparansulfat-Proteoglykane sowie Kollagen IV. Diese Moleküle werden von den Endothelzellen synthetisiert und bilden ein Netzwerk zur Stabilisierung des Gewebes. Die Basalmembran spielt eine wichtige Rolle bei der Filtration, der Zell-Adhäsion, -Migration und -Differenzierung [38].

Kollagen IV ist aus sechs genetisch unterschiedlichen jedoch strukturell sehr ähnlichen α-Ketten aufgebaut (α1 - α6). Jede α-Kette besitzt am N-Terminus eine kurze 7S-Domäne, im Mittelteil eine lange Kollagen-Domäne aus wiederholten Gly-X-Y Sequenzen und am C-Terminus eine Nicht-Kollagen-Domäne 1 (NC1) [24], [52]. Jeweils drei Ketten bilden ein helikales Monomer (Protomer, [6]), die Protomere bilden über NC1:NC1 und 7S:7S Interaktionen ein zweidimensionales Netzwerk (s. Abb.2).

Dabei ergeben sich NC1-Hexamere unterschiedlicher Zusammensetzung. In der humanen GBM dominieren α3α4α5-(IV)Protomere, während α1α1α2(IV) in geringem Maße nachzuweisen sind. In Nagetieren kommen α1 und α2 in der GBM kaum vor, sie bilden jedoch die Matrix des Mesangiums in vielen Spezies [13]. Die NC1-Hexamere der GBM werden durch Sulfilimin-Bindungen stabilisiert [63]. Diese S=N Bindung entsteht zwischen Methionin^{93} und Lysin^{211} zweier verbundener Protomere [68]. Für die Auto-Antikörper aus Patienten mit anti-GBM-GN wurden zwei immundominante Epitope identifiziert. Diese "Goodpasture-Epitope" EA und EB befinden sich in den NC1-Domänen von α3(IV) und α5(IV) [6], [69]. Sie sind "kryptisch", d.h. sie sind im Zentrum des NC1-Hexamers eingeschlossen. Die Auto-Antikörper aus Patienten können nicht an intakte NC1-Hexamere binden, da die Epitope nicht zugänglich sind. Erst die Dissoziation und konformationelle Änderungen legen die B-Zellepitope frei (s. Abb.3).

Eine Störung der Sulfilimin-Bindung könnte daher ein wichtiger Faktor bei der Entstehung des Goodpasture-Syndroms darstellen [69]. Die Bindung von Antikörpern

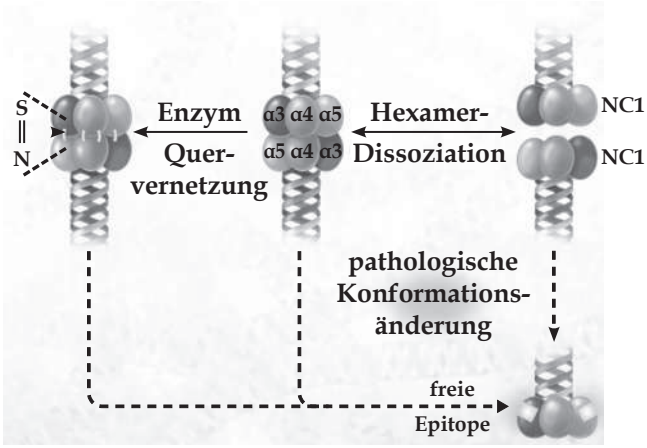

Abbildung 3: Aufbau des Goodpasture-Antigens
Die Antikörperbindungsstellen im Goodpasture-Antigen sind normalerweise unzugänglich. Durch Hexamer-Dissoziation oder andere Konformationsänderungen können Epitope neu entstehen oder freigelegt werde. Schematische Darstellung adaptiert nach [52].

an die zugänglichen Epitope destabilisiert das Netzwerk vermutlich direkt und ermöglicht so die Anlagerung von weiteren Antikörpern. Verschiedene Spezies weisen ein unterschiedliches Maß an Stabilisierung der NC1-Hexamere durch Sulfilimin-Bindungen auf. So sind in Mäusen die Goodpasture-Epitope normalerweise gut geschützt und schwer zugänglich. Im Menschen und auch in Totenkopfäffchen weist das Kollagen-IV-Netzwerk einen geringeren Grad an Sulfilimin-Bindungen auf, daher sind diese Spezies anfälliger für die Bildung von anti-GBM-Antikörper. Der Grund für diese unterschiedliche Strukturierung ist nicht bekannt [36].

Es ist nach wie vor ungeklärt, welche genauen Umstände zur Bildung von Autoantikörpern führen. Kollagen IV ist essentieller Bestandteil von Basalmembranen. In der Niere können jedoch aufgrund der Fenestrierung der Kapillarschleifen Blutbestandteile in Kontakt mit dem Kollagen IV kommen. Eine Ruptur der Basalmembran durch eine Infektion in der Niere oder Lunge könnte zur Exposition von normalerweise kryptischen Epitope führen. Auch die Schädigung der Alveolen durch Kohlenwasserstoffe oder durch Zigarettenrauch ist als mögliche Ursache für eine Exposition von Kollagen für das Immunsystem beschrieben [30], [53]. Die Mechanismen, die dann für zu einer Erkennung des Kollagens durch das Immunsystem und den Verlust der Toleranz von T- und B-Zellen gegenüber Kollagen führen, sind vollkommen unklar. Ein möglicher Mechanismus wäre eine Kreuzreaktivität von pathogenspezifischen Antikörpern oder T-Zellen mit dem Kollagen der Basalmembranen.

Ein Mechanismus der auch zum Tragen kommen könnte ist die Ausweitung der Immunantwort auf weitere Epitope, das *epitope spreading*. Dabei kann die Reaktion gegen bestimmte Epitope eine Ausweitung der Immunantwort auf andere Epitope bewirken. In Studien wurde in Rattenmodellen nach der Immunisierung mit einem sehr kurzen Peptid aus α3(IV)NC1 die Bildung von Antikörperablagerungen an der Basalmembran beschrieben [3], [75]. Das Peptid wurde durch Kartierung als T-Zell-Epitop identifiziert. Aufgrund seiner Größe induziert es normalerweise keine

B-Zellaktivierung. Möglicherweise werden in diesem Modell durch T-Zell-bedingte Schäden in der Kollagenstruktur kryptische B-Zell-Epitope freigelegt, die zur Bildung von Antikörpern führen.

2.4 Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis (EAG)

Das bestuntersuchte Modell für eine GN mit Halbmondbildung (*crescentic GN*) ist die Nephrotoxische Serumnephritis (NTN). Heterologe anti-Maus-GBM-Antikörper aus dem Schaf werden einer Maus injiziert. Diese lagern sich als Immunkomplexe an der GBM ab und induzieren eine humorale und zelluläre Immunantwort. Innerhalb von 14 Tagen kommt es zum kompletten Funktionsverlust der Niere aufgrund massiver Halbmondbildung in den Glomeruli. Dieses Modell ist gut für die Analyse der zellulären Immunantwort geeignet, lässt aber keine Untersuchung der autoimmunen Prozesse zu, die zu einer anti-GBM-GN führen.

Für die Untersuchung von autoreaktiven Mechanismen wurden Modelle entwickelt, bei denen die Bildung von Autoantikörpern gegen glomeruläre Strukturen induziert werden kann. Steblay beschrieb zum ersten Mal die Immunisierung von Schafen mit GBM in komplettem Freundschen Adjuvans [64]. Die Tiere entwickelten daraufhin schwere Nierenentzündungen mit Halbmondbildung in den Glomeruli und erhöhten BUN-Werten. Ähnliche EAG-Modelle wurden später in Ratten und Mäusen beschrieben. Zunächst wurden für die Immunisierungen Präparationen aus Rinder- oder Ratten-GBM verwendet [62], [55], [5], [25], [58]. Nach Identifikation des Goodpasture-Antigens wurde das rekombinante α3(IV)NC1 eingesetzt [61] [60], [21], [29]. Alle Modelle spiegeln die wichtigsten Parameter der humanen anti-GBM-GN wider. Diese sind die Ablagerung von Autoantikörpern entlang der GBM, eine teilweise schwere Entzündung der Glomeruli mit Halbmondbildung und Fibrinablagerungen sowie ein schwerer tubulointerstitieller Schaden. Bezüglich des zeitlichen Verlaufs und der Ausprägung der Glomerulonephritis treten jedoch deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Maus- und Ratten-Inzuchtstämmen auf [21], [57]. In der vorliegenden Arbeit wurde das von Hopfer *et al.* entwickelte EAG-Modell in der DBA/1J-Maus verwendet. Dabei werden die Mäuse 4-mal mit rekombinant hergestelltem α3(IV)NC1 in komplettem Freundschen Adjuvans (initial) bzw. in inkomplettem Freundschen Adjuvans (zur Verstärkung) immunisiert [20]. In den ersten Wochen werden große Mengen an Autoantikörper gegen α3(IV)NC1 gebildet, deren Ablagerung entlang der glomerulären Basalmembran ab etwa Woche 5 nachweisbar ist. Diese Ablagerungen sind in der Maus eher granulär, im Gegensatz zur linearen Ablagerung in Patienten. Die Tiere zeigen meist eine ausgeprägte Proteinurie ab Woche 6, die sich erst spät zu einer teilweise schweren Entzündung der Glomeruli mit Halbmondbildung und Fibrinablagerungen sowie tubulointerstitiellem Schaden entwickelt. Erstaunlicherweise zeigen DBA/1J-Mäuse, die mit der gleichen Methode immunisiert werden, jedoch nur eine statt drei Verstärker-Immunisierungen erhalten, keine schwere Nierenentzündung [77]. Alle klinischen Parameter spiegeln vielmehr eine humane membranöse Glomerulonephritis wider. Zu diesen Krankheitsanzeichen zählen schwere Albuminurie gefolgt von einer Albuminarmut im Blut (Hypoalbuminämie), einem hohen Fettgehalt im Blut (Hyperlipidämie) und häufig die Bil-

dung von Ödemen. Wie auch in der menschlichen membranösen GN formen Autoantikörper und α3(IV)NC1 Immunkomplexe, die als subepitheliale elektronendichte Ablagerungen unter einer verdickten Basalmembran erkennbar sind. Ein weiteres typisches Merkmal der membranösen GN ist das deutlich sichtbare Verschmelzen der Fußfortsätze mit dem Zellkörper der Podozyten, was zur Aufweitung der Schlitzmembran und damit zur Proteinurie führt. Da die Anfangsphase des hier beschriebenen Modells dem von Zhang *et al.* beschriebenen Verlauf sehr stark ähnelt, ist eine Überlagerung zweier immunologischer Prozesse wahrscheinlich. Die Immunisierung mit dem Antigen in komplettem Freundschen Adjuvans induziert in den Mäusen die Bildung von Autoantikörpern, die zu einem nephrotischen Syndrom führt. Durch die wiederholte Gabe des Antigens wird offenbar eine T-Zellantwort ausgelöst oder verstärkt, die eine Rekrutierung von Makrophagen in die Niere bewirkt und damit eine Nephritis verursacht. Die schwere Entzündung führt zum Funktionsausfall der Glomeruli und dadurch zum Anstieg der BUN-Werte. Für die volle Entwicklung der EAG ist also eine mehrfache Immunisierung einer immunologisch gesunden und genetisch anfälligen Maus nötig.

2.5 T-Lymphozyten und Antigenpräsentation

Daten aus Patienten mit anti-GBM-GN und aus dem EAG-Modell [20] zeigen deutlich eine Beteiligung von $CD4^+$T-Zellen an der Krankheitsentwicklung. In HLA-DRB1*15:01 transgenen Mäusen konnte eine Glomerulonephritis durch den Transfer eines α3(IV)NC1-Peptid-spezifischem T-Zellklons transferiert werden [44].

T-Zell-Vorläufer wandern aus dem Knochenmark in den Thymus und ordnen dort die Gene für ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) um. Es entwickeln sich $CD3^+$ Zellen mit dem T-Zell-Rezeptortyp α:β oder γ:δ. Dieser TZR wird auf der Oberfläche der naiven Zelle zusammen mit den Corezeptoren CD4 und CD8 exprimiert. Er besitzt nur eine Spezifität und erkennt Antigenfragmente, die mittels Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentiert werden. Ist der TZR mit den körpereigenen MHC-Molekülen kompatibel, so erhält sie Überlebenssignale. Nach dieser positiven Selektion verliert sie die Expression eines der beiden Corezeptoren und wird damit zu einer einfach positiven $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zelle. In der folgenden Negativ-Selektion werden T-Zellen eliminiert, die an Autoantigene binden. Dadurch entsteht eine zentrale Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen. Nach dieser zweifachen Auslese können die überlebenden T-Zellen reifen und den Thymus verlassen. $CD4^+$ T-Zellen erkennen ihr Antigen nur im Kontext mit MHC-II. B-Zellen, Makrophagen und andere professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ) nehmen Proteine aus dem extrazellulären Raum auf und bauen diese zu Peptiden ab. MHC-II-Moleküle werden mit diesen Peptiden beladen und zur Zelloberfläche transportiert, wo sie von spezifischen $CD4^+$ T-Zellen erkannt werden können [41]. Im Menschen gibt es verschiedene MHC-Gene, die sogenannten Human Leukocyte Antigen- (HLA-) Gene. Diese kodieren für verschiedene Moleküle der MHC-Klassen und werden individuell vererbt. Daher können Menschen aufgrund ihres MHC-Haplotyps unterschiedliche Anfälligkeiten für T-Zell-abhängige Krankheiten aufweisen. In der anti-GBM-Nephritis weisen Patienten 3,5-mal so häufig das Gen HLA-DRB1*15:01 auf wie die normale

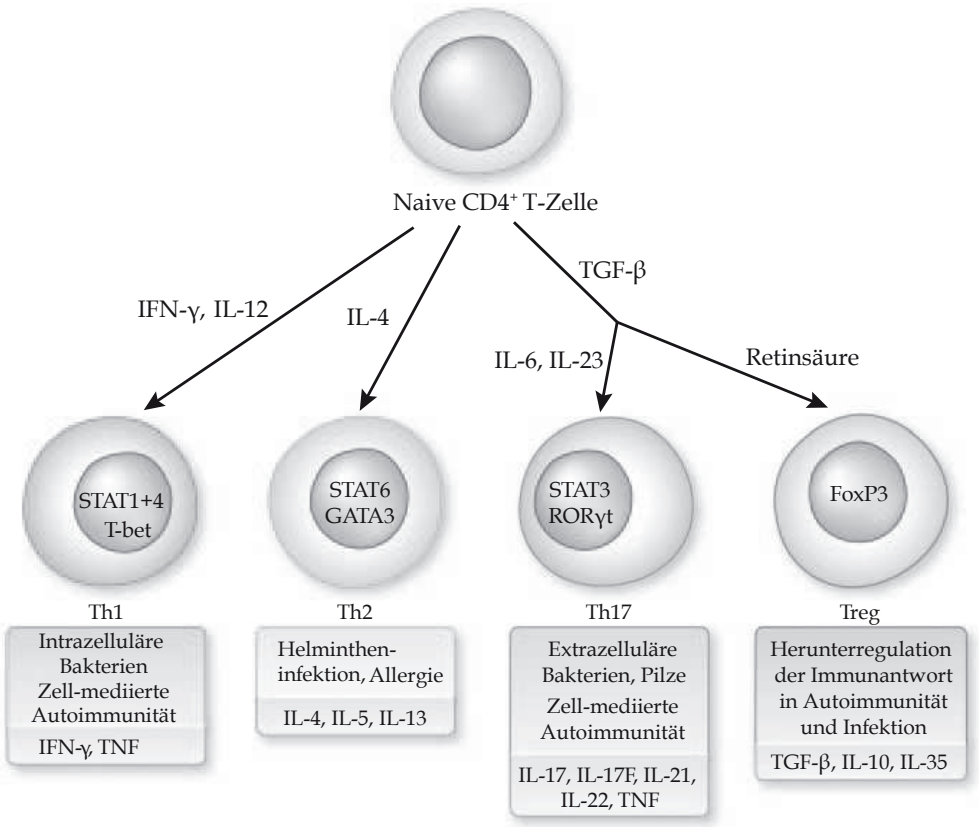

Abbildung 4: Zytokinprofil und Transkriptionsfaktoren von verschiedenen CD4$^+$ T-Zellsubpopulationen
Naive T-Zellen können abhängig von ihrem Zytokin-Millieu entweder zu proinflammatorischen Th1-, Th2- oder Th17-Zellen differenzieren oder sich zu regulatorischen Treg-Zellen entwickeln. Während der Differenzierung werden spezifische Transkriptionsfaktoren exprimiert, welche ihrerseits die Zytokinproduktion der einzelnen T-Zellsubpopulationen steuern. Abbildung adaptiert nach [67]

Bevölkerung.

CD4$^+$ T-Zellen differenzieren im Rahmen von Immunantworten zu spezialisierten T-Helferzellen (Th) [67]. Je nach Zytokinumfeld entstehen hauptsächlich die proinflammatorischen Th1-, Th2- oder Th17-Zellen bzw. die regulatorischen Treg-Zellen. In Abb.4 sind die wichtigsten Transkriptionsfaktoren und die produzierten Zytokine dieser Gruppen dargestellt.

Regulatorische T-Zellen entstehen während der T-Zellentwicklung im Thymus (natürliche Treg) oder in der Peripherie in Gegenwart von TGF-β (induzierte Treg). Sie können Immunantworten u.a. durch die Produktion der anti-inflammatorischen Zytokine Interleukin-10 (IL-10) und *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) unterdrücken. Dadurch kontrollieren sie überschießende Immunantworten oder autoreaktive Prozesse. Treg-Zellen sind durch die Expression des Oberflächenmarkers CD25 und des Transkriptionsfaktors Foxp3 charakterisiert. Sie vermitteln eine periphere Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen.

Th2-Zellen entstehen unter dem Einfluss von IL-4 und produzieren selbst IL-4, IL-5 und IL-13. Sie sind besonders für die Immunantwort gegen Parasiten verantwortlich und spielen eine Rolle bei der Entstehung von Allergien.

Unter Einwirkung von IL-1, IL-6, IL-21 und TGF-β entstehen Th17-Zellen, IL-23 wird für die Stabilisierung und Expansion der Population benötigt. Th17-Zellen produzieren vor allem IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 sowie *Tumor Necrosis Factor-a* (TNF). Ihre Hauptaufgabe ist die Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen. IL-17A induziert u.a. die Produktion der Chemokine CXCL1 und CXCL2, welche die Mobilisierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten steuern. Th17-Zellen spielen außerdem eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten. Mäuse, denen die p19 Untereinheit des Interleukin-23 fehlt, entwickeln eine normale Th1-Antwort, aber die Anzahl ihrer Th17-Zellen ist stark reduziert. Sie sind u.a. gegen die Entstehung der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis (EAE, [11]) und der Collageninduzierten Arthritis (CIA, [40]) geschützt. Tiere, die kein IL-17A produzieren, entwickeln in beiden Modellen ebenfalls deutlich schwächere Krankheitsanzeichen [31]. In der nephrotoxischen Serumnephritis (NTN) zeigten sowohl IL23p19$^{-/-}$ Tiere als auch IL-17A$^{-/-}$ Tiere verminderte Nierenpathologie und –entzündung [51]. Ein weiteres Modell, dass dem in dieser Arbeit verwendeten Modell ähnelt, belegte auch für die EAG eine Beteiligung von Th17-Zellen an der Nierenschädigung [46].

Für die Entstehung von Th1-Zellen ist vor allem das IL-12 verantwortlich, das u.a. von Makrophagen produziert wird. Th1-Zellen sekretieren bei Aktivierung TNF und Interferon-γ (IFN-γ). IFN-γ aktiviert Makrophagen, die dann u.a. die induzierbare NO-Synthase (iNOS) für die Synthese von NO exprimieren, und ist essentiell für die effektive Bekämpfung von intrazellulären Bakterien. Daten von Patienten und aus Experimenten belegen eine Rolle für Th1-Zellen in Zell-vermittelten Autoimmunkrankheiten wie z. B. Multiple Sklerose, Morbus Crohn, Rheumatoide Arthritis und anti-GBM-GN [67]. In experimentellen Modellen für Nierenkrankheiten sind gegenteilige Rollen für IFN-γ und damit die Th1-Antwort aufgezeigt worden. Während im NTN-Modell eine proinflammatorische Wirkung von IFN-γ beschrieben wurde [28], zeigten Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe eine protektive Rolle des Zytokins in einem EAG-Modell [29].

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die anti-Glomeruläre Basalmembran Glomerulonephritis (anti-GBM GN) wird klassischerweise als antikörpervermittelte Autoimmunerkrankung verstanden. Beobachtungen in Patienten aber auch in experimentellen Modellen dieser Erkrankung weisen aber auf eine Rolle von $CD4^+$ T-Zellen in der Entstehung der Erkrankung und auf eine direkte Beteiligung der Zellen an der Schädigung der Niere hin. Insgesamt ist die Funktion von $CD4^+$ T-Zellen in der anti-GBM GN aber unklar. In der vorliegenden Arbeit sollte das Mausmodell der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis (EAG) genutzt werden um die Funktion von $CD4^+$ T-Zellen zu charakterisieren. In diesem Modell werden DBA/1J-Mäuse mit einem rekombinantem Kollagen-Fragment, dem α3(IV)NC1, immunisiert und entwickeln daraufhin eine Nierenerkrankung, die in den wesentlichen Parametern mit der humanen anti-GBM GN vergleichbar ist. Mit diesem Modell sollten die folgenden Hypothesen überprüft werden.

1. *Die Immunisierung mit Maus-a3(IV)NC1 führt zu einer Entwicklung der EAG.*
   In dem bisher etablierten EAG-Modell wurden DBA/1J Mäuse mit dem humanen α3(IV)NC1 immunisiert. In diesem Projekt sollte nun das homologe Maus-α3(IV)NC1, also das genuine Autoantigen, verwendet werden, um in DBA/1J Mäusen eine EAG zu induzieren. In diesem Ansatz sollte dann der Verlauf und die Schwere der Erkrankung charakterisiert werden.

2. *Die Immunisierung mit a3(IV)NC1 induziert eine spezifischen $CD4^+$ T-Zellantwort und diese T-Zellen akkumulieren in der entzündeten Niere.*
   In Vorarbeiten konnten im EAG-Modell α3(IV)NC1-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit sollte daher eine sensitive Methode etabliert werden, mit der α3(IV)NC1-spezifische T-Zellen im Durchflusszytometer nachgewiesen werden können. Diese Methode sollte dann verwendet werden um in immunisierten DBA/1J Mäusen α3(IV)NC1-spezifische T-Zellen in der Milz und in der entzündeten Niere nachzuweisen und diese T-Zellen bezüglich ihrer Zytokinexpression zu charakterisieren.

3. *Der Verlauf und die Schwere der EAG werden durch Th1- und Th17-Zellen kontrolliert.*
   Studien in anderen Modellen der Glomerulonephritis zeigten, dass abhängig vom Modell Th1 und/oder Th17-Zellen den Krankheitsverlauf beeinflussen. In *Knockout*-Mäusen, die aufgrund einer Defizienz des Interferon-γ-Rezeptors bzw. des Interleukins-17A oder des Interleukins-23 eingeschränkte Th1 bzw. Th17-Antworten ausbilden, sollte nach Immunisierung mit α3(IV)NC1 der Verlauf der EAG untersucht werden. Neben den klinischen Krankheitsparametern und der Schädigung der Niere sollte insbesondere auch die spezifische B- und T-Zellantwort gegen α3(IV)NC1 in diesen Tieren charakterisiert werden.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war ein besseres Verständnis der Funktion von $CD4^+$ T-Zellen in der EAG. Langfristig sollen diese Ergebnisse zur Klärung der Rolle von T-Zellen in der humanen anti-GBN GN beitragen und zu verbesserten Behandlungsstrategien führen.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle Arbeiten wurden mit Hilfe von Standard-Laborgeräten durchgeführt. Spezielle Geräte werden direkt in der Beschreibung der Methoden erwähnt.

Die Standdardlabormaterialien stammen von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frickenhausen), Nunc (Langselbold), BD (Heidelberg) und Eppendorf (Hamburg).

3.1.1 Feinchemikalien, Enzyme, Antikörper und Oligonukleotide

Desoxyribonuklease I	Sigma-Aldrich, St. Louis
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching
Flag-Peptid	Sigma-Aldrich, St. Louis
Kollagenase D	Roche, Mannheim
Kollagenase VIII	Sigma-Aldrich, St. Louis
normales Rattenserum	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
Percoll Separation Solution	Biochrom AG, Berlin
Rattenserum	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Urinteststreifen	Siemens, Tarrytown, USA

Kits

Mouse Albumin ELISA Quantitation Set	Bethyl, Montgomery, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
ZytoChem Plus AP Polymer Kit	Zytomed Systems GmbH, Berlin

Alle Zellkulturzusätze (Gibco®) und Feinchemikalien für die molekularbiologischen Methoden (Invitrogen™, AppliedBiosystems®) stammen von Life Technologies (Carlsbad).

Sonstige Standardchemikalien wurden von den Herstellern Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (St. Louis) bezogen.

Tabelle 1: Primer für die quantitative *Real-time*-PCR

Name		Sequenz
18S	forward	CAC GGC CGG TAC AGT GAA AC
18S	reverse	AGA GGA GCG AGC GAC CAA A
CXCL1	forward	GCA CCC AAA CCG AAG TCA TAG
CXCL1	reverse	CAA GGG AGC TTC AGG GTC AA
CXCL2	forward	CAC TGC GCC CAG ACA GAA
CXCL2	reverse	CAG GGT CAA GGC AAA CTT TTT G
CXCL5	forward	TGG CAT TTC TGT TGC TGT TCA
CXCL5	reverse	TTG CGG CTA TGA CTG AGG AA
CXCL9	forward	CCC AAG CCC CAA TTG CA
CXCL9	reverse	GCA GGT TTG ATC TCC GTT C
Foxp3	forward	CCC AGG AAA GAC AGC CTT
Foxp3	reverse	TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG
iNOS	forward	GCT GTT CTC AGC CCA ACA AT
iNOS	reverse	TTC TGT GCT GTC CCA GTG AG
TNF	forward	AAA TGG CCT CCC TCT CAT CAG T
TNF	reverse	GCT TGT CAC TCG AAT TTT GAG AAG

Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, hergestellt.

Tabelle 2: TaqMan Expressionsassays für die quantitative *Real-time*-PCR

Zielgen	TaqMan Assay von LifeTechnologies (Applied Biosystems®)
IFN-γ	Mm01168134_m1
IL-17A	Mm00439618_m1

Tabelle 3: Antikörper für Immunhistochemie und ELISA

Antigen	Wirt	Konjugat/ *Klon*	Hersteller
Maus-IgG+IgM	Ziege	HRP	Life Technologies, Carlsbad, USA
Maus-IgG1	Ziege	HRP	Southern Biotech, Birningham, USA
Maus-IgG2a	Kaninchen	HRP	Life Technologies, Carlsbad, USA
Maus-IgG2b	Kaninchen	HRP	Life Technologies, Carlsbad, USA
Flag	Maus	*M2*	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
F4/80	Ratte	*BM8*	BMA, Hamburg
Maus-IgG	Kaninchen	-	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
CD3	Kaninchen	*A0452*	Dako, Hamburg

Tabelle 4: Anti-Maus Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Synomym	Wirt	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD4	L3T4	Rt	AF700	RM4-5	BioLeg
CD16, CD32	mFcRezeptor	Rt	-	2.4G2	BioXcell
CD45	Ly-5, LCA	Rt	PerCP	30-F11	BioLeg
CD154	CD40L	Hm	APC	MR1	eBio
IFN-γ	IFN-gamma	Rt	V450	XMG1.2	BD
IL-17A	IL-17A	Rt	PE	TC11-18H10.1	BioLeg
TNF	TNF-alpha	Rt	PE-Cy7	MP6-XT22	eBio

BD: BD Biosciences, Heidelberg; BioLeg: BioLegend, Fell; BioXCell, Lebanon, USA; eBio: eBiosciences, San Diego, USA

3.1.2 Medien und Lösungen

Selektionsmedium	DMEM 21969 10 % (v/v) FKS 2 mM L-Glutamin 50 Einheiten/ml PenStrep 50 mg/ml Gentamycin 1 µg/ml Puromycin-Dihydrochlorid
RPMI komplett Medium	RPMI 1640 5 % FKS 2 mM L-Glutamin 50 mg/ml Gentamycin 50 µM β-Mercaptoethanol
Erythrozytenlysepuffer pH 7,2	155 mM Ammoniumchlorid 10 mM Kaliumhydrogencarbonat 100 µM EDTA
Saponinpuffer	PBS 0,1 % (w/v) BSA 0,3 % (w/v) Saponin

3.1.3 Software

Alle Abbildungen wurden mit Hilfe von Adobe Illustrator (CS5, Adobe, San José, USA) 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).

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimentelles Arbeiten

Die Mäuse wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) gezüchtet. Alle Tierversuche erfolgten nach den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden in den Räumlichkeiten der zentralen Versuchstierhaltung durchgeführt. Für die Durchführung der Versuche wurde eine Genehmigung durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg (Registrierungsnummer 14/09) erteilt. Bis zu 5 Tiere wurden in individuell ventilierten Käfigen (IVC) bei einem 12/12-Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Versorgung erfolgte mit Standardnagerfutter und Leitungswasser. Für die Versuche wurden Männchen im Alter zwischen 8 und 12 Wochen eingesetzt.

3.2.1.1 Mauslinien

DBA/1J	Charles River, Sulzfeld, wurden am UKE weiter gezüchtet.
DB1-IFNgRKO	Wurden von Prof. Patrick Matthys, KU Leuven, Belgien, zur Verfügung gestellt (Lit.: [16], [23]) und am UKE ein weiteres Mal auf den DBA/1J-Hintergrund zurückgekreuzt.
DB1-IL17AKO	Wurden auf C57B/6-Hintergrund von Dr. C. Hölscher, FZ Borstel, zur Verfügung gestellt (Lit.: [42]) und am UKE mindestens 8 × auf den DBA/1J-Hintergrund zurückgekreuzt.
DB1-IL23P19KO	Wurden auf C57B/6-Hintergrund von Prof. Dr. U. Panzer, UKE Hamburg, zur Verfügung gestellt (Lit.: [17]) und am UKE mindestens 8 × auf den DBA/1J-Hintergrund zurückgekreuzt.

3.2.1.2 Immunisierung

Zur Induktion der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis (EAG) wurden bei den Mäusen eine Erst- und 3 Verstärkungsimmunisierungen durchgeführt.

Je 30 µg humanes (h-) oder Maus (m)-α3(IV)NC1 in 50 µl sterilem PBS wurden mit dem gleichen Volumen Freundschen Adjuvans mit Hilfe von Ultraschall gemischt. Die Emulsion wurde subkutan in den Rücken injiziert. Für die Erstimmunisierung wurde das komplette Freundsche Adjuvans verwendet, für die Verstärkungsimmunisierungen das inkomplette Freundsche Adjuvans.

3.2.1.3 Verlaufskontrolle der EAG

Vor Beginn der Versuche wurden die Mäuse gewogen und Blut- sowie Urinproben zur Bestimmung der Basiswerte gewonnen. Zur Verlaufskontrolle wurden die Tiere 2-mal pro Woche gewogen und ihr Allgemeinzustand untersucht. Zur Gewinnung von Plasma wurden alle 2 Wochen von den Tierpflegern kleine Blutproben von ca. 30 - 70 µl submandibulär entnommen. Ebenfalls im Abstand von 2 Wochen und ab Woche

7 in jeder Woche wurden Urinproben gesammelt. Diese wurden mittels Urinteststreifen auf ihren Proteingehalt hin untersucht und bei -80 °C gelagert. Zeigten sich Auffälligkeiten im Allgemeinzustand oder eine deutliche Proteinurie (ab 300 mg/dl auf dem Urinteststreifen), wurden die Tiere täglich kontrolliert und gewogen, um schwer erkrankte Mäuse zu identifizieren. Schwer kranke Tiere zeigten ein struppiges ungepflegtes Fell, Verhaltensauffälligkeiten (Absonderung von den anderen Tieren, eingeschränkte Motorik) und eine rapide Gewichtszunahme von bis zu 30 % durch Entwicklung von Ödemen. Die auffälligen Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert, das Blut mit 10 µl Minicaps® Glaskapillaren (Hirschmann, Eberstadt) retrobulär entnommen und die Tiere anschließend getötet. Die Organe Milz und Niere wurden nach Perfusion mit PBS entnommen und für verschiedene Analysen konserviert (Histologie, mRNA-Expression) oder direkt untersucht (Durchflusszytometrie). Für die Analyse von T-Zellantworten zu frühen Krankheitsstadien wurden Tiere an Tag 10 nach Immunisierung getötet und die Gewebe direkt untersucht.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellisolierung aus Gewebe

Vor der Entnahme der Milz und der Niere wurden die Organe über den linken Herzventrikel mit gekühltem PBS perfundiert, um den Gehalt an Blutzellen zu minimieren. Die Organe wurden von Resten anderer Gewebe (Fett, Blutgefäße) gesäubert und gekühlt für die verschiedenen Analysen präpariert.

Die Nieren wurden von der Nierenkapsel befreit und das für die FACS-Analyse bestimmte Gewebe zerkleinert. Es folgte ein Verdau mit je 250 µg/ml Kollagenase D und Kollagenase 8 sowie 10 Einheiten/ml DNAse I in 20 ml RPMI für 45 min bei 37 °C. Nach der Passage durch ein 200 µm Metallsieb und einem Waschschritt wurden die Zellen einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen (70 % Easycoll in RPMI komplett und 40 % Easycoll in RPMI komplett). Die oberste Schicht aus Zelltrümmern, Geweberesten und anhaftenden Makrophagen wurde verworfen, die übrigen Zellen mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde einer Erythrozytenlyse unterworfen und die Zellsuspension über ein 70 µm Zellsieb filtriert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen für die Restimulation bzw. Oberflächenfärbung in FACS-Röhrchen aufgeteilt.

Das für die FACS-Analyse bestimmte Milzgewebe wurde durch ein 200 µm Metallsieb passiert und mit gekühltem PBS in Suspension gebracht. Nach Zentrifugation für 5 min bei 250 g wurden die Erythrozyten lysiert und die Zellsuspension über ein 70 µm Zellsieb filtriert. Nach erneutem Waschen wurden das Pellet in 3 bis 5 ml PBS aufgenommen und die Anzahl der vitalen Zellen mittels Trypanblau-färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.2.2.2 *In vitro* Stimulation

Für die Stimulation wurden 1 bis 2 Millionen Zellen in 1 ml RPMI komplett eingesetzt. Die Inkubation erfolgte spezifisch mit 54 µg/ml humanem oder Maus-α3(IV)NC1 für 8 Stunden bei 37 °C. Nach Ablauf der ersten 4 Stunden wurden 10 µg/ml Brefeldin A zugesetzt, um die Sekretion von produzierten Zytokinen zu

unterbinden und diese im Endoplasmatischen Retikulum anzureichern. Die polyklonale Kontrollstimulation erfolgte mit 50 ng/ml Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) und 1 µM Ionomycin.

Den angereicherten Lymphozyten aus der Niere wurden vor der Inkubation ca. 5 x 10^5mit 1 µM CFSE angefärbte naive Milzzellen zugesetzt, um die Antigenpräsentation durch eine ausreichende Anzahl Antigen-präsentierender Zellen zu gewährleisten. Dazu wurde eine Einzelzellsuspension naiver Milzzellen in 3 ml PBS hergestellt. Die 10 mM CFSE-Lösung wurde zunächst in DMSO 1:10 verdünnt und anschließend 3 µl davon in die Zellsuspension pipettiert. Die Färbung erfolgte unter Lichtausschluss und gelegentlichem Bewegen bei 37 °C im Wasserbad und wurde nach 3 min durch Zugabe von 45 ml kaltem PBS gestoppt.

3.2.2.3 Durchflusszytometrie

Intrazelluläre und Oberflächen-Färbung
Nach der *in vitro* Stimulation wurden intrazelluläre und Oberflächenmoleküle in einem Schritt gefärbt. Dies war möglich, da die hier analysierten extrazellulären Epitope erfahrungsgemäß nicht durch die Behandlung beeinflusst wurden. In der Regel wurden 1-2 x 10^6vitale Milzzellen einer Einzelzellsuspension in 100 µl PBS in FACS-Röhrchen aus Polystyrol eingesetzt, die T-Zellen aus der Niere wurden nicht gesondert gezählt. Die Zellen wurden nach dem Waschen in 2 % Paraformaldehyd in PBS resuspendiert und zur Fixierung für 20 min bei RT, gegebenenfalls im Dunkeln, inkubiert. Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen mit 1 % nativem Rattenserum und 10 µg/ml Fc-Block (unkonjugierter anti-CD16/CD32 mAK) in Saponinpuffer. Die 5-minütige Inkubation bei RT mit dem milden Detergenz Saponin permeabilisiert die Zellmembran und ermöglicht den Zugang zu intrazellulären Epitopen. Die Färbung mit fluorochromgekoppelten Antikörpern erfolgte bei RT für 15 min ebenfalls in Saponinpuffer (s. [39]). Dabei orientierten sich die eingesetzten Mengen Antikörper an den Ergebnissen der im Labor standardmäßig durchgeführten Titrationen. Nach der Inkubation wurde mit PBS gewaschen und die Zellen bis zur Analyse lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt. Die benutzten Antikörper-Konjugate sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Durchflusszytometrische Analyse
Die Durchflusszytometrie (im Folgenden kurz FACS) wurde zur Analyse der Expression von Oberflächen- und intrazellulären Proteinen sowie der Größe und Granularität einzelner Zellen genutzt. Die vereinzelten gefärbten Zellen werden mit Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge bestrahlt und die Streuung sowie die Absorption gemessen. Diese Daten werden in Punktwolken dargestellt und ermöglichen so die grafische Auswertung der verschiedenen Parameter. Das hier genutzte Gerät FACS Canto II (BD Biosciences, Heidelberg) erlaubte die Messung von bis zu 8 Fluorochromen.

Zur Eingrenzung der T-Zellen wurden diese anhand von Größe (im Vorwärtsstreulicht, FSC-Kanal) und Granularität (im Seitwärtsstreulicht, SSC-Kanal) ausgewählt

und Zelltrümmer sowie Verschmutzungen abgetrennt. Für die Analyse der Nierenzellen waren zuvor die CFSE-gefärbten Zellen ausgeschlossen worden. Die vereinzelten Zellen konnten von Zellaggregaten abgegrenzt werden, da sich im FSC-Kanal die Höhe (H) zur Fläche (A) des Signals der Einzelzellen proportional verhält. Aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz in den Kanälen V510 und V450 konnten tote Zellen weitestgehend ausgeschlossen werden. Die T-Helfer-Zellen wurden aufgrund der Expression von CD45 und CD4 ausgewählt und bildeten damit die in dieser Arbeit untersuchte Population der vitalen einzelnen $CD4^+$ T-Helferzellen. Die im Ergebnisteil angegebenen Prozentangaben zytokinproduzierender Zellen beziehen sich auf diese Population. In Abbildung 5 ist die grafische Eingrenzung der analysierten Zellpopulation gezeigt.

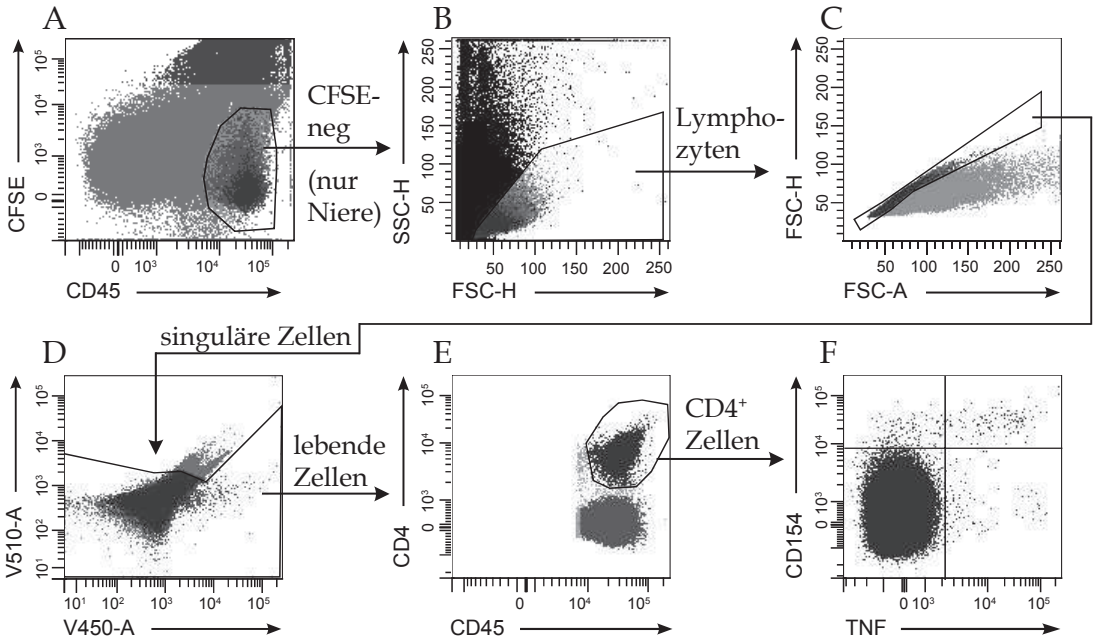

Abbildung 5: Eingrenzung der lebenden $CD4^+$ T-Helferzellen im FACS
Für die Analyse der T-Zellen aus Nierengewebe wurden nur CFSE-negative Zellen ausgewählt, für Zellen aus der Milz wurde dieser Schritt ausgelassen. Über die Größe (FSC-Kanal) und Granularität (SSC-Kanal) wurden Verunreinigungen und Zelltrümmer ausgeschlossen. Einzelne Zellen verhalten sich in Höhe (H) und Fläche (A) des FSC-Signals proportional. Nicht vitale Zellen wurden über ihre Eigenfluoreszenz in den Kanälen V-510 und V450 ausgegrenzt. Nur $CD45^+$ und $CD4^+$ Zellen wurden auf ihre Zytokinproduktion hin untersucht.

3.2.2.4 Zellkultur

Die stabil transfizierten HEK293-EBNA-Zellen wurden von Dr. H. Hopfer (Universitätsspital Basel) zur Verfügung gestellt [21]. Sie enthalten ein modifiziertes pCEP-Pu Plasmid, welches eine Puromycinresistenz für die Selektion vermittelt. Das hier verwendete Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus einer N-terminalen BM-40-Signalsequenz, einem Flag-Tag (DYKDDDDK) und dem h- oder m-α-(IV)NC1-Peptid. Die Signalsequenz gewährleistet die Sekretion des rekombinanten Proteins in

das Zellkulturmedium, während das Flag-Tag zur Aufreinigung genutzt wird (Proteinaufreinigung s. 3.2.4.3). Die h- oder m-α-3(IV)NC1-Domäne besteht aus der eigentlichen NC1-Domäne und zusätzlich aus den letzten 10 Aminosäuren des Kollagens Typ IV.

Die adhärenten Zellen wurden in Selektionsmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 auf Zellkulturschalen (CellStar®, Greiner, Kremsmünster, A) kultiviert. Nach dem Auftauen erfolgte eine Regeneration ohne Puromycin-Dihydrochlorid, welches dem Selektionsmedium nach 24 Stunden zugesetzt wurde. Die selektierten Zellen wurden vermehrt, bis die gewünschte Menge erreicht war. Bei 80-90%-iger Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Erntemedium (DMEM + PenStrep + Gentamycin) zugegeben. Die Überstände wurden nach 2 - 3 Tagen abgenommen und bis zur Aufreinigung bei -80 °C gelagert. Nach 2 bis 3 Ernten erfolgte das Ablösen der gewaschenen Zellen mit Trypsin, Stoppen der Reaktion und Vermehrung von 1/5 bis 1/8 der Zellen in Selektionsmedium für einen neuen Erntezyklus.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

Aus Milzen und Nieren wurde Ribonukleinsäure (RNA) isoliert und für die Expressionsanalyse der codierten Proteine in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) transkribiert. Die Analyse erfolgte mit spezifischen Primern durch quantitative *Real-time* PCR. Die Feinchemikalien für die molekularbiologischen Methoden (Invitrogen™, AppliedBiosystems®) stammen von Life Technologies (Carlsbad). Das SYBR Green-haltige Reagenz SYBR Green Jumpstart Tag ReadyMix wurde von Sigma-Aldrich (St. Louis) bezogen. Das StepOne Plus *Real-time* PCR System stammt ebenfalls von Life Technologies. Die Arbeitsschritte wurden unter weitestgehender Vermeidung von RNAse-Kontamination durchgeführt.

3.2.3.1 quantitative *Real-time* RT-PCR

Die quantitative *Real-time* PCR erlaubt die präzise Quantifizierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen aus einer komplexen Mischung auch bei geringen Ausgangsmengen. Durch die Kombination mit einer reversen Transkription erlaubt sie die quantitative Bestimmung von RNA-Transkriptionsniveaus und damit eine Expressionsanalyse bestimmter Gene zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme. Dafür wird gesamt-RNA in cDNA transkribiert und mit spezifischen Primern 90 bis 120 bp des Zielgens amplifiziert. Durch Einlagern interkalierender Farbstoffe in die Doppelstrang-DNA oder durch Hydrolyse einer mit Quencher und Fluorophor markierten DNA-Sonde verändert sich die Fluoreszenz der Probe. Diese kann in Echtzeit gemessen werden. Dabei korreliert die Geschwindigkeit, mit der die Menge einer amplifizierten Zielsequenz einen detektierbaren Schwellenwert erreicht, mit der ursprünglich eingesetzten Menge (vgl. [14].)

3.2.3.2 RNA-Isolierung

Für die Expressionsanalyse wurde aus Gewebe Gesamt-RNA unter Verwendung des Trizol®Reagent isoliert. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Kombination aus Guanidin-Isothiocyanat-Lyse und Phenol-Chloroformextraktion nach Chomczynski und Sacchi [8].

Die zu untersuchende Gewebeprobe (1/6 Niere bzw. ein ca. 3 mm breites Stück Milz) wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 300 µl Trizol in Trockeneis eingefroren und bis zur Verwendung bei -80° C gelagert. Zur Homogenisierung wurde eine 3 mm Wolfram-Hartmetall-Kugel zu der angetauten Probe gegeben und diese im Tissue-Lyser (Qiagen, Hilden) für 4 min bei einer Frequenz von 30/s zerkleinert. Nach der anschließenden Zugabe von 700 µl Trizol wurde die RNA-Isolierung nach Herstellerangaben mit Chloroform und Isopropanol durchgeführt. Die gewonnene RNA wurde mit 75%-igem EtOH gewaschen und in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser mit 5 % RNAseOUT aufgenommen.

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl der RNA-Lösung 1:10 verdünnt und ihre Absorption im Nano-Drop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) bei 260 und 280 nm gemessen. Die Konzentration in ng/µl ergibt sich aus dem Produkt der Absorption bei 260 nm x 40 x Verdünnung. Für reine RNA ergibt der Quotient der Absorptionen A260/280 einen Wert > 2.

Mit dieser Methode konnte Gesamt-RNA aufgereinigt werden, welche vor allem aus rRNA, tRNA, mRNA und hnRNA besteht. Die zu analysierenden Transkripte sind auf der hnRNA und der daraus entstehenden mRNA zu finden. Zur Normierung der Transkriptmenge wird die 18S rRNA herangezogen. Sie ist Teil des Ribosoms und unterliegt keiner differentiellen Expression, sodass sie als interner Standard bei der quantitativen *Real-time*-PCR genutzt werden kann.

3.2.3.3 c-DNA-Synthese

Für die reverse Transkription der RNA in cDNA wurden M-MLV Reverse Transkriptase und Random-Hexamer-Primer verwendet. Gemäß Herstelleranleitung wurden 200 ng RNA, 100 ng Hexamer-Primer und 10 nmol dNTP-Lösung mit hochreinem Wasser auf 12 µl aufgefüllt und im Thermocycler gemäß Programm 1 in der unten stehenden Tabelle inkubiert. Anschließend wurden 8 µl eines Gemisches aus 4 µl 5x First-Strand-Buffer, 0,2 µmol DTT und 200 Einheiten M-MLV Reverse Transkriptase in hochreinem Wasser zugefügt und die Synthese gemäß Programm 2 durchgeführt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert und innerhalb weniger Tage verwendet.

Programm 1		Programm 2	
Inkubation		c-DNA Synthese	
5 min	65 °C	50 min	37 °C
∞	4 °C	15 min	70 °C
		∞	4 °C

3.2.3.4 Durchführung und Auswertung der quantitativen *Real-time* PCR

Die quantitative *Real-time* PCR wurde in speziellen 96-well-Platten durchgeführt. Abhängig vom Zielgen wurde SYBR Green als interkalierender Farbstoff bzw. ein TaqMan Expression Assay gemäß den in Tabelle 6 angegebenen Reaktionsansätzen verwendet. Die PCR-Programme sind in Abb. 6 aufgeführt. Für die Auswertung wurde die ΔCT-Methode (engl. *cycle threshold*) angewandt.

Tabelle 6: Reaktionsansätze für die quantitative *Real-time* PCR

SYBR Green Reagenz			TaqMan Gene Expressionsassay	
SYBR Green Reagenz	6,25 µl		20x Gene Expression Assay	1 µl
1 µM vorwärts Primer	1,25 µl		2x Gene Expression Master Mix	10 µl
1 µM rückwärts Primer	1,25 µl		cDNA Probe	9 µl
H_2O	2,25 µl			
cDNA Probe	1,5 µl			

Die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz das erste Mal exponentiell zunimmt, wird als CT-Wert bezeichnet. Die Menge der amplifizierten DNA ist zu diesem Zeitpunkt in jeder Probe gleich. Je niedriger dieser Wert, desto höher war die Ausgangskonzentration der cDNA und damit die Expression des Zielgens. Die Bestimmung des CT-Wertes wird in Abb. 7 veranschaulicht. Der CT-Wert musste für jede Probe auf einen aktivierungsunabhängigen Standard normiert werden. In dieser Arbeit wurde dafür die ribosomale 18S RNA genutzt, deren Gehalt bei Aktivierung nicht reguliert wird. Der CT-Wert für das Zielgen wurde von dem CT-Wert für 18S subtrahiert (ΔCT). Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse als $2^{\Delta CT}$ dargestellt.

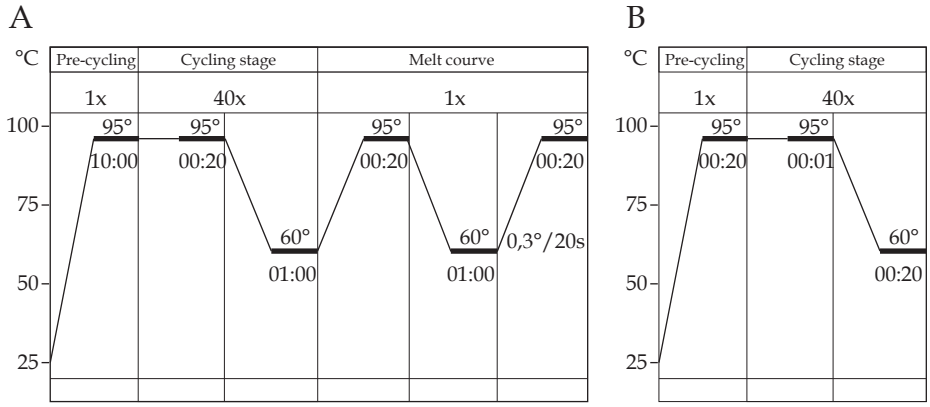

Abbildung 6: Reaktionszyklen der Programme für die qRT-PCR
Temperaturzyklen für (A) SYBR Green und (B) TaqMan Assay

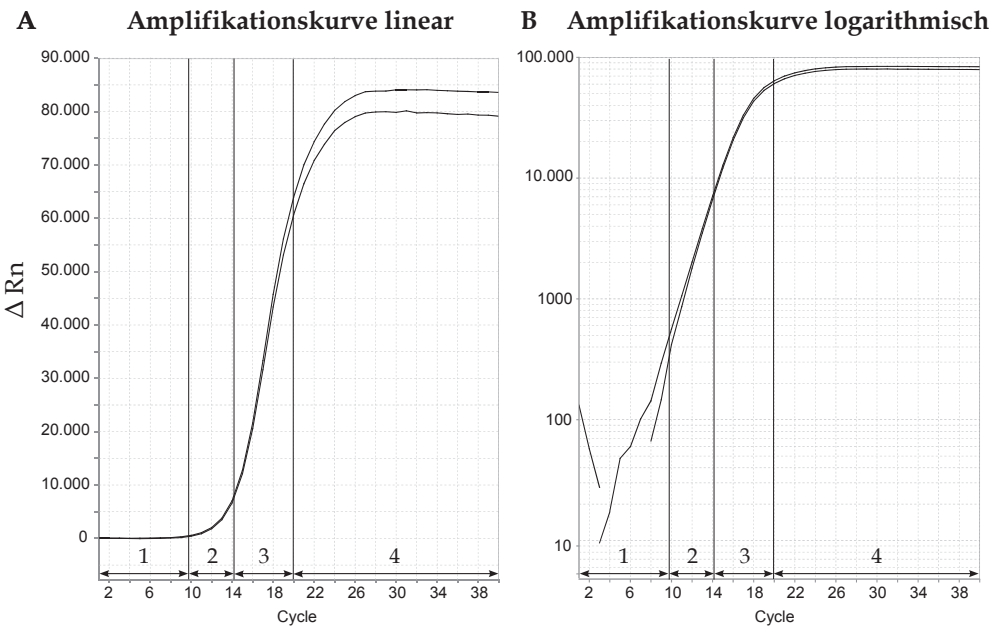

Abbildung 7: Kinetik der PCR-Reaktion
Amplifikationskurven für die Doppelbestimmung einer cDNA-Probe (A) linear und (B) logarithmisch, Ausschnitt vergrößert
Delta RN: Quotient aus Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors und Hintergrundfluoreszenz
Aufgrund der veränderlichen Konzentrationsverteilung der Reagenzien verläuft die Amplifikation der cDNA in 4 Phasen unterschiedlicher Effizienz. In der *Baseline-Phase* (1) führt die geringe Menge an doppelsträngiger DNA zu keiner vor dem Hintergrund detektierbaren Fluoreszenz, obwohl in jedem Zyklus eine Verdopplung stattfindet. Übersteigt die Amplifikatmenge das Detektionslimit des Thermocyclers, ist auch in der grafischen Darstellung eine *exponentielle Phase* (2) von 3 bis 7 Zyklen erkennbar. Sobald die Konzentration der Substrate deutlich abnimmt, kann nicht jeder einzelne DNA-Strang verdoppelt werden, die Produktmenge steigt *linear* (3). Entstandenes Pyrophosphat und Monophosphatnukleotide führen zur Produkthemmung. In der *Plateau-Phase* (4) findet keine Amplifikation mehr statt, da die Aktivität der Polymerase abnimmt und die Substratkonzentrationen zu gering werden. Die geometrische Bestimmung der exponentiellen Phase ist in einer logarithmischen Darstellung des Amplifikation Plot möglich, da die Steigung der Kurve in diesem Bereich linear ist. In diesem exponentiellen Bereich der Kurve wird ein Schwellenwert für Delta RN festgelegt. Der X-Wert des Schnittpunkts gibt den CT-Wert an.

3.2.4 Immunologische Methoden

3.2.4.1 ELISA

Albumin-ELISA
Zur Bestimmung des Albumin-Gehalts im Urin wurde das Maus-Albumin-Quantifizierungsset von Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die aufgetauten Proben wurden vor dem Einsatz gemischt, für 3 min bei

höchster Geschwindigkeit zentrifugiert und in Probenpuffer verdünnt. Alle Messungen erfolgten als Duplikate. Eine Kreatinin-Bestimmung erfolgte durch Standard-Diagnostik-Methoden im Zentrallabor des UKE. Die Albuminwerte wurden für die Auswertung auf den Kreatiningehalt der Probe normalisiert.

Indirekter Antikörper-ELISA
Der Nachweis von α3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern im Plasma erfolgte mittels indirektem ELISA. Spezielle Starwell-Platten von Nunc (Langenselbold) wurden mit 1,35 µg/ml humanem α3(IV)NC1 in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat, pH 8,2 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS/0,02 % Tween 20 erfolgte das Blockieren freier Bindungsstellen mit 1 % BSA in PBS für 30 min bei RT. Die Plasmaproben wurden 1:5000 in PBS/Tween mit 1 % BSA mit 10 µg/ml Flag-Peptid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verdünnt und je 100 µl als Duplikate eingesetzt. Nach Inkubation für 1 Stunde bei RT erfolgte erneutes Waschen und die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-IgG) für 2 Stunden. Für die Bestimmung der IgG-Subklassen wurden die entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper 1:1000 eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit 3,3'5,5'-Tetramethylbenzidin.

3.2.4.2 Immunohistochemie
In dieser Arbeit wurden die histologischen Untersuchungen (Halbmondbildung, tubulo-interstitieller Schaden, Fibrose, Sklerose) von dem Pathologen Dr. Helmut Hopfer, Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel, durchgeführt. Hierfür wurde je eine längs halbierte Niere unmittelbar nach der Organentnahme in 4% Formalinlösung für 24 h bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde das Gewebe 3-mal für ca. 3 h mit PBS gewaschen. Im Institut für Pathologie des UKE wurden die Organe von Frau Mariola Reszka in Paraffin eingebettet. Die weitere Aufarbeitung und Färbung der Proben mittels PAS-Reaktion erfolgte im Institut für Pathologie des Universitätsspitals Basel.

Die Färbungen zur immunhistochemischen Untersuchung der Makrophageninfiltration (F4/80) und IgG-Ablagerungen sowie deren Auswertung erfolgten am Institut für Immunologie am UKE. Das verwendete ZytoChem Plus AP Polymer Kit enthielt Blockierungspuffer, einen Kaninchen-anti-Ratte Brückenantikörper, anti-Kaninchen Alkalische Phosphatase (AP) Komplex sowie Verdünnungspuffer. Die Proben wurden deparaffiniert und die Epitope mit den Enzymen Proteinase 24 (IgG) bzw. Trypsin (F4/80) demaskiert. Nach dem Waschen mit TBS, Blockieren und erneutem Waschen wurde der entsprechende Primär-Antikörper (3) über Nacht bei 4° C inkubiert (für IgG 30 min bei RT). Für die F4/80-Färbung erfolgte nach erneutem Waschen eine 30-minütige Inkubation mit dem Brückenantikörper. Nach der Inkubation der gewaschenen Schnitte mit dem AP Komplex für 30 min bei RT erfolgte die Detektion mit Neufuchsin-Lösung, eine Kernfärbung nach Böhmer und die Differenzierung der Färbung mit HCl-Ethanol.

3.2.4.3 Proteinaufreinigung

Reinigung der α3(IV)NC1-Peptide mittels anti-Flag-Affinitätschromatographie

Die α-3(IV)NC1-Flag-Tag-Fusionsproteine aus HEK293-EBNA Zellüberständen wurden bei 4 °C mittels matrixgebundenem monoklonalen anti-Flag M2-Antikörper gereinigt ([22]). Dazu wurden die aufgetauten Überstände sterilfiltriert, um Zelltrümmer und Zellen zu entfernen, und über eine Säule mit 1 ml M2-Agarose gegeben. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (Glycin-HCl 0,1 M, pH 3,5) in 10 Fraktionen zu je 1 ml, die Neutralisierung durch Zugabe von 30 µl 1 M Tris-HCl (pH 8). Proteinhaltige Fraktionen wurden in Dialysekassetten mit Ausschlussgrenze 10 kDa gegen TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,4) für 3 Tage dialysiert. Der Puffer wurde täglich ausgetauscht. Die dialysierten Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Zur Konzentrierung wurden alle Proben bei 4 °C aufgetaut, vereinigt und in Zentrifugen-Filtereinheiten (Vivaspin 20, Sartorius, Göttingen) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa bei 2500 g und 4 °C auf die gewünschte Konzentration eingeengt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Test (Thermo Fisher Scientific, Rockford) bestimmt, die Proben aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

3.2.5 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 und der Mann-Whitney-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 (*$p < 0{,}05$; **$p < 0{,}01$; ***$p < 0{,}001$). Nicht signifikante Unterschiede wurden nicht ausgewiesen. Weiterhin wurde für einige Daten die gegenseitige Abhängigkeit mittels linearer Regression ermittelt.

3.2.6 Gemeinsam durchgeführte Experimente

Aufgrund des Umfangs der durchgeführten Experimente wurden die *in vivo* Versuche sowie ein Teil der *in vitro* Versuche zusammen mit Frau Dr. Julia Holzer durchgeführt. Die gemeinsamen Arbeiten umfassten für den ersten Teil der Arbeit die Versuchsplanung, die Immunisierung der Tiere sowie Unterstützung bei der Durchführung von ELISAs. Eigenständig durchgeführt wurde die Überwachung des Krankheitsverlaufs, die Entnahme und Aufarbeitung von Blut, Urin und Organen, die Analyse der T-Zellantworten, die Analyse von Labor- und ELISA-Daten sowie die Durchführung der quantitativen *Real-time-PCR*. Im zweiten Teil wurden die Immunhistochemie und die quantitativen *Real-time*-PCR sowie die Antikörper-ELISA gemeinsam durchgeführt, alle anderen Arbeiten erfolgten eigenständig.

4 Ergebnisse

4.1 Die Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis in DBA/1J Mäusen

Die Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis (EAG) weist alle wichtigen Parameter der anti-GBM Nephritis des Menschen auf und ist daher ein geeignetes Modell, um in dieser Krankheit antigen-spezifische T-Zellantworten zu untersuchen. In meiner Arbeitsgruppe wurde bereits der Krankheitsverlauf und die Rolle von $CD4^+$ T-Zellen in der heterolog mit rekombinantem humanen Antigen induzierten EAG beschrieben [20]. Analog zu diesem Modell wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit das rekombinant hergestellte murine Antigen m-α3(IV)NC1 verwendet, um Tiere zu immunisieren und die Funktion von T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung zu untersuchen.

4.1.1 Induktion der EAG mit dem homologen Antigen in DBA/1J Mäusen

Aufgrund ihrer Anfälligkeit für die EAG [21] wurden ca. 8 Wochen alte männliche Tiere des Inzuchtstammes DBA/1J in den hier gezeigten Experimenten eingesetzt. Je 30 µg des Antigens m-α3(IV)NC1 pro Maus wurden mit komplettem Freundschen Adjuvans (KFA) gemischt und subkutan injiziert. Die Immunisierung wurde 3-mal mit Antigen in inkomplettem Freundschen Adjuvans (IFA) in Woche 3, 5 und 7 wiederholt. Das Immunisierungsschema ist in Abbildung 8 dargestellt. Als Kontrolle wurde PBS in entsprechendem Adjuvans verwendet. Während des Beobachtungszeitraumes wurden die Mäuse regelmäßig gewogen, auf allgemeine Auffälligkeiten kontrolliert sowie Blut- und Urinproben gewonnen. Überschritt der Proteingehalt im Urin den Wert 300 mg/dl gemäß Teststreifen, erfolgte die Überwachung täglich. Die Tiere wurden im Endstadium, d. h. bei schweren Anzeichen von EAG, getötet. Schwer kranke Tiere zeigten struppiges Fell, Apathie, Absonderung von der Gruppe sowie rapide Gewichtszunahme durch sichtbare Wassereinlagerungen im Bauchraum. Für die Analysen erfolgte eine finale Blutabnahme. Die Milz sowie beide Nieren wurden nach Perfusion mit PBS entnommen. Das Gewebe wurde aufgeteilt und für die folgenden Analysen aufbereitet bzw. konserviert. Die EAG-Experimente wurden 4-mal mit insgesamt 24 Mäusen durchgeführt.

In Abbildung 9 ist der typische Verlauf der Krankheit für ein Einzelexperiment gezeigt. Ab Woche 10 nach der Immunisierung in KFA wiesen die ersten Tiere der EAG-Gruppe schwere Symptome auf, während Kontroll-Tiere zu keinem Zeitpunkt krank erschienen. In allen Experimenten entwickelten ca. 90 % der immunisierten Tiere eine EAG. Im Endstadium bildeten sich massive Wassereinlagerungen im Bauchraum der kranken Mäuse, was zu einem rapiden Gewichtsanstieg und sichtbaren Ödemen führte (Abb. 9B und 9C). In allen folgenden Abbildungen bezeichnet "EAG" den Zeitpunkt, an dem ein Tier aufgrund der schweren Krankheit getötet wurde.

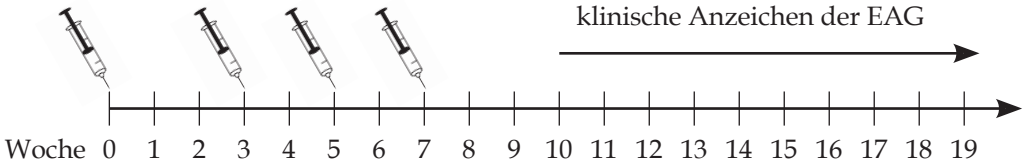

Abbildung 8: Immunisierungsschema
Männliche DBA/1J Mäuse wurden mit 30 µg rekombinant hergestelltem m-α3(IV)NC1 in komplettem Freundschen Adjuvans subkutan immunisiert. 3 Nachimmunisierungen mit 30 µg Antigen in inkomplettem Freundschen Adjuvans erfolgten in den Wochen 3, 5 und 7. Zur Kontrolle des Krankheitsverlaufs wurden in verschiedenen Abständen Blut- und Urinproben gewonnen sowie das Gewicht der Tiere bestimmt. Tiere wurden getötet, wenn sie schwere Anzeichen der EAG aufwiesen. Für die Analyse wurden Blut, Milz und Niere verwendet. Als Kontrollen dienten naive oder mit PBS immunisierte männliche DBA/1J Mäuse.

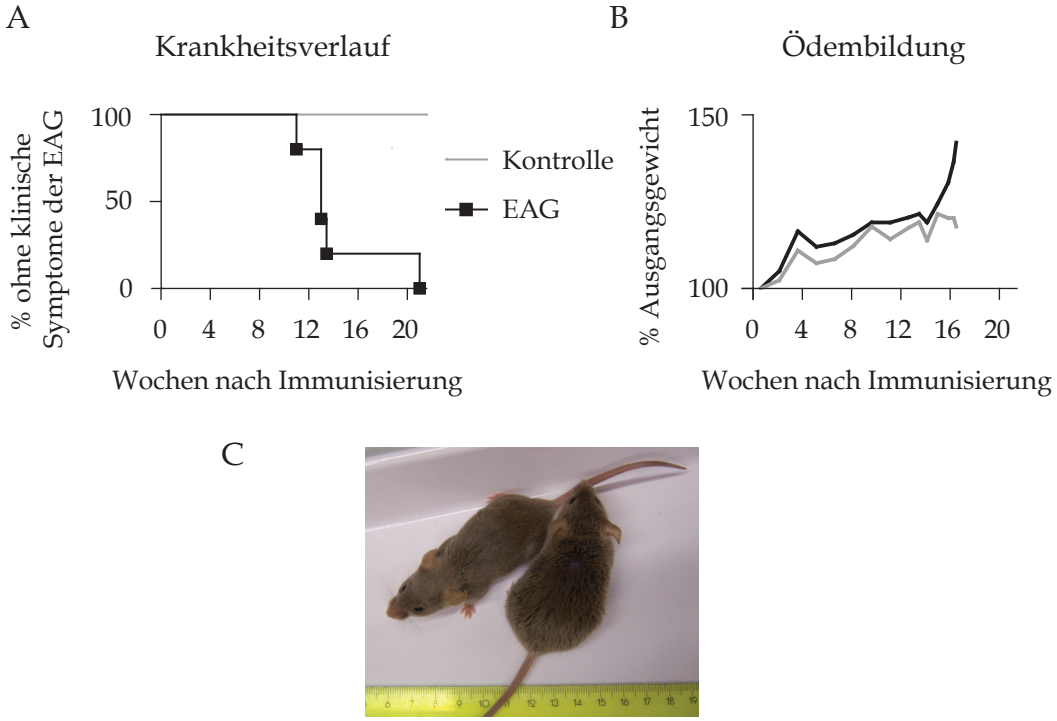

Abbildung 9: Krankheitsverlauf der EAG
(A) Beispielhafte Darstellung des Krankheitsverlaufs in einer EAG-Gruppe von 5 Mäusen im Vergleich zu Kontrollen. (B) Gewichtsverlauf einer immunisierten Maus während des Beobachtungszeitraums im Vergleich zur Kontrolle. (C) EAG-Maus mit struppigem Fell und Flüssigkeitseinlagerung im Bauchraum, im Vergleich dazu eine naive Maus.

4.1.2 Spezifische Autoantikörperbildung in EAG-Mäusen

Ein zentraler Prozess in der Immunantwort ist die Bildung von Antikörpern gegen das Antigen m-α3(IV)NC1. Um den zeitlichen Verlauf zu dokumentieren, wurden den Mäusen in Woche 0, 4 und 8 Blutproben entnommen und das Plasma gewonnen. Das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern wurde im ELISA bei einer Plasmaverdünnung von 1:5000 nachgewiesen. In Woche 4 und 8 waren sehr hohe Konzentrationen vorhanden, in den finalen Blutproben waren diese geringer (Abb.10A). Vorhergehende Untersuchungen hatten gezeigt, dass bereits in Woche 2 spezifische Antikörper im Blut zirkulieren und dass der Verlust im späten Stadium der Krankheit durch die Ausscheidung über den Urin erklärt werden kann (nicht gezeigt).

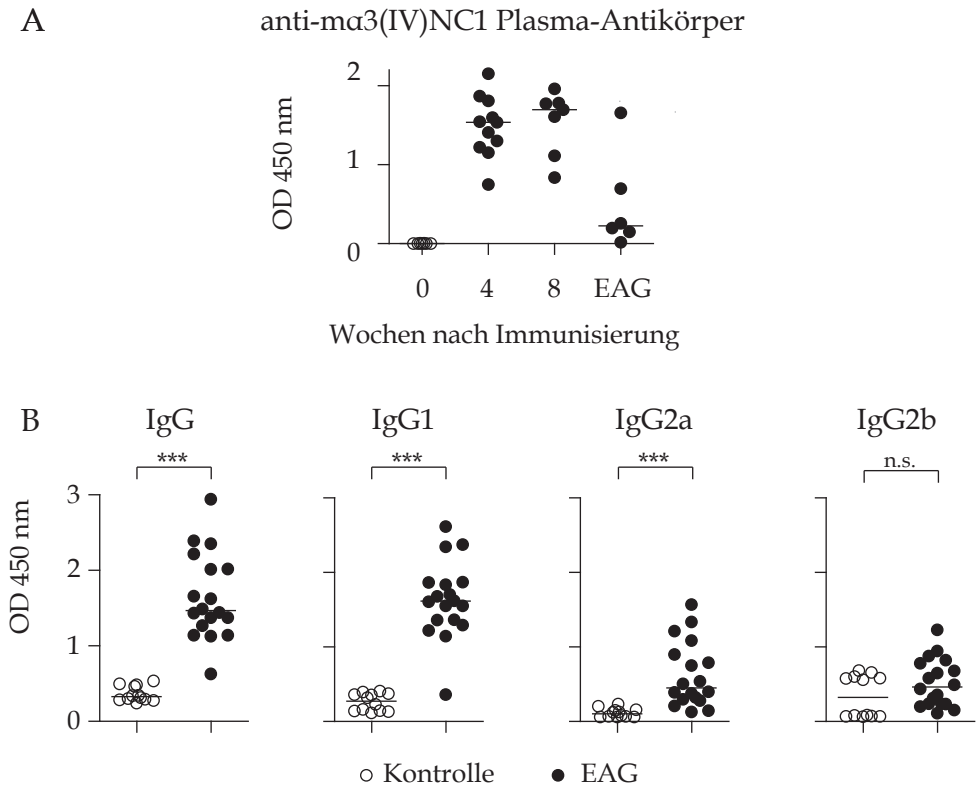

Abbildung 10: Antikörperantwort in EAG-Mäusen
Indirekter ELISA zur Detektion von m-α3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern im Blutplasma (A) zu verschiedenen Zeitpunkten und (B) verschiedener Subklasen zum Endpunkt der EAG. Das Plasma wurde vor der Analyse 1:5000 (A) bzw. 1:500 (B) verdünnt. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. EAG: finale Blutabnahme. ***$p<0{,}0001$.

In einem analogen Experiment (Abb. 10B) wurden die m-α3(IV)NC1 spezifischen Antikörper mittels Subklassen-spezifischen Detektionsantikörpern nachgewiesen (Daten von Dr. Helmut Hopfer). Dabei zeigte sich, dass sowohl der Titer für IgG1 als auch für IgG2a in EAG-Tieren signifikant höher war als in den Kontrollen. Für IgG2b konnte ein nicht signifikanter leichter Anstieg gemessen werden.

4.1.3 Pathologische Veränderungen der EAG-Niere

Die Nierenfunktion wurde über die Ausscheidung von Protein überwacht. Ab Woche 6 konnte in allen immunisierten Mäusen eine Proteinurie mittels Teststreifen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Zur quantitativen Analyse wurde ein Albumin-ELISA durchgeführt, dessen Werte auf den Kreatiningehalt normalisiert wurden (Albumin/Kreatinin Ratio). Über diese Methode konnte die Albuminurie ab Woche 6 bestätigt und ein Anstieg bis zu Höchstwerten über der Detektionsgrenze von 1000 g Albumin je g Kreatinin nachgewiesen werden (Abb. 11A).

Als zweiter Parameter wurde der Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN, *blood urea nitrogen*) zur Beurteilung der Nierenfunktion herangezogen. In gesunden Tieren wird der Harnstoff über den Urin ausgeschieden. Bei einem Nierenversagen steigt daher die Harnstoffkonzentration im Plasma, Werte über > 50 mg/dl weisen auf eine schwere Schädigung hin. In diesem Experiment zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf BUN-Werte von schwer kranken im Vergleich zu gesunden Tieren. nicht signifikant erhöht, jedoch wiesen 38 % aller untersuchten EAG-Tiere einen Wert von > 50 mg/dl auf (Abb. 11B).

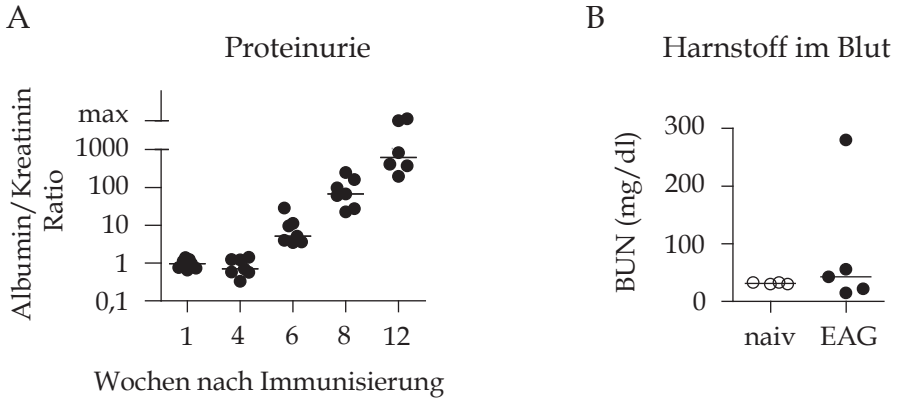

Abbildung 11: Verlust der Nierenfunktion
(A) Albuminausscheidung im Urin zu verschiedenen Zeitpunkten der EAG, dargestellt für ein Einzelexperiment. Die im ELISA bestimmten Werte wurden gegen die im Zentrallabor ermittelten Kreatininwerte normalisiert. (B) Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN, *blood urea nitrogen*) im Blut von schwer kranken Mäusen des gleichen Experiments und Kontroll-Mäusen. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. max: obere Nachweisgrenze des verwendeten Tests. EAG: finale Blutabnahme.

Die histologischen Untersuchungen wurden von meinem Kooperationspartner, Dr. Helmut Hopfer vom Institut für Pathologie am Universitätsspital Basel, an analog durchgeführten Experimenten vorgenommen. Zum besseren Verständnis wurden einige Fotoaufnahmen und Auswertungen dieser Versuche mit in diese Arbeit aufgenommen.

In den Paraffinschnitten der Niere zeigten 70 % aller EAG-Tiere die typische Halbmondbildung durch Zellproliferation und massive Zellinfiltration in der Bowman-

Kapsel, im Median waren 23 % der Glomeruli betroffen (Abb. 12). Der tubulointerstitielle Schaden wurde semi-quantitativ mit 5 Schweregraden beurteilt (0 - 4). Bei 55 % der schwer kranken Mäuse wurde ein Schadenswert von >1,5 festgestellt, der Median betrug 1,8. Die Nieren von Kontroll-Tieren wiesen einen maximalen Schaden von 0,12 auf und zeigten keinerlei Halbmondbildung. In Abbildung 12 sind exemplarisch Fotos von Schnitten eines gesunden Kontroll-Glomerulus (A) und eines schwer geschädigten Glomerulus mit deutlicher Halbmondbildung (B) dargestellt.

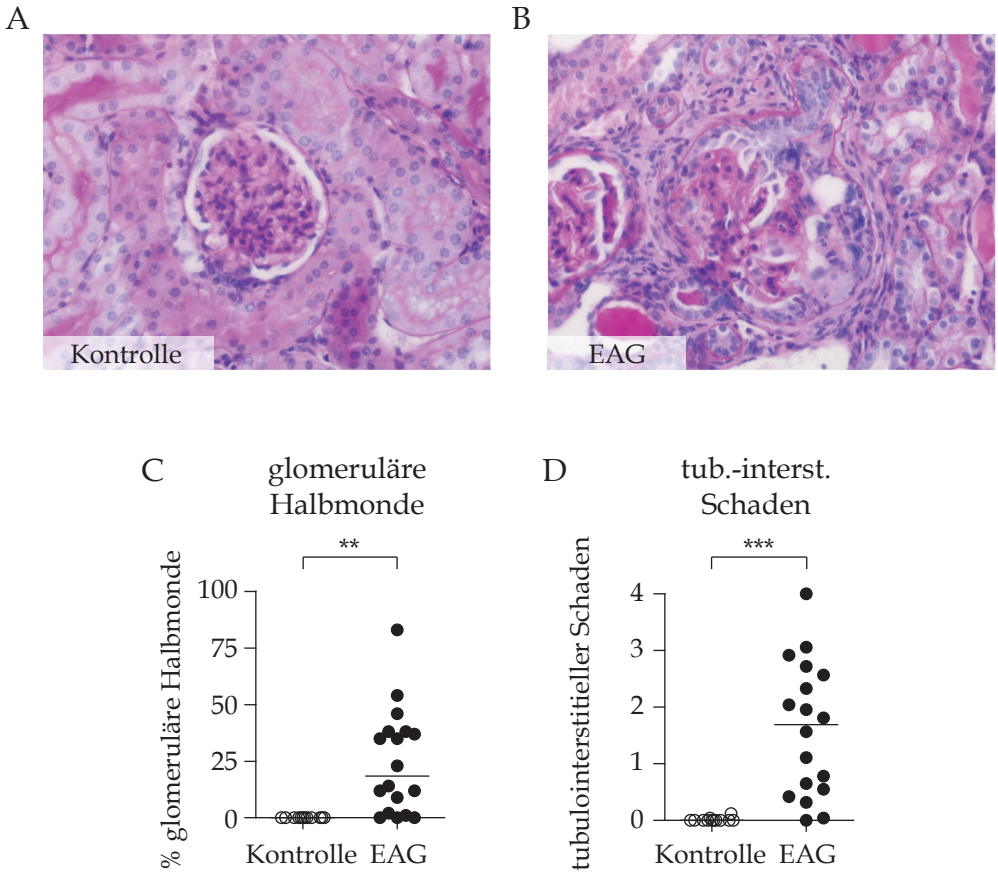

Abbildung 12: Histologische Analyse der Nieren von EAG-Mäusen
(A, B) Exemplarische Fotos von einem gesunden Kontroll-Glomerulum (A) und einem glomerulären Halbmond in den Niere einer EAG-Maus (B), PAS-Färbung von Nierenschnitten in Paraffin. (C) Anteil der Glomeruli mit Halbmondbildung. **$p<0{,}01$ (D) Der tubulointerstielle Schaden wurde semi-quantitativ anhand einer Skala von 0-4 bewertet. ***$p<0{,}0001$. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Kontrolle: mit PBS immunisierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. Fotos und Auswertungen von Dr. H. Hopfer, Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel.

4.1.4 Entzündungsparameter in EAG-Nieren

Das Zytokin Tumornekrosefaktor-α (TNF) wird bei Entzündungen vorwiegend von Makrophagen, aber auch von NK- und T-Zellen ausgeschüttet. Seine vermehrte Expression kann als Maß für die Schwere der Entzündung herangezogen werden.

TNF ist ein direkter Mediator von makrophagenabhängiger Schädigung der Niere [1]. In Abbildung 13 ist die Expressionsanalyse mittels quantitativer Real-time PCR (qRT-PCR) gezeigt. In der Milz war ein tendenzieller Anstieg der *Tnf* mRNA in EAG-Tieren erkennbar, für die Niere konnte eine signifikant erhöhte Expression nachgewiesen werden. Da Gesamt-Gewebe verwendet wurde, ist es mit dieser Analysemethode nicht möglich, die TNF-produzierenden Zellen zu identifizieren.

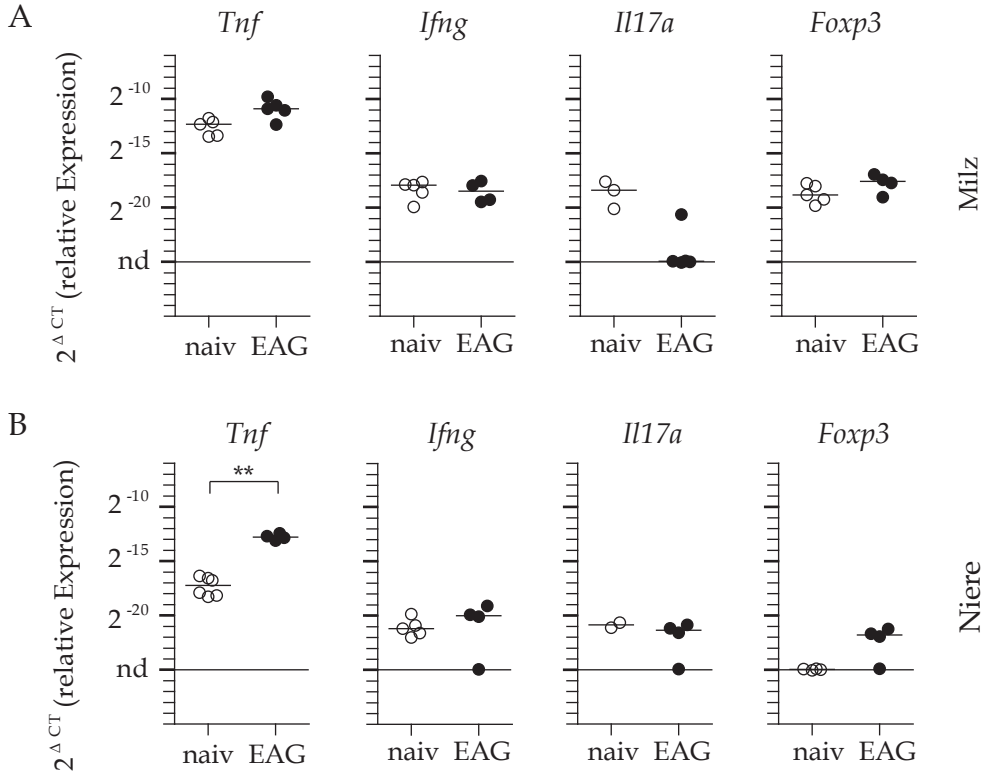

Abbildung 13: qRT-PCR Expressionsanalyse von Entzündungsmarkern
Dargestellt ist die mRNA Expression des Zieltranskripts in Relation zur 500-fach verdünnten 18S rRNA in Gesamtmilz (A) und –niere (B) von schwer kranken EAG-Mäusen. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. nd = unter der Nachweisgrenze. **$p<0{,}01$

Interferon-γ (IFN-γ) ist ein wichtiger Aktivator von Makrophagen und wird von NK- sowie T-Zellen ausgeschüttet. Dieses Zytokin reguliert verschiedene Zellen des Immunsystems und ist essentiell für die Kontrolle von Infektionen [2]. Im NTN-Modell mediiert IFN-γ die Halbmondbildung in den Glomeruli [28]. Mit der hier angewandten Methode konnten keine Unterschiede in der Expression der *Ifng* mRNA in der Milz und nur eine tendenzielle Erhöhung in der erkrankten Niere nachgewiesen werden (Abb. 13).

Interleukin (IL-) 17A kann renale Entzündungen induzieren, indem es neutrophile Granulozyten rekrutiert. Weiterhin unterstützt es die Schädigung der Niere durch Makrophagen [27]. In dem hier gezeigten Versuch war die Konzentration der *Il17a* mRNA in den Milzen erkrankter Tiere unter der Nachweisgrenze. In der Niere war kein Unterschied in der Expression vorhanden.

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 wird in regulatorischen T-Zellen (Treg) exprimiert. Diese können Nierenschäden in anderen Modellen der experimentellen Glomerulonephritis abmildern [47], [49]. Eine Infiltration von Tregs in entzündetem Nierengewebe konnte in Vorarbeiten bereits histochemisch nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auch in der qRT-PCR wurden erhöhte Expressionslevel für *Foxp3* mRNA in der Niere von EAG-Tieren festgestellt.

4.1.5 Spezifische T-Zellantwort in EAG-Mäusen

Das Entzündungsgeschehen in der Niere hängt nicht nur von den Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und Granulozyten, ab. Sowohl in Patienten [7] als auch in Nagetiermodellen ist eine Beteiligung von spezifischen $CD4^+$ T-Zellen an der Entstehung und im Verlauf der Glomerulonephritis nachgewiesen worden [76], [20]. Aus früheren histologischen Untersuchungen ist bekannt, dass im EAG-Modell T-Zellen die Niere infiltrieren. In schwer kranken Tieren konnte eine erhöhte Anzahl an T-Zellen auch in der Durchflusszytometrie-Analyse festgestellt werden. Dabei handelte es sich vornehmlich um hoch aktivierte $CD4^+$ T-Zellen [19]. In meinem Projekt wurde nun eine funktionelle Analyse von T-Zellen zum frühen Zeitpunkt in der Milz und zum späten Zeitpunkt der EAG in Milz und Niere durchgeführt. Dazu wurden Stimulationen mit m-α3(IV)NC1 durchgeführt, die zur Produktion von Zytokinen in spezifischen T-Zellen führten. Die Behandlung mit Brefeldin A blockiert den Golgi-Apparat und führt daher zur Akkumulation der nicht mehr sekretierten Moleküle. Zur Kontrolle erfolgten Stimulationen mit dem Phorbolester Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) in Kombination mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin. PMA aktiviert aufgrund struktureller Ähnlichkeit mit Diacylglycerin die Proteinkinase C [72]. Ionomycin bewirkt einen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+}-Konzentration sowohl durch die Freisetzung von Ca^{2+}aus intrazellulären Speichern als auch durch den Einstrom aus dem Extrazellularraum. Über die Bindung des Calciums an Calcineurin kommt es zur Aktivierung von NFAT (*nuclear factor of activated T cells*). NFAT spielt als Transkriptionsfaktor bei der T-Zellaktivierung eine entscheidende Rolle [66]. PMA und Ionomycin wirken synergistisch bei der Aktivierung von T-Zellen.

4.1.5.1 Frühe m-α3(IV)NC1-spezifische Antwort in der Milz

Mäuse wurden einmalig mit m-α3(IV)NC1 in KFA immunisiert, die Milzen 10 Tage später entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Eine Kontroll-Gruppe wurde mit PBS in KFA behandelt. Die Stimulation erfolgte für 8 Stunden in RPMI komplett Medium, spezifisch mit 54 µg/ml m-α3(IV)NC1 bzw. unspezifisch mit 50 ng/ml Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) und 1 µM Ionomycin. Als Kontrollen wurden Zellen ohne Stimulation kultiviert. Nach 4 Stunden wurden 10 µg/ml Brefeldin A zugesetzt. Anschließend wurden die $CD4^+$ T-Zellen auf Aktivierung und Zytokinproduktion hin untersucht. Zur Identifizierung von reaktiven T-Zellen wurde die Expression von CD154 verwendet. CD154 (oder auch CD40L) wird kurz nach T-Zellrezeptorstimulation von $CD4^+$ T-Zellen exprimiert. Dieses Molekül sendet B-Zellen und Makrophagen durch die Bindung an CD40 Aktivierungssignale. In dem

hier gezeigten Ansatz erlaubt der Nachweis der CD154-Expression eine Unterscheidung der spezifisch über den T-Zellrezeptor aktivierten T-Zellen von den unspezifisch aktivierten Zellen (s. auch [15]). Durch intrazelluläre Färbung wurde im FACS die Produktion von TNF, IFN-γ und IL-17A nachgewiesen.

In Abbildung 14 ist ein Beispiel für die grafische Darstellung einer solchen Messung gezeigt. Über die Größe und Granularität sowie die Autofluoreszenz wurden zunächst lebende Einzelzellen bestimmt und über die CD45-Expression die Leukozyten eingegrenzt. Aus dieser Population wurden die T-Helferzellen anhand ihrer CD4-Expression bestimmt und diese gemäß der Expression des Aktivierungsmarkers CD154 und der Zytokine dargestellt (vgl. Abbildung 5). Als Kontrolle für die Spezifität der Färbungen dienten die $CD4^-$ Leukozyten. Für eine bessere Anschaulichkeit sind die Daten von 5 bis 6 einzelnen Messungen zusammengefasst worden. In den anschließenden Abbildungen wird die graphische Auswertung solcher Analysen für die $CD4^+$ T-Zellen als Differenz (Δ) von stimulierten zu unstimulierten Proben gezeigt.

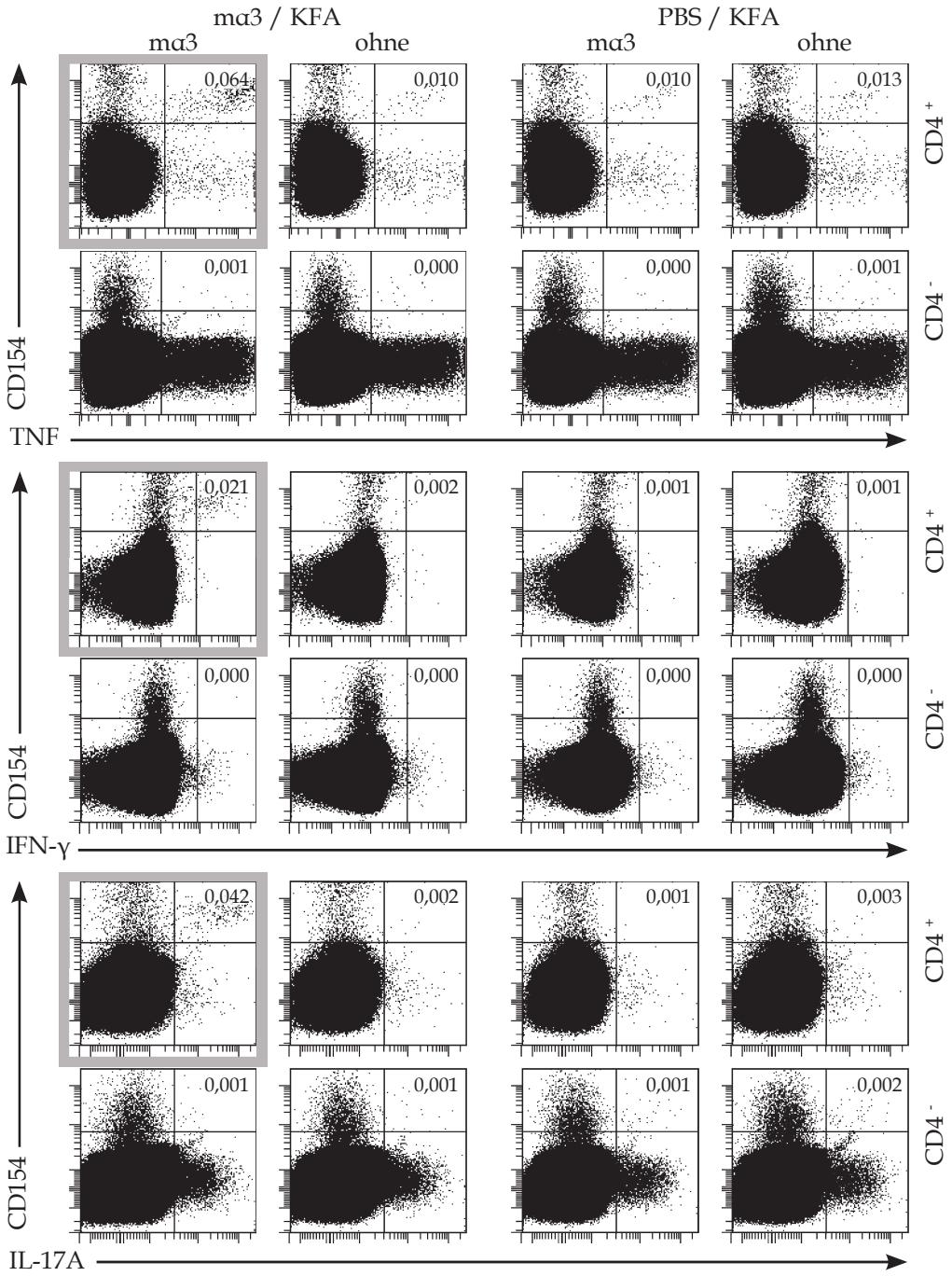

Abbildung 14: Zytokinproduktion von spezifisch stimulierten Milzzellen aus EAG-Tieren

An Tag 10 nach Immunisierung mit m-α3(IV)NC1 in KFA wurden Milzzellen für 8 Stunden spezifisch stimuliert und die Produktion von TNF, INF-γ und IL-17A durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden $CD4^{+}$ T-Zellen eingegrenzt und gemäß der Expression des Aktivierungsmarkers CD154 und der Zytokine dargestellt. Als Kontrolle für die Spezifität sind weiterhin die $CD4^{-}$ T-Zellen gezeigt. Jedes Diagramm repräsentiert die Daten von 5 bis 6 Einzelmessungen. Die Zahlen geben den durchschnittlichen Wert der zytokinproduzierenden Zellen an.

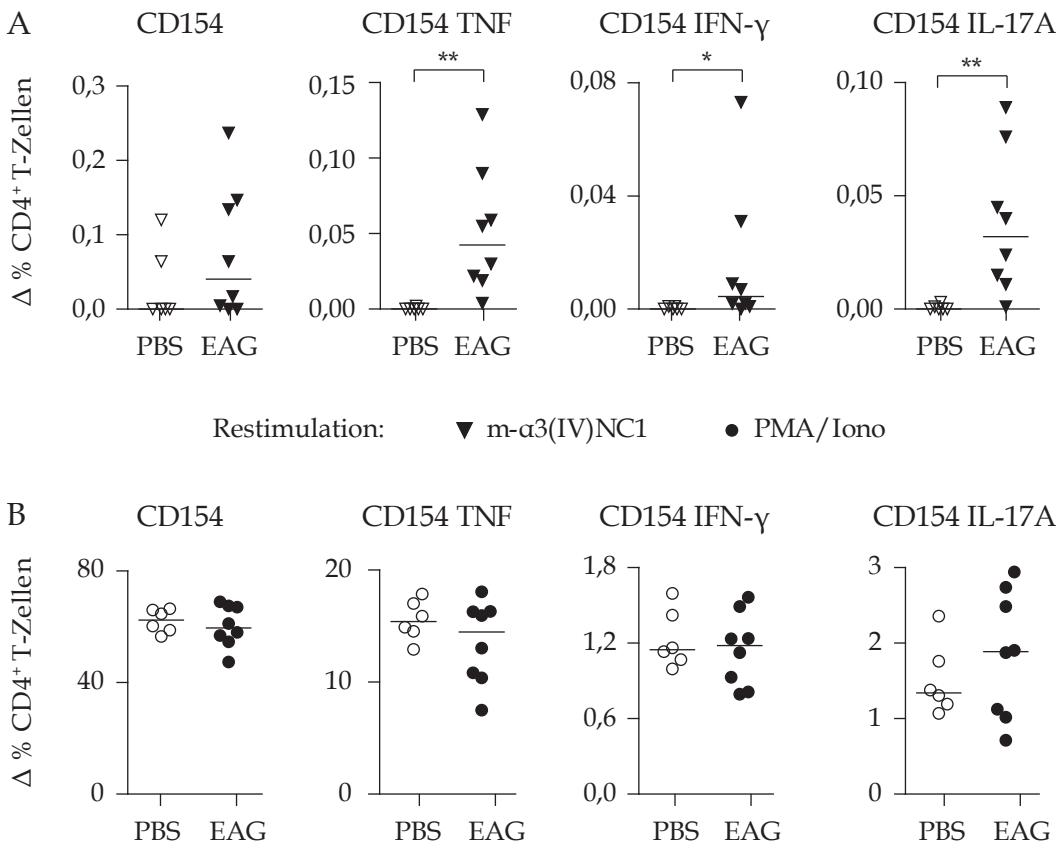

Abbildung 15: FACS-Analyse der Zytokinproduktion in Milzzellen von EAG-Mäusen

Grafische Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse der Zytokinproduktion in Milzzellen. Die Mäuse wurden mit m-α3(IV)NC1 oder PBS in KFA immunisiert. 10 Tage später wurde eine Einzelzellsuspension aus der Milz hergestellt. Die Zellen wurden für 8 Stunden mit 54 µg/ml m-α3(IV)NC1 oder mit PMA/Iono stimuliert und anschließend CD154 sowie die Zytokine angefärbt. Gezeigt ist die Differenz (Δ) von stimulierten zu unstimulierten Proben. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. $^{**}p < 0{,}005$, $^{*}p < 0{,}05$

In der Milz von immunisierten Tieren konnten nach spezifischer Stimulation mit m-α3(IV)NC1 aktivierte T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 15). Im Median betrug der Anteil der $CD154^+$Zellen 0,04 % aller $CD4^+$ T-Zellen. Die PBS-Kontrollen zeigten nur geringe CD154-Expression. In aktivierten Zellen konnten Zytokine angefärbt werden. Der Anteil an TNF^+Zellen betrug im Median 0,04 % der $CD4^+$T-Zellen. IFN-γ konnte in 0,01 % und IL-17A in 0,03 % der $CD4^+$T-Zellen angefärbt werden. Diese Unterschiede waren signifikant gegenüber den PBS-Kontrollen. Die unspezifische Stimulation mit PMA/Iono zeigte, dass der Anteil der zur Zytokinproduktion fähigen Zellen in beiden Gruppen gleich war.

4.1.5.2 Funktionale Analyse von spezifischen T-Zellen in der Spätphase der EAG

Da in der Anfangsphase nach der ersten Immunisierung spezifische T-Zellen in der FACS-Analyse nachgewiesen werden konnten, wurden im nächsten Experiment T-Zellen aus Milzen und Nieren schwer kranker EAG-Mäuse analysiert.

Dazu wurde aus je einer Niere pro Maus eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die T-Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert und für 8 Stunden mit m-α3(IV)NC1 stimuliert. Parallel dazu wurden ca. 500.000 Zellen aus Milzen naiver Mäuse mit CFSE angefärbt und als Antigen-präsentierende Zellen den Nierenzellen zugesetzt. Die Färbung ermöglichte den Ausschluss aus der Analyse. Die Milzzellen der kranken Mäuse wurden analog zu 4.1.5.1 behandelt.

Zu diesem späten Zeitpunkt waren in den Milzen kaum reaktive Zellen nachzuweisen (Abb. 16). Nur ca. 0,02 % der $CD4^+$ T-Zellen zeigten eine Aktivierung nach spezifischer Stimulation. Der größte Anteil (ca. 0,014 %) produzierte TNF, nur in einer Maus konnten IFN-γ^+ und IL-17A^+ Zellen nachgewiesen werden (Abb. 16). Die Werte bewegten sich nah an der Nachweisgrenze und aufgrund der geringen Gruppengröße ließen sich keinen statistisch signifikanten Unterschiede erkennen.

In den Nieren der EAG-Tiere hingegen konnten aktivierte zytokinproduzierende T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 17). Von den $CD4^+$ T-Zellen wurden ca. 0,15 % spezifisch aktiviert. Im Median produzierten 0,045 % der T-Helferzellen TNF, 0,02 % IFN-γ und 0,05 % IL-17A. Unter polyklonaler Stimulation waren 17 % der $CD4^+$ Zellen aktiviert. Eine Zytokin-Produktion wurde in 4,1 % der Zellen für TNF, in 1,45 % für IFN-γ und in 5,3 % für IL-17A festgestellt. Diese Daten sind aufgrund der geringen Gruppenstärke nicht signifikant gegenüber den Daten aus den naiven Kontrollen.

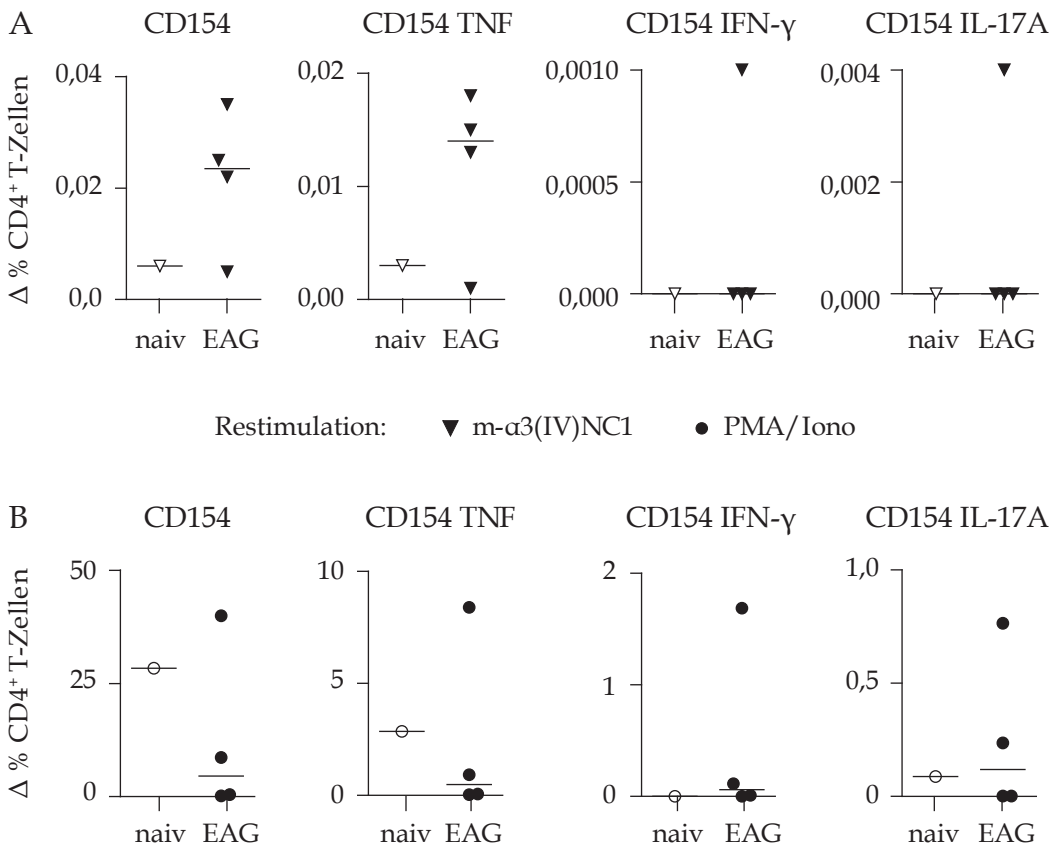

Abbildung 16: FACS-Analyse der spezifischen Zytokinproduktion in Milzzellen von schwer kranken EAG-Mäusen

Grafische Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse der Zytokinproduktion in Milzzellen. Die Mäuse wurden gemäß Immunisierungsprotokoll 4-mal mit m-α3(IV)NC1 immunisiert und schwer kranke Mäuse analysiert. Aus der perfundierten Milz wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden für 8 Stunden mit 54 µg/ml m-α3(IV)NC1 oder PMA/Iono stimuliert und anschließend CD154 sowie die Zytokine angefärbt. Gezeigt ist die Differenz (Δ) von stimulierten zu unstimulierten Proben. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

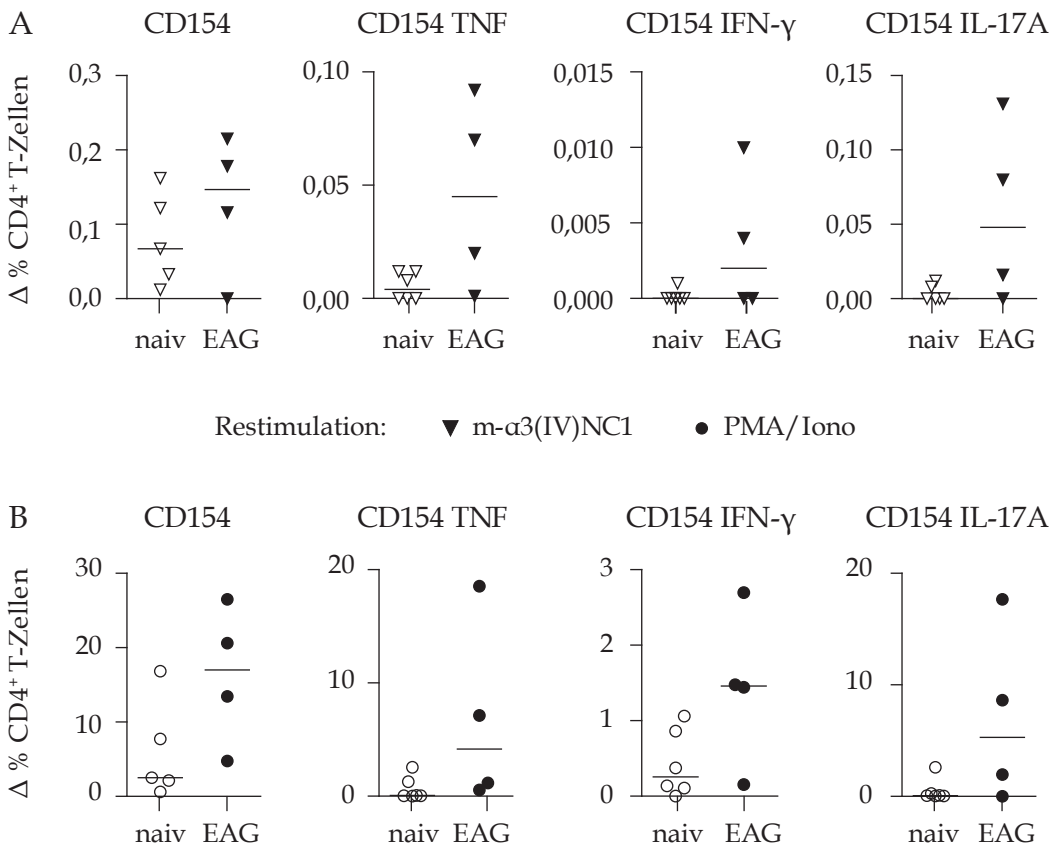

Abbildung 17: FACS-Analyse der spezifischen Zytokinproduktion in Nierenzellen von schwer kranken EAG-Mäusen

Grafische Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse der Zytokinproduktion in Nierenzellen. Die Mäuse wurden gemäß Immunisierungsprotokoll 4-mal mit m-α3(IV)NC1 immunisiert und schwer kranke Mäuse analysiert. Aus der perfundierten Niere wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und die T-Zellen angereichert. Die Zellen wurden für 8 Stunden mit 54 µg/ml m-α3(IV)NC1 oder mit PMA/Iono stimuliert und anschließend CD154 sowie die Zytokine angefärbt. Gezeigt ist die Differenz (Δ) von stimulierten zu unstimulierten Proben. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an.

Insgesamt zeigen die bis hierhin dargestellten Ergebnisse, dass die Induktion der EAG mit dem homologen Antigen m-α3(IV)NC1 möglich war. Die analysierten Parameter stimmten in allen wesentlichen Punkten mit der durch h-α3(IV)NC1 induzierten Krankheit überein [20]. Der zeitliche Verlauf der EAG unter Verwendung des Maus-Antigens war um ca. 2 Wochen verzögert. Die Nierenschädigung und die damit verbundene Proteinurie und Ödembildung erfolgten analog. Antikörper gegen das Antigen wurden gebildet und in der quantitativen Realtime-PCR konnten erhöhte Werte für den Entzündungsmarker TNF und den in Tregs exprimierten Transkriptionsfaktor Foxp3 festgestellt werden. Es gelang mittels Durchflusszytometrie, eine m-α3(IV)NC1-spezifische T-Zellantwort in der Milz im frühen Stadium, in der Niere im späten Stadium der Krankheit nachzuweisen. Da IFN-γ und IL-17A als die Leitzytokine für Th1- bzw. Th17-Zellen gelten, zeigen meine Ergebnisse eine Akkumulation von autoreaktiven Th1- und Th17-Zellen in den Nieren von schwer kranken EAG-Mäusen.

4.2 Einfluss von verschiedenen T-Zellsubpopulationen auf die EAG

Im ersten Teil der Arbeit wurde das Maus-Modell der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis mit dem homologen Antigen m-α3(IV)NC1 vorgestellt. Die Tiere entwickelten alle Anzeichen einer anti-GBM-Nephritis und wurden im Endstadium der Krankheit getötet. Die durchflusszytometrische Untersuchung zeigte antigenspezifische $CD4^+$ T-Zellen in der Niere, die unter Stimulation TNF, IFN-γ und IL-17A produzierten. Im zweiten Teil erfolgte nun die Analyse der Funktion dieser Zellen für die Entstehung und die Ausprägung der EAG. Dazu wurden *knockout*- (KO-) Mäuse verwendet, in denen die zuvor nachgewiesenen Zytokine nicht produziert oder nicht gebunden werden können.

4.2.1 Induktion der EAG in IFNgR-, IL-17A- und IL-23p19-KO DBA/1J Mäusen

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Schädigung renaler Strukturen spielen [19]. Th1-Zellen stimulieren über die Produktion von IFN-γ deren Aktivierung. In den Nieren schwer kranker EAG-Mäuse wurden antigenspezifische Th1-Zellen nachgewiesen (s. Abschnitt 4.1.5.2). Daher sollte die Rolle von IFN-γ für die EAG analysiert werden. In dieser Arbeit wurden Mäuse eingesetzt, die keinen funktionalen Rezeptor für IFN-γ besitzen.

Die Rolle der ebenfalls im ersten Teil der Arbeit nachgewiesenen Th17-Zellen in der EAG sollte durch die Verwendung von IL-17A- und IL-23p19-*knockout*-Mäusen untersucht werden. IL-23 besteht aus den Untereinheiten p40 und p19. Während p40 auch Bestandteil von IL-12 ist, kommt p19 ausschließlich in IL-23 vor. IL-23 wird vorwiegend von Dendritischen Zellen ausgeschüttet und forciert die Differenzierung und Aktivierung von Th17 Zellen. Diese wiederum schütten das proinflammatorische Zytokin IL-17A aus, welches lokal die Produktion von Chemokinen für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten induziert. Experimente in ähnlichen Modellen zeigten, dass das Fehlen einer dieser beiden Zytokine vor Entzündung und Nierenschädigung schützt [45].

Für die hier gezeigten Experimente wurden Mäuse auf dem DBA/1J Hintergrund verwendet, da nur dieser die effiziente Induktion der EAG zulässt. Die Nomenklatur der Mäuse ergab sich damit wie folgt:

DBA/1J	Wildtyp (WT)
DB1-IFNgRKO	defizient im IFN-γ-Rezeptor
DB1-IL17AKO	defizient in IL-17A
DB1-IL23p19KO	defizient in der Untereinheit p19 von IL-23

Für die folgenden EAG-Experimente wurde die von meiner Arbeitsgruppe bereits publizierte Induktion mit h-α3(IV)NC1 gewählt [20]. Die Mäuse wurden 4-mal mit je 30 µg des Antigens immunisiert, initial einmal mit KFA, danach mit IFA (Abb.18). Als Kontrollen wurden naive Mäuse verwendet. Die Überwachung der Tiere erfolgte

gemäß des Protokolls, das bereits für die EAG mit dem homologen Antigen angewandt wurde (Abschnitt 4.1.1).

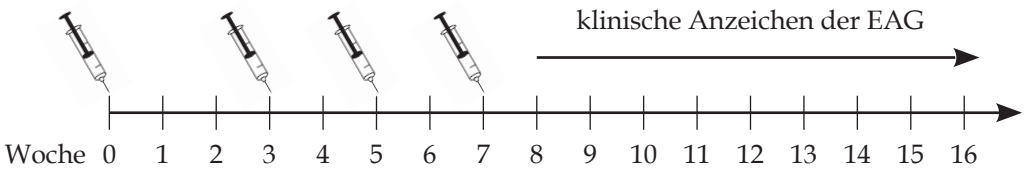

Abbildung 18: Immunisierungsschema
Männliche DBA/1J WT- und KO-Mäuse wurden mit 30 µg rekombinant hergestelltem h-α3(IV)NC1 in komplettem Freundschen Adjuvans subkutan immunisiert. 3 Nachimmunisierungen mit 30 µg Antigen in inkomplettem Freundschen Adjuvans erfolgten in den Wochen 3, 5 und 7. Zur Kontrolle des Krankheitsverlaufs wurden in verschiedenen Abständen Blut- und Urinproben gewonnen sowie das Gewicht der Mäuse bestimmt. Tiere wurden getötet, wenn sie schwere Anzeichen der EAG aufwiesen. Für die Analyse wurden Blut, Milz und Niere verwendet. Als Kontrollen dienten naive Männchen der gleichen Mauslinien.

Die folgenden Abbildungen zeigen für die Kinetiken die Ergebnisse eines einzelnen repräsentativen Experiments mit allen 4 Gruppen mit 5 bzw. 6 Mäusen pro Gruppe. Für die Endpunktanalysen (BUN, Histologie, Immunhistochemie, qRT-PCR) sind die Daten aus mehreren Experimenten zusammengefasst, um alle analysierten Tiere zu berücksichtigen.

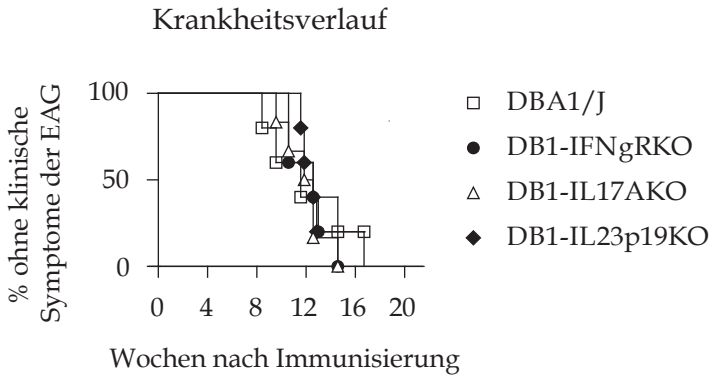

Abbildung 19: Krankheitsverlauf der EAG in *knockout*-Mäusen
Dargestellt ist der Krankheitsverlauf in einem EAG-Versuch mit DBA/1J-, DB1-IFNgRKO-, DB1-IL17AKO- und DB1-IL23p19KO-Mäusen. Zwischen den Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Eintrittszeitpunkts in die schwere Phase der Erkrankung.

In Abbildung 19 sind die Überlebenskurven für die KO- und die Wildtyp- (WT) Mäuse für ein repräsentatives Experiment gezeigt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich des Krankheitsbeginns und die ersten Mäuse jeder Gruppe wurden im erwarteten Bereich von 8 bis 11 Wochen

krank. Die Mäuse in allen Experimenten zeigten innerhalb weniger Tage eine starke Gewichtszunahme durch Flüssigkeitseinlagerung. Der Zeitpunkt und das Ausmaß der Gewichtszunahme schwankten zwischen den einzelnen Tieren innerhalb einer Gruppe, es zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (nicht gezeigt).

4.2.2 Spezifische Autoantikörper in allen KO-Mäusen

Aus Vorversuchen ist bekannt, dass bereits in Woche 2 nach der Immunisierung große Mengen von h-α3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern gebildet werden. In diesem Versuch wurden Plasmaproben von Woche 1, 4 und 10 sowie vom Endzeitpunkt der EAG auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen h-α3(IV)NC1 getestet (Abb. 20). In Woche 1 waren bereits in den Proben aller Gruppen vergleichbar hohe Antikörperkonzentrationen nachweisbar. Nach 4 Wochen, bei Erreichen des maximalen Titers, zeigten die DB1-IFNgRKO-Tiere höhere, die DB1-IL23p19KO-Tiere niedrigere Werte als die WT-Tiere. Die IL23-defizienten Mäuse wiesen nach 10 Wochen den niedrigsten Titer auf, während der Titer bei den DBA/1J Proben weniger stark abnahm.

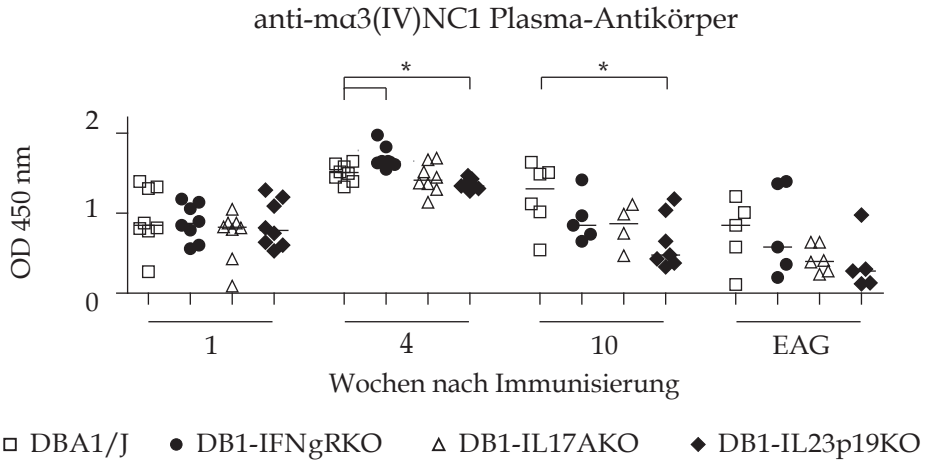

Abbildung 20: Antikörperantwort in KO-Mäusen
Indirekter ELISA zur Detektion von h-α3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern im Blutplasma zu verschiedenen Zeitpunkten der EAG. Das Plasma wurde vor der Analyse 1:5000 verdünnt. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. Die OD-Werte für naive Mäuse lagen unter 0,2. EAG: finale Blutabnahme. *$p<0,05$.

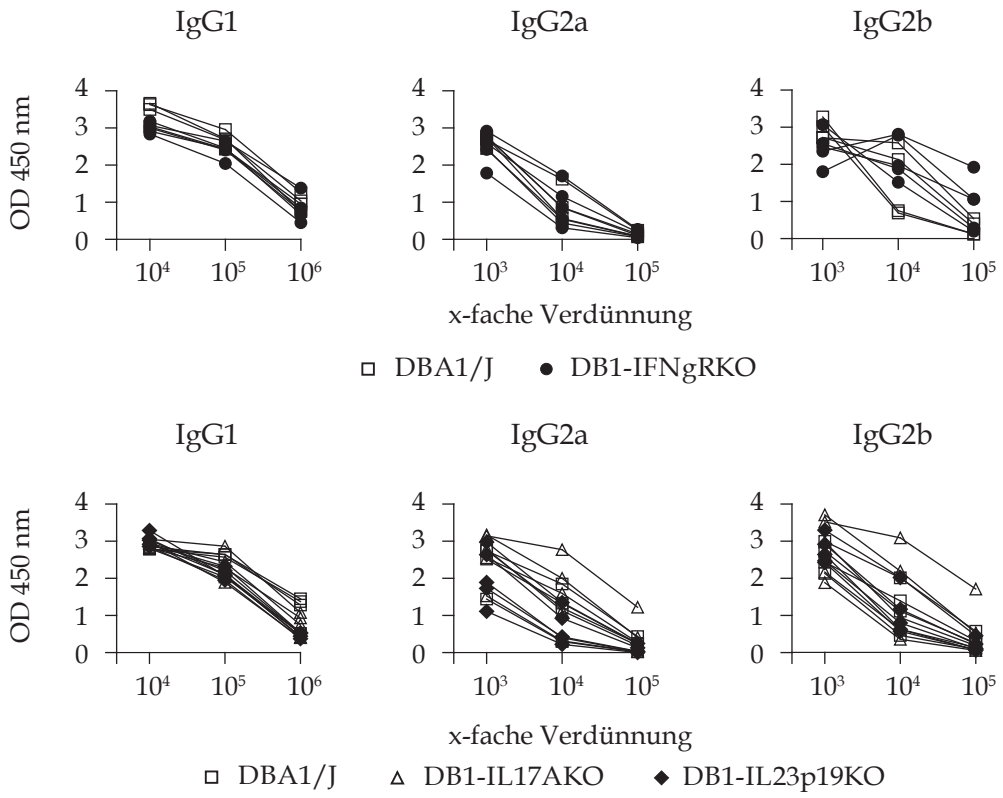

Abbildung 21: Vergleich der Antikörpersubklassen in KO-Mäusen
Indirekter ELISA zur Detektion von h-α3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern verschiedener Subklassen in Woche 4 nach Immunisierung. Pro Gruppe wurden 5 bzw. 6 Proben analysiert.

Für die Plasmaproben der Woche 4 wurde weiterhin geprüft, ob sich die Zusammensetzung der spezifischen Antikörper hinsichtlich der IgG-Subtypen unterscheidet. Eine Titration um je 2 Log-Stufen ergab vergleichbare Werte für alle Maus-Gruppen.

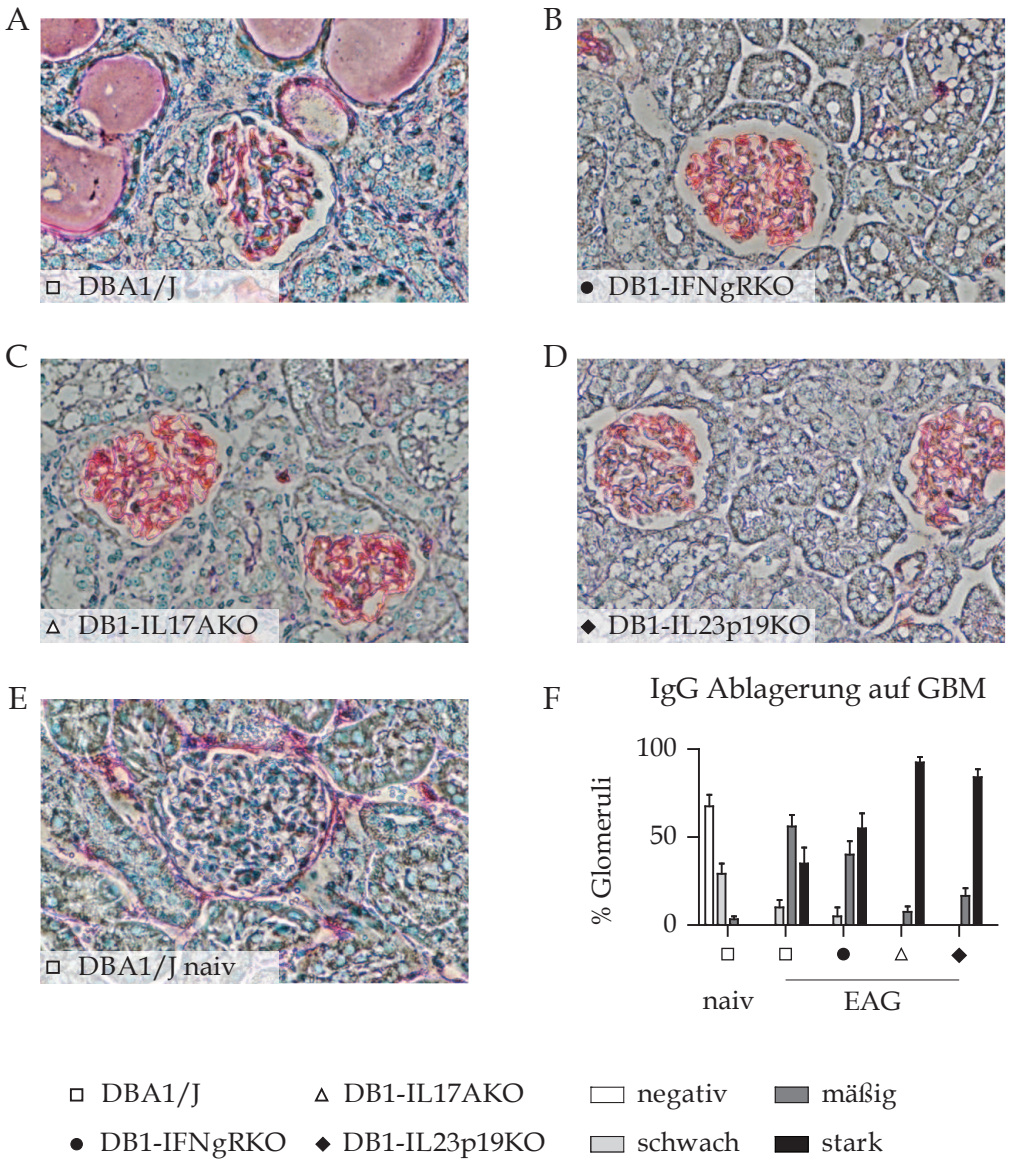

Abbildung 22: IgG-Ablagerungen auf KO-Nierenschnitten
(A) bis (D) Exemplarische Fotos von IgG-Ablagerungen in den Nieren von EAG-Mäusen. (E) Naive Kontrolle. (Färbung von Nierenschnitten in Paraffin). (F) Semi-quantitative Bewertung der IgG-Ablagerung auf der glomerulären Basalmembran. Es wurden 20 Glomeruli von 6 Nierenschnitten unterschiedlicher Mäuse pro Gruppe analysiert.

Das erste histologisch nachweisbare Ereignis, das zur Schädigung der Niere führt, ist die Ablagerung von Antikörpern entlang der Basalmembran. Die Intensität einer immunhistochemischen Färbung von IgG in Paraffinschnitten der EAG-Nieren wurde semi-quantitativ mit einem von 4 Schweregraden (negativ bis stark) beurteilt und je 20 Glomeruli in 6 Nierenschnitten pro Gruppe ausgewertet. Die Anfärbungen zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Intensität. In Abbildung 22 sind beispielhaft Fotos der Anfärbungen gezeigt und die Auswertung dargestellt. Das Fehlen von IL-17A, IL-23p19 beziehungsweise des Rezeptors für IFN-γ beeinflusst in diesem Modell also die humorale Antwort auf das Antigen kaum.

4.2.3 Verringerte nephropathologische Veränderungen in KO- Mäusen

In der Analyse des ersten Nierenfunktionsparameters, der Albuminurie, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 23 A). Die Mäuse aller immunisierten Gruppen entwickelten analog zu den vorherigen Experimenten mit WT-Tieren ab Woche 7 eine pathologische Proteinurie.

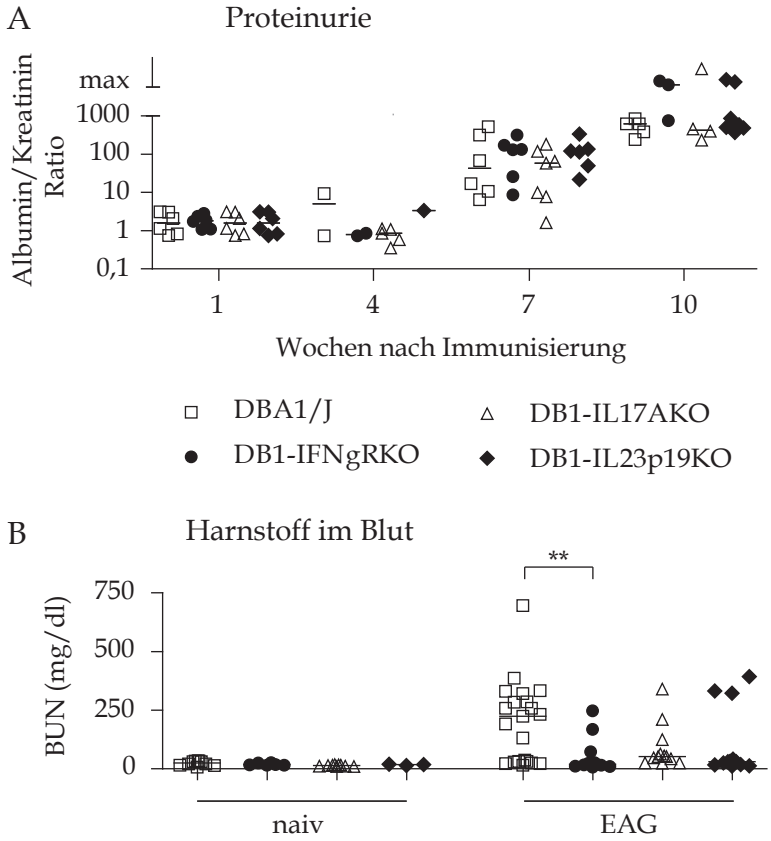

Abbildung 23: Verlust der Nierenfunktion in KO-Mäusen
(A) Albuminausscheidung im Urin zu verschiedenen Zeitpunkten der EAG, dargestellt für ein Einzelexperiment. Die im ELISA bestimmten Werte wurden gegen die im Zentrallabor ermittelten Kreatininwerte normalisiert. (B) Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN) im Blut von naiven und schwer kranken Mäusen zum Endzeitpunkt der EAG aus mehreren Experimenten. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. **$p<0{,}005$.

Erste Hinweise auf ein unterschiedliches Krankheitsbild mit mehr oder weniger stark ausgeprägter Nephritis ergaben sich aus der Harnstoffmessung im Plasma. Im Vergleich zu den naiven Tieren zeigte sich ein signifikanter Anstieg der BUN-Werte nur für die im Endstadium der EAG befindlichen WT-Tiere und die DB1-IL17AKO-Tiere. In den 3 KO-Gruppen wiesen jeweils nur ca. 25 % der kranken Tiere erhöhte Werte über 50 mg/dl auf. In der Wildtyp-Gruppe lagen erhöhte Werte bei 62 % der Tiere vor, die Mehrzahl davon überstieg einen Wert von 200 mg/dl (Abb. 23 B). Insgesamt zeigten die transgenen Gruppen also teilweise deutlich geringere Werte und daher eine weniger stark ausgeprägte Nephritis.

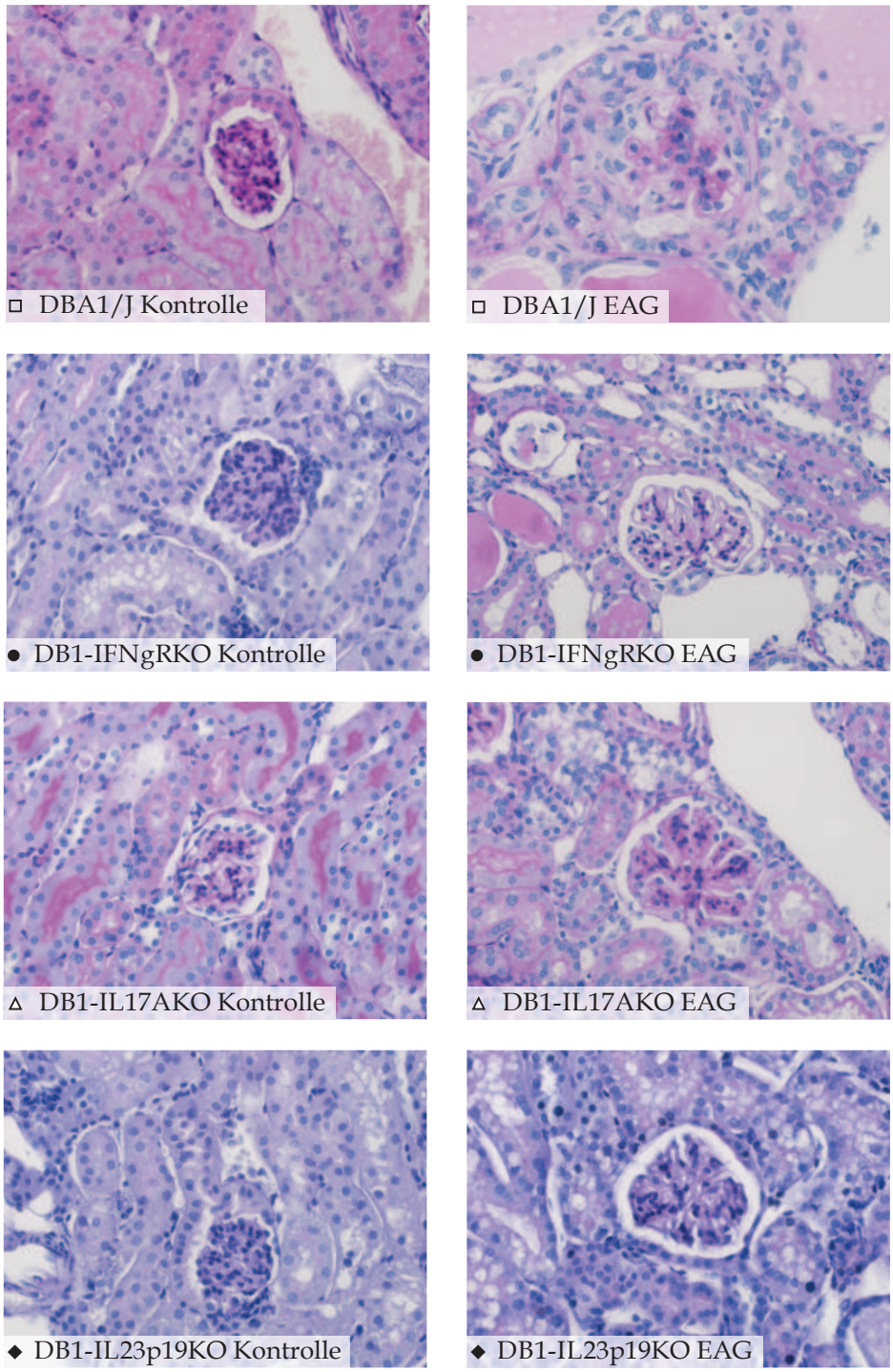

Abbildung 24: Nierenschnitte von KO-Mäusen
Nierenschnitte von Kontroll-Mäusen (links) und Tieren im Endstadium der EAG (rechts), PAS-Färbung. Deutlich zu erkennen ist die halbmondförmige extrakappiläre Proliferation in der DBA/1J Maus mit EAG. Im Foto der DB1-IFNgRKO-Maus mit EAG ist die Ablagerung von proteinhaltigem Material (rosa) in den Tubuli gut sichtbar. Fotos von Dr. H. Hopfer, Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel.

Alle Tiere, sowohl die WT- als auch die *knockout*-Mäuse, entwickelten im Laufe des Experiments eine membranöse Glomerulonephritis. Sie unterschieden sich jedoch in der Ausprägung des glomerulären und des interstitiellen Schadens. In der histologischen Untersuchung der Nierenschnitte zeigten die schwer kranken WT-Tiere eine starke Halbmondbildung, 80 % der Proben waren betroffen. Alle 3 KO-Gruppen dagegen wiesen nur wenige Halbmonde auf. Im Median betrugen die Werte für die WT-Proben 39 %, für die DB1-IFNgRKO-Proben 1 %, für die DB1-IL17A-Proben 7 % und für die DB1-IL23p19KO-Proben 4 %. Der Unterschied zu den naiven Proben war für die WT-, DB1-IL17AKO- und DB1-IL23p19KO-Tiere signifikant, die Werte für die DB1-IFNgRKO-Tiere hoben sich nicht von den Kontrollen ab. Die Auszählung von glomerulären Nekrosen und Sklerosen lieferte hierzu ähnliche Werte (nicht gezeigt).

Der tubulointerstitielle Schaden wurde semi-quantitativ mit 5 Schweregraden beurteilt (0 - 4). Die in den naiven DBA/1J- und DB1-IL17AKO-Mäusen festgestellten Werte von unter 1,5 wurden als nicht erhöht eingestuft und spielten bei der Bewertung des Krankheitsbildes keine Rolle. In allen Gruppen ergab sich ein hoch signifikanter Unterschied der Schadenswerte zwischen den schwer kranken und den gesunden Mäusen. Im Median betrug der Schadenswert in den kranken WT-Tieren 3,75; in den DB1-IFNgRKO-Proben 1,55; in den DB1-IL17A-Proben 1,8 und in den DB1-IL23p19KO-Proben 2,0. In der Summe ergaben sich für die WT-Proben bei den meisten Tieren schwere bis sehr schwere Schäden, während die DB1-IFNgRKO generell meist geringe Schäden zeigten. Die beiden anderen Gruppen wiesen vorwiegend mäßige Schädigungen auf.

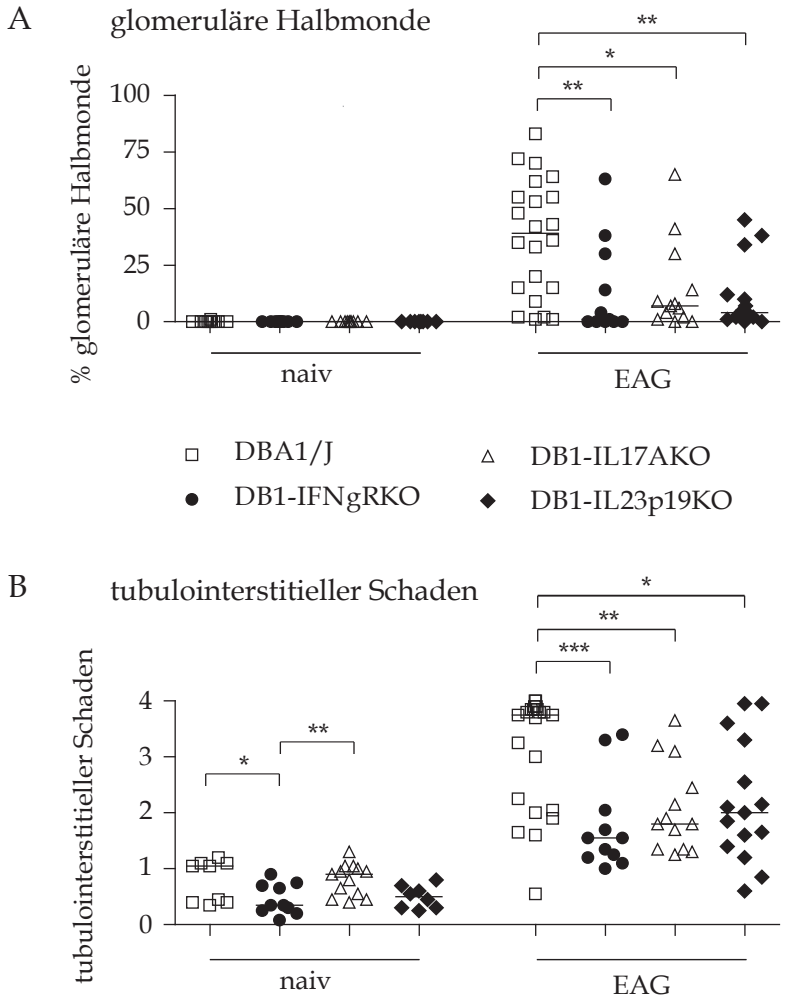

Abbildung 25: Histologische Analyse der Nieren von KO-Mäusen
(A) Anteil der Glomeruli mit Halbmondbildung in den Nieren von verschiedenen schwer an EAG erkrankten *knockout*-Mäusen im Vergleich zu naiven Mäuse der gleichen Linien. (B) Der tubulointerstielle Schaden wurde semi-quantitativ anhand einer Skala von 0-4 bewertet. ***$p<0{,}001$, **$p<0{,}01$, *$p<0{,}05$. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. Evaluation der Histologie von Dr. H. Hopfer, Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel.

Eine Betrachtung der Harnstoffwerte in Relation zu den Halbmond- bzw. Schadenswerten ergab eine signifikante Abhängigkeit der beiden Werte für jede Gruppe. Die linearen Regressionen für diese Daten sind in Abb. 26 und Abb. 27 gezeigt. Die Abhängigkeit der BUN-Werte von der Halbmondbildung war in den 3 transgenen Mausgruppen besonders stark ausgeprägt, mit einem Bestimmtheitsmaß (r^2) von jeweils über 0,9. Dies bestätigt, dass sich hohe Harnstoffwerte auf einen hohen Anteil nicht funktionsfähiger Glomeruli zurückführen lassen. Es ergab sich ebenfalls ein Zusammenhang von starkem Schaden zu erhöhtem Blutharnstoff, der jedoch mit r^2-Werten von 0,5682 bis 0,6724 nicht so deutlich ausfiel.

Das Fehlen von Il-17A und IL-23p19 führte also zu geringeren Blutharnstoff-Werten, weniger Halbmondbildung und milderer Schädigung des Interstitiums in den schwer

kranken Tieren. In den DB1-IFNgRKO-Mäusen war diese geringe Ausprägung der Nierenpathologie noch auffälliger, die Tiere zeigten nur bezüglich des tubulointerstitiellen Schadens signifikante Unterschiede zu den nicht immunisierten. Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle der Th17- und vor allem der Th1-Zellen bei der Entstehung und Ausprägung der EAG hin.

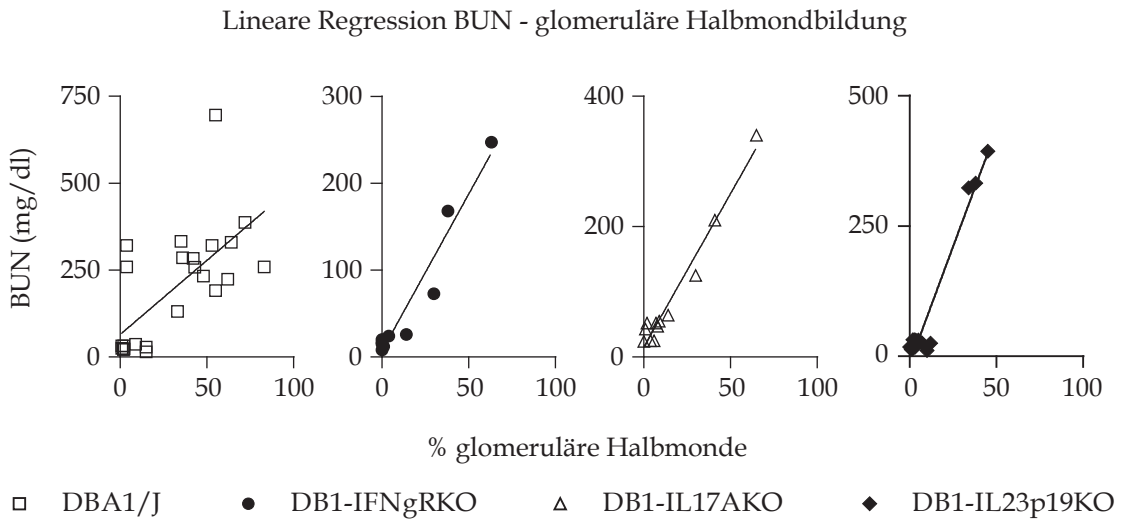

Abbildung 26: Lineare Regressionsanalyse des Blutharnstoffs gegen die glomeruläre Halbmondbildung

Lineare Regression der Blutharnstoffwerte gegen den Anteil an glomerulären Halbmonden von KO-Mäusen. DBA/1J $p = 0{,}0002$, $r^2 = 0{,}4593$; DB1-IFNgRKO $p < 0{,}0001$, $r^2 = 0{,}9355$; DB1-IL17AKO $p < 0{,}0001$, $r^2 = 0{,}9652$; DB1-IL23p19KO $p < 0{,}0001$, $r^2 = 0{,}9474$.

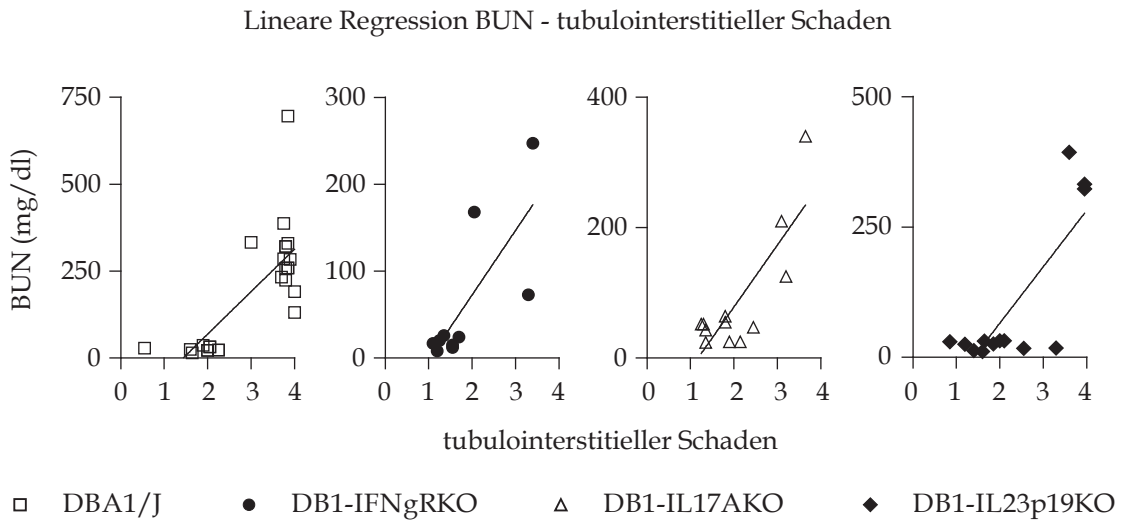

Abbildung 27: Lineare Regressionsanalyse des Blutharnstoffs gegen den tubulointerstitiellen Schaden

Lineare Regression der Blutharnstoffwerte gegen die tubulointerstitiellen Schadenswerte von KO-Mäusen. DBA/1J $p < 0{,}0001$, $r^2 = 0{,}5682$; DB1-IFNgRKO $p = 0{,}01$, $r^2 = 0{,}5849$; DB1-IL17AKO $p = 0{,}0011$, $r^2 = 0{,}6724$; DB1-IL23p19KO $p = 0{,}0011$, $r^2 = 0{,}6374$.

4.2.4 Renale Makrophageninfiltration in KO-Mäusen

Um die Ursache der renalen Schädigungen zu ermitteln und zu spezifizieren wurden weitere immunhistochemische Anfärbungen an den Paraffinschnitten durchgeführt. Zur Identifizierung von Makrophagen wurde das Antigen F4/80 angefärbt. Dieses Plasmamembran-Glykoprotein hat ein Molekulargewicht von ca. 160 kDa und wird von reifen Makrophagen in der Maus exprimiert. [59]. In Abbildung 28 sind exemplarisch Fotos dieser Anfärbungen gezeigt. Die grafische Auswertung zeigt, dass in allen schwer kranken Nieren ein im Vergleich zu den naiven Nieren erhöhter Anteil an Makrophagen zu finden ist. In den DB1-IFNgRKO-Proben liegt dieser Anteil bei durchschnittlich 17 Zellen pro 10 Gesichtsfelder. Die IL-17A- und die IL-23p19-defizienten Mäuse wiesen 22 bzw. 21 F4/80$^+$ Zellen auf. In den WT-Nieren waren bis zu 114 gefärbte Zellen pro 10 Gesichtsfelder vorhanden. Im Median waren 58 Zellen angefärbt, damit liegt die Anzahl der Makrophagen 2,6 bis 3,4-mal so hoch wie in den KO-Tieren.

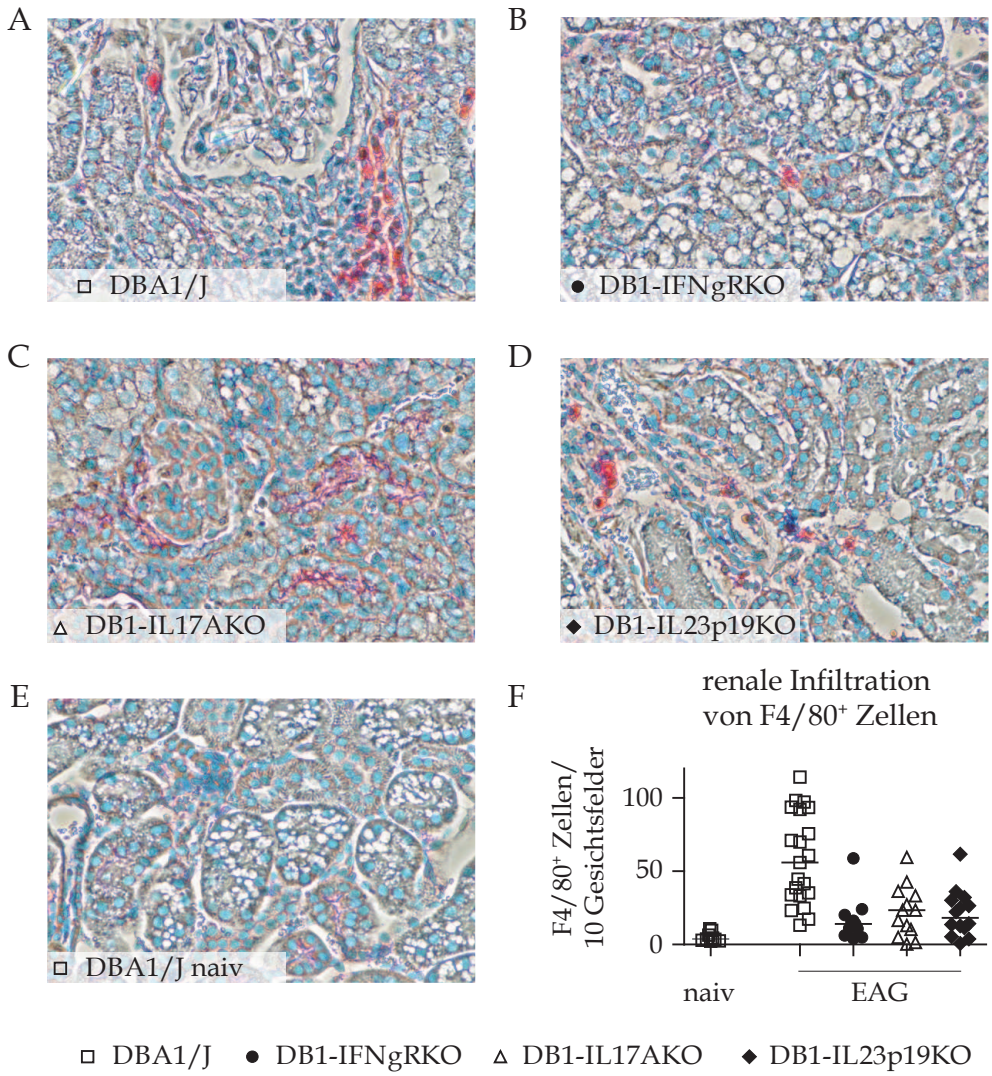

Abbildung 28: F4/80^{+} Zellen auf KO-Nierenschnitten
(A) bis (D) Exemplarische Fotos von F4/80-Anfärbungen in den Nieren von KO-Mäusen. (E) Naive Kontrolle, Färbung von Nierenschnitten in Paraffin. (F) Auswertung der gezählten angefärbten Zellen je 10 Gesichtsfelder pro Maus.

4.2.5 Spezifische T-Zellantwort in KO-Mäusen

In dem homologen EAG-Modell mit m-α3(IV)NC1 konnten in den Nieren der schwer kranken Mäuse mittels Durchflusszytometrie aktivierte $CD4^+$ T-Zellen nachgewiesen werden, die nach Stimulation mit dem Antigen Zytokine produzierten (4.1.5.2). Zur Untersuchung der Rolle dieser T-Zellen in der Erkrankung der KO-Tiere wurden FACS-Analysen durchgeführt.

Aus Milz und Nieren schwer kranker EAG-Mäuse wurden T-Zellen isoliert und analysiert. Dazu wurden aus je einer Niere pro Maus eine Einzelzellsuspension hergestellt und die T-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert. CFSE-gefärbte Milzzellen aus naiven Mäusen wurden als Antigen-präsentierende Zellen den Nierenzellen zugesetzt, aber aus der Analyse ausgeschlossen. Die Milzzellen der kranken Mäuse wurden isoliert, von den Erythrozyten gereinigt und je 1 Million Zellen inkubiert. Die Stimulation erfolgte für 8 Stunden in RPMI komplett Medium, spezifisch mit 54 µg/ml h-α3(IV)NC1 bzw. unspezifisch mit 50 ng/ml Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) und 1 µM Ionomycin. Als Kontrollen wurden Kulturen ohne Stimulation durchgeführt. Nach 4 Stunden wurden 10 µg/ml Brefeldin A zugesetzt. Anschließend wurden die $CD4^+$ T-Zellen auf Aktivierung und Zytokinproduktion hin untersucht.

In den Milzzellen der schwer kranken Tiere konnten im Gegensatz zu den naiven Proben nach spezifischer Stimulation reaktive zytokinproduzierende T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 29). In den WT-Milzen lag der Anteil an $CD154^+$ Zellen im Median bei 0,03 %, in den DB1-IL17AKO- und DB1-IL23p19KO-Tieren bei 0,08 % und in den DB1-IFNgRKO-Milzen bei 0,12 %. Die Produktion der untersuchten Zytokine war in den DB1-IFNgRKO-Proben erhöht gegenüber den DBA/1J-Milzen. Die Werte der IL-17A- und IL-23p19-defizienten Tiere für TNF und IFN-γ unterschieden sich kaum von denen der WT-Tiere. In diesen KO-Tieren exprimierten 0,016 % bis 0,043 % der $CD4^+$ T-Zellen TNF und 0,003 % bis 0,009 % IFN-γ. Im Gegensatz dazu konnte nur in den DBA/1J- und den DB1-IFNgRKO-Milzen IL-17A nachgewiesen werden, mit einer Frequenz von 0,004 % bzw. 0,018 %. Die Kontroll-Stimulation mit PMA/Ionomycin bestätigt, dass in allen Proben T-Zellen zur Expression von CD154, TNF und IFN-γ angeregt werden konnten. IL-17A dagegen konnte in den DB1-IL17AKO- und DB1-IL23p19KO-Milzen nicht bzw. nur in sehr geringem Maße nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

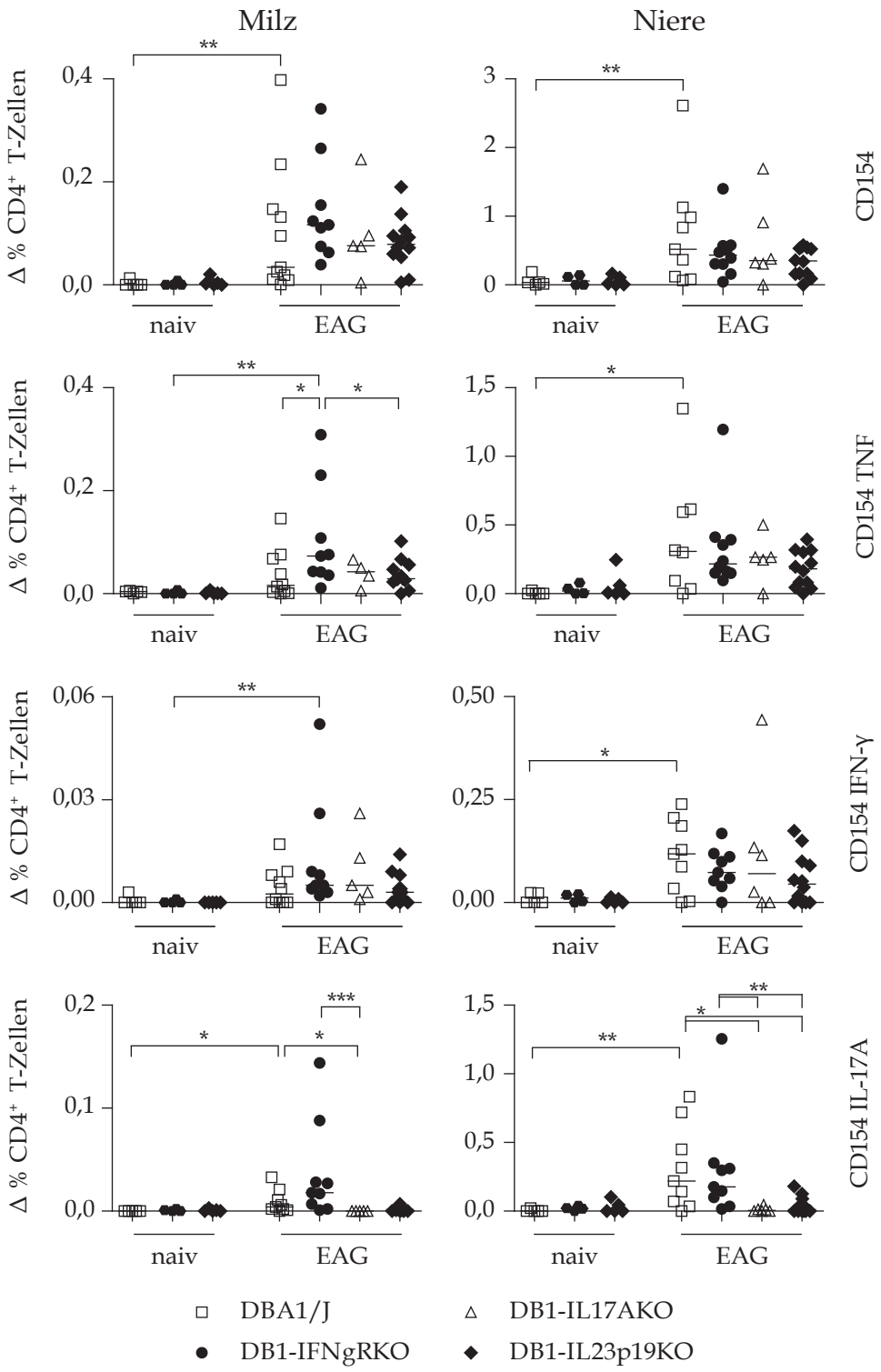

Abbildung 29: FACS-Analyse der Zytokinproduktion in KO-Mäusen
Grafische Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse der Zytokinproduktion in Milz- und Nierenzellen. Die Mäuse wurden gemäß Immunisierungsprotokoll 4-mal mit h-α3(IV)NC1 immunisiert und schwer kranke Mäuse analysiert. Aus der perfundierten Milz bzw. Niere wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und die T-Zellen angereichert. Die Zellen wurden für 8 Stunden mit 54 µg/ml h-α3(IV)NC1 inkubiert und anschließend CD154 sowie die Zytokine angefärbt. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.

In allen Nieren aus schwer kranken Tieren konnten im Vergleich zu den naiven Proben signifikant mehr aktivierte T-Zellen nachgewiesen werden. Nach Stimulation mit h-α3(IV)NC1 wiesen alle Nieren vergleichbare Frequenzen von TNF-produzierenden Zellen auf. Diese lagen im Median bei 0,18 % bis 0,3 % der $CD4^+$ T-Zellen. Für IFN-γ wurden Werte von 0,045 % bis 0,118 % gemessen, mit einer breiten Streuung bis zu einem Wert von 0,44 %. Wie auch in den Milzen war in den Nieren der DB1-IL17AKO- und DB1-IL23p19KO-Tiere keine Expression von IL-17A messbar. In den WT- und DB1-IFNgRKO-Proben konnten im Median 0,22 % bzw. 0,18 % der T-Zellen spezifisch zur IL-17A-Produktion angeregt werden. Nach unspezifischer Stimulation mit PMA/Ionomycin wurden in allen Gruppen vergleichbare Werte für Aktivierung, TNF- sowie IFN-γ-Produktion ermittelt (nicht gezeigt). Eine Expression von IL-17A konnte in den DB1-IL17AKO-Proben nicht und in den DB1-IL23-p19KO-Proben nur zu einem geringen Anteil nachgewiesen werden.

4.2.6 Expression von Chemokinen und NO-Synthase

Um die Auswirkungen der Gen-Defizienzen auf das Entzündungsgeschehen zu untersuchen wurde mittels quantitativer *Realtime*-PCR die Expression von bestimmten Chemokinen und iNOS untersucht.

Aktivierte Makrophagen können eine Vielzahl von Effektormolekülen ausschütten, darunter Stickstoffmonoxid (NO). Das zur Synthese von NO benötigte Enzym ist die induzierbare NO Synthase, iNOS. Durch Bindung von IFN-γ an seinen Rezeptor kann die Transkription von iNOS direkt aktiviert werden [35].

In Abbildung (30A) ist die Expressionsanalyse in Milz und Niere für naive und kranke Mäuse gezeigt. Kaum eine der Milzen wies messbare RNA-Konzentrationen für *Inos* auf. In den Nierenproben hingegen ist in allen Gruppen die RNA-Konzentration in den schwer kranken Tieren deutlich höher als in den Kontroll-Proben. In den Nieren kranker IFN-γ-Rezeptor-defizienter Tieren ist die Expression im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant reduziert.

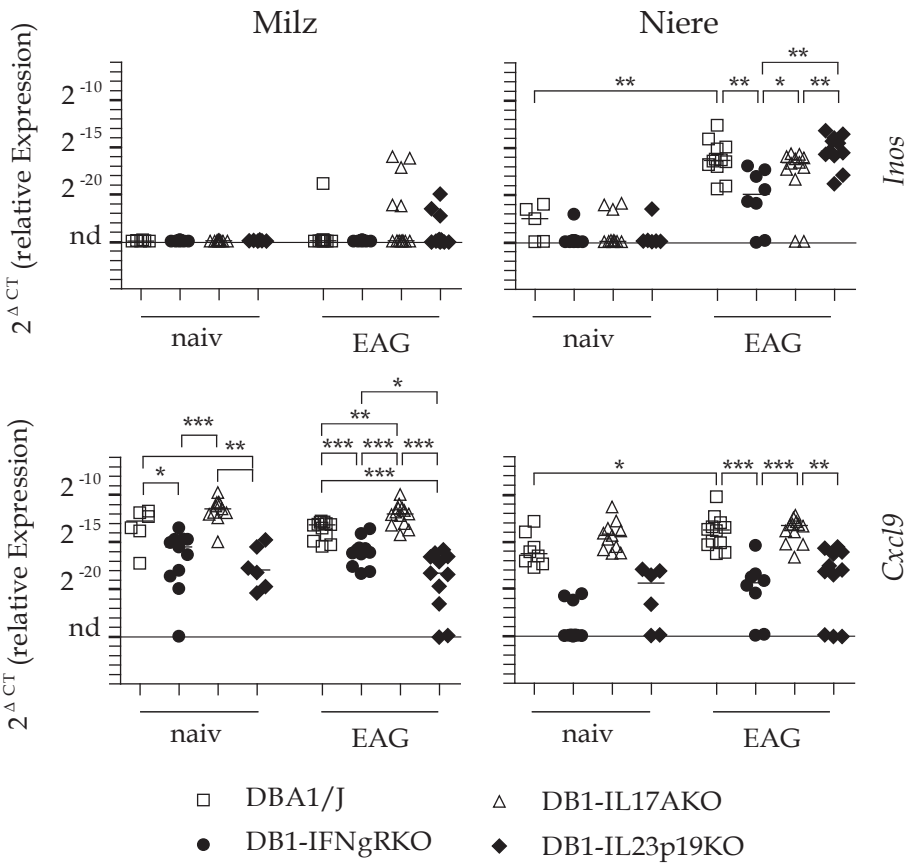

Abbildung 30: qRT-PCR Expressionsanalyse von *Inos* und *Cxcl9* in KO-Mäusen

Dargestellt ist die mRNA Expression des Zieltranskripts in Relation zur 500-fach verdünnten 18S rRNA in Gesamtmilz und –niere. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. nd = unter der Nachweisgrenze. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.

Das Chemokin CXCL9, auch MIG (*Monokine Induced by Interferon-γ*) genannt, induziert durch Bindung an den Rezeptor CXCR3 die Rekrutierung von Immunzellen zum Ort der Entzündung [33]. In der nephrotoxischen Serumnephritis verläuft die CXCL9-Expression analog zur Stärke der Th1-Antwort in der späten Phase der Erkrankung [50]. In den hier untersuchten Proben konnte keine erhöhte Expression von CXCL9 in den kranken gegenüber den naiven Milzen aller Gruppen festgestellt werden (Abb. 30B). Jedoch zeigten sich unterschiedliche Expressionslevel zwischen den Gruppen, mit den höchsten Werten für DB1-IL17AKO-Tiere, weniger hohen für WT-Tiere und den niedrigsten Werten für DB1-IFNgRKO- sowie DB1-IL23p19KO-Tiere. Für die Nieren zeigte sich die gleiche Verteilung, jedoch waren die Werte für die schwer kranken Tiere jeweils leicht bis signifikant erhöht.

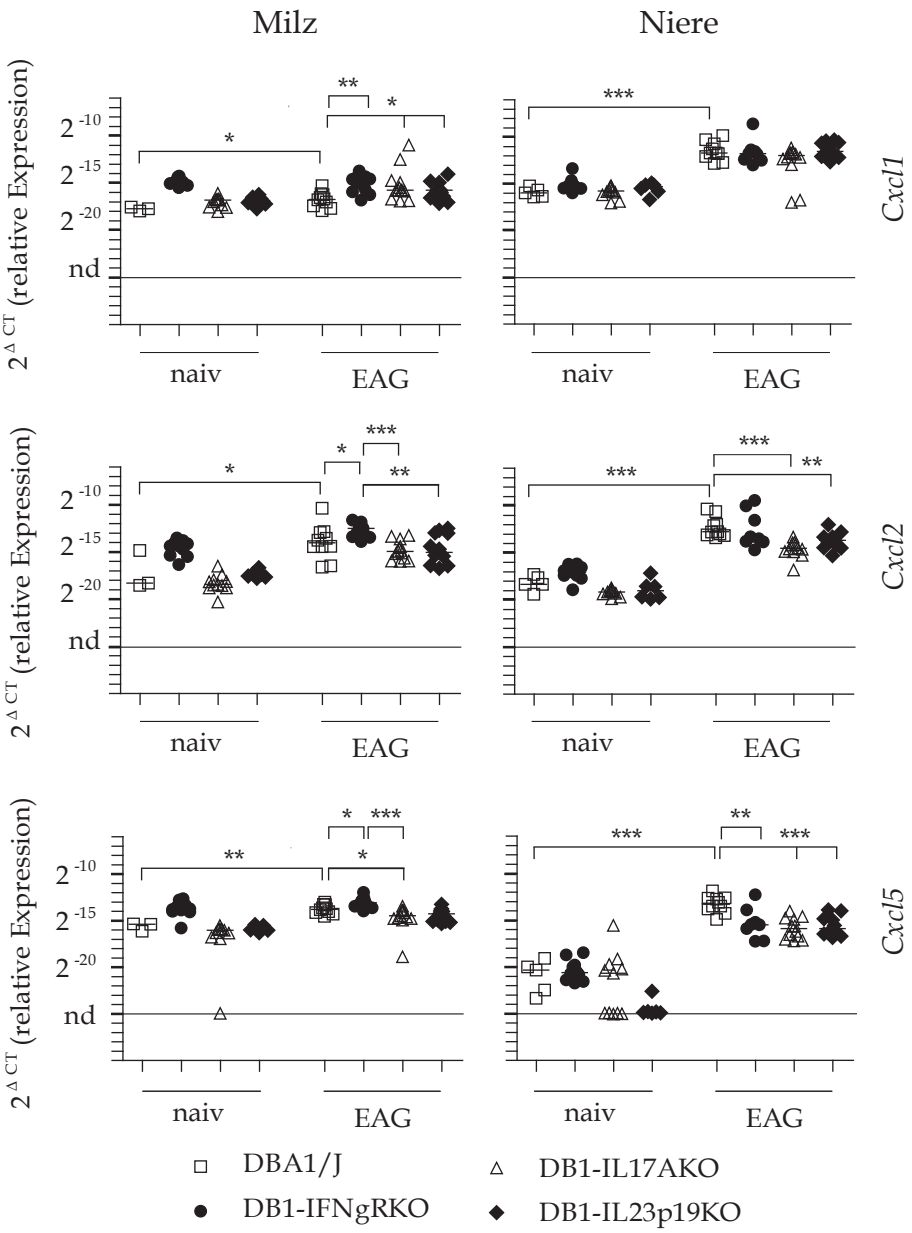

Abbildung 31: qRT-PCR Expressionsanalyse von *Cxcl1, Cxcl2* und *Cxcl5* in KO-Mäusen

Dargestellt ist die mRNA Expression des Zieltranskripts in Relation zur 500-fach verdünnten 18S rRNA in Gesamtmilz und –niere. Die Symbole repräsentieren die Werte für individuell analysierte Mäuse. Die Querbalken geben den Median an. nd = unter der Nachweisgrenze. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.

Die Expression von CXCL1 wird durch IL-17A induziert [43]. Dieses Chemokin wirkt durch Bindung an CXCR2 als Chemoattraktant für neutrophile Granulozyten [12]. In den IL17A- und IL23p19-defizienten sowie den WT-Proben wurde eine vermehrte Expression von CXCL2 in den kranken gegenüber den Kontroll-Milzen gemessen. Die DB1-IFNgRKO-Tiere wiesen im naiven und kranken Zustand erhöhte Werte auf. In den kranken Nieren aller Gruppen zeigte sich eine deutliche Erhöhung der

mRNA-Konzentration im Vergleich zu den naiven Kontrollen, zwischen den Gruppen ergaben sich keine Unterschiede.

Ebenfalls über CXCR2 wirkt das Chemokin CXCL2. In der nephrotoxischen Serumnephritis korreliert die Expression von CXCL2, auch MIP-2 *(Macrophage inflammatory protein 2-alpha)* genannt, mit der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [65]. Sowohl in der Milz auch als in der Niere von allen Tieren stieg die Expression bei schwerer EAG signifikant an. In der Milz von DB1-IFNgRKO-Tieren war die mRNA-Konzentration bereits im gesunden Zustand gegenüber den anderen Kontrollen erhöht, stieg jedoch in der EAG weiter an. Das Fehlen von IL-17A oder IL23p19 bedingte sowohl in der Milz als auch in der Niere der kranken Tiere eine z.T. signifikant geringere Expression von CXCL2 im Vergleich zum Wildtyp.

CXCL5 oder auch ENA-78 (*epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78*) ist ein weiterer Ligand für CXCR2, der an der Regulierung des IL-17/G-CSF Signalwegs und damit der Homöostase von Neutrophilen beteiligt ist [37]. In allen Gruppen wiesen die kranken Milzen erhöhte Werte für *Cxcl5*-mRNA auf, in den DB1-IFNgRKO-Milzen war bereits im gesunden Tier die Expression verstärkt. Die Werte der IL17A- und IL23p19-defizienten Milzen lagen unter denen der WT-Tiere, die der DB1-IFNgRKO-Mäuse darüber. In allen Nierenproben war ein signifikanter Anstieg der CXCL5-Expression in kranken gegenüber gesunden Geweben nachweisbar, die höchsten Werte wiesen die WT-Proben auf.

Die Expressionsanalyse zeigt, dass sowohl iNOS und CXCL9 als Marker für die Th1-Achse als auch CXCL1, CXCL2 und CXCL5 als Marker für die Th17-Achse der T-Zellantwort in den Nieren von schwer kranken Mäusen vermehrt gebildet werden. In den DB1-IFNgRKO-Proben wurden gegenüber den WT-Proben geringere Konzentrationen für *Inos* und *Cxcl9* festgestellt. Die DB1-IL17AKO- und DB1-IL23p19KO-Nieren zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Expression von CXCL2 und CXCL5.

Insgesamt zeigen meine Ergebnisse, dass die Induktion der EAG mit dem heterologen Antigen h-α3(IV)NC1 in allen 4 verwendeten Mauslinien (DBA/1J, DB1-IFNgRKO, DB1-IL17AKO und DB1-IL23p19KO) zu einer Erkrankung geführt hat. Die Tiere bildeten ab Woche 4 große Mengen spezifischer Antikörper mit ähnlicher Subklassenverteilung und entwickelten ab Woche 7 nachweislich eine bis Krankheitsende steigende Proteinurie. 8 bis 11 Wochen nach Immunisierung zeigten mehrere Tiere jeder Gruppe rasch zunehmende Ödeme und Apathie als Anzeichen einer Niereninsuffizienz. Die Analyse der IgG-Ablagerungen entlang der glomerulären Basalmembran war in allen Gruppen vergleichbar, in allen Proben wurde eine membranöse Glomerulonephritis festgestellt. In der Durchflusszytometrie konnten in allen Gruppen spezifisch aktivierte T-Zellen aus schwer kranken Nieren nachgewiesen werden, die in ähnlichem Maße TNF und IFN-γ produzierten. Signifikante Unterschiede zeigten sich bei der Analyse der BUN-Werte im Serum und der histologischen Untersuchung der glomerulären Halbmondbildung bzw. des tubulointerstitiellen Schadens sowie der Infiltration von Makrophagen. Hinsichtlich dieser Parameter wiesen die DB1-IFNgRKO-Mäuse den mildesten Krankheitsverlauf auf, nur wenige Mäuse zeigten über die Kontrollen hinaus erhöhte Werte. Leichte bis mäßige Schädigungen im Nierengewebe wurden bei den DB1-IL17AKO- und DB1-IL23p19KO-Tieren festgestellt. Das Ausmaß der Schäden im Nierengewebe ist demnach offenbar abhängig von einer intakten Antwort von autoreaktiven Th1- und Th17-Zellen.

5 Diskussion

Eine besonders schwere Form der autoimmunen Nierenentzündung ist die anti-GBM-Nephritis. Hierbei handelt es sich um eine rapid progrediente Glomerulonephritis, bei der Antikörper gegen Bestandteile der Basalmembran der Glomeruli gebildet werden [10]. Diese Antikörper lagern sich typischerweise entlang der Membran ab. Als Autoantigen konnte im Menschen die Kopfgruppe einer Kollagenkette identifiziert werden, das α3(IV)NC1 [24]. Die Bindung der Antikörper erfolgt an zwei konformationellen Epitopen [6] und führt zur Spaltung von quaternären Kollagenstrukturen. Daraufhin kommt es zur Destabilisierung der Basalmembran, wodurch möglicherweise zusätzliche Epitope freigelegt werden. Neben der Aktivierung des Komplementsystems spielt die zelluläre Immunantwort eine entscheidende Rolle bei der folgenden Entzündungsreaktion. In Patientenproben und in dem Nierengewebe experimentell immunisierter Tiere konnten große Mengen infiltrierender Makrophagen und aktivierte T-Zellen nachgewiesen werden. Die genaue Rolle dieser T-Zellen für die Entstehung der Krankheit, die Ausprägung der Schädigung und die Halbmondbildung in den Glomeruli ist derzeit Gegenstand von Untersuchungen in verschiedenen Modellen.

Das rekombinant hergestellte Antigen h-α3(IV)NC1 wird genutzt, um in einem Transfer-Ansatz in Ratten und Mäusen eine Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis
(EAG) zu induzieren [56]. Nach mehrfacher Immunisierung mit diesem Protein entwickeln die Tiere einen Krankheitsverlauf, der in den wichtigsten Punkten mit den klinischen Parametern einer humanen rapid progredienten Glomerulonephritis übereinstimmt und daher ein geeignetes Modell für die Krankheit darstellt. Eine zweite Methode zur Induktion der EAG ist die Immunisierung mit aufgereinigter naiver Basalmembran. Die Verwendung des reinen Proteins hat gegenüber der Verwendung von aufgereinigter Basalmembran den Vorteil, dass man eine Immunreaktion auf ein bestimmtes Antigen mit begrenzter Epitopzahl untersuchen kann.

5.1 Die Induktion der EAG mit dem homologen m-α3(IV)NC1

Im ersten Teil der Arbeit sollte durch Verwendung des murinen Antigens eine echte autoimmune Situation geschaffen werden. Damit ist die Bildung von Antikörpern gewährleistet, die das körpereigene Antigen erkennen und nicht nur eine Kreuzreaktion gegenüber einer ähnlichen Sequenz aufweisen. Eine mögliche breitere Immunantwort auf ein heterologes Antigen wird vermieden. Dieser Ansatz ist auch weniger artifiziell und stellt einen direkten Verlust der Toleranz gegenüber dem Antigen dar. Die Immunisierung mit dem homologen Antigen ist insbesondere auch für die Analyse von $CD4^+$ T-Zellantworten interessant, da T-Zellen normalerweise eine relativ hohe Spezifität für die korrekte Aminosäuresequenz besitzen (vgl. [60]).

5.1.1 Krankheitsverlauf und klinische Parameter der EAG

Die Immunisierung von DBA/1J Mäusen mit dem homolgogen m-α3(IV)NC1 führte zu einer schweren anti-GBN-Nephritis. Die Tiere entwickelten hohe Konzentrationen von m-α3(IV)NC1 spezifischen Antikörpern, die hauptsächlich den Subklassen IgG1 und IgG2a angehörten. Bis Woche 10 zeigte sich bei allen Tieren eine schwere Proteinurie. Die Bildung von massiven Ödemen wurde bei 90 % aller untersuchten Mäuse festgestellt. Aufgrund dieser Anzeichen einer schweren Nierenschädigung wurden die Tiere getötet. In komplettem Nierengewebe konnte eine erhöhte Expression des Entzündungsmarkers TNF festgestellt werden. In der histologischen Untersuchung wiesen die meisten Tiere eine glomeruläre Halbmondbildung und eine mittlere bis schwere tubulointerstitielle Schädigung auf. Diese Schädigung war insgesamt milder und manifestierte sich ca. 2 Wochen später im Vergleich zu den Versuchen mit dem humanen Antigen [20]. Weshalb es zu einer abgeschwächten Form der Krankheit bei Verwendung des homologen Antigens kam, ist nicht bekannt. Bereits 2001 wurde in WKY-Ratten das homologe Ratten-Antigen zur Immunisierung eingesetzt [60]. Der Krankheitsverlauf dieses EAG-Modells wurde als vergleichbar mit anderen Ansätzen beschrieben, in denen entweder das aus der glomerulären Basalmembran gereinigte Ratten-Antigen oder das rekombinante humane α3(IV)NC1 verwendet wurde. Antikörper aus den Ratten, die mit dem homologen Antigen immunisiert worden waren, wiesen ähnliche Bindungseigenschaften wie humane Autoantikörper auf. In dem hier beschriebenen Maus-Modell konnten bereits in früheren Studien beim Einsatz von humanem α3(IV)NC1 hohe Konzentrationen an kreuzreaktiven Antikörpern gegen das murine Antigen nachgewiesen werden [20]. Möglicherweise ist die Sequenzhomologie von 92 % zwischen den murinen und humanen α3-Ketten ausreichend hoch oder die entscheidenden Abschnitte sind ausreichend konserviert, um die Generierung kreuzreaktiver Antikörper und T-Zellen zu ermöglichen. Ob die in dieser Arbeit untersuchten Antikörper, die gegen die murine Form des α3(IV)NC1 gerichtet waren, auch an das humane Antigen binden, wurde nicht getestet. Insgesamt konnte also eine etwas verzögerte und leicht abgeschwächte Form der EAG mit dem homologen murinen α3(IV)NC1 induziert werden, die jedoch alle wesentlichen Parameter des Modells aufweist und daher für weitere Untersuchungen in DBA/1J-Mäusen geeignet ist.

5.1.2 Spezifische T-Zellantwort in der EAG

Die Induktion der anti-GBM-GN in Mäusen durch Immunisierung mit dem m-α3(IV)NC1 ermöglichte die Untersuchung von T-Zellantworten in einer autoimmunen Umgebung. Die im Blut nachgewiesenen α3(IV)NC1-spezifischen Antikörper vom Typ IgG waren bereits wenige Tage nach der ersten Injektion nachweisbar. Für den Klassenwechsel von IgM- zu IgG-Antikörpern ist die Interaktion der B-Zelle mit einer T-Zelle nötig, die das gleiche Antigen erkennt. Daher wurde an Tag 10 nach Immunisierung die T-Zellantwort durchflusszytometrisch untersucht. Die Analysen umfassten neben der Anfärbung von INF-γ, dem Leitzytokin für Th1-Zellen, und von IL-17A, dem Leitzytokin für Th17-Zellen, auch die Anfärbung von TNF. Die aus der Milz immunisierter Mäuse isolierten $CD4^+$ T-Zellen reagierten auf die spezi-

fische Stimulation durch m-α3(IV)NC1 mit der Sekretion der untersuchten Zytokine. Im Endstadium der EAG wurden aus den Milzen und Nieren schwer kranker Tiere ebenfalls T-Zellen isoliert und analysiert. In der Milz konnten keine autoreaktiven Zellen identifiziert werden. In der Niere hingegen waren aktivierte zytokinproduzierende Zellen vorhanden. Sowohl die Zahl der polyklonal stimulierbaren T-Zellen als auch die Zahl der autoreaktiven T-Zellen war gegenüber naiven Kontrollen erhöht. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die zelluläre Immunantwort in der EAG organspezifisch und T-Zell-abhängig ist. Th1- und Th17-Zellen sind beispielsweise auch in einem anderen Modell für rapid progrediente Glomerulonephritis, dem NTN-Modell, gleichwertig an der Entstehung der Krankheit beteiligt [32].

In früheren Studien wurden durchflusszytometrische Analysen zum Aktivierungszustand der renalen $CD4^+$ T-Zellen in der EAG durchgeführt und isolierte Zellen funktionell mittels ELISpot untersucht [20]. Dabei wurde demonstriert, dass T-Zellen während der EAG in die Niere einwandern und dort einen aktivierten Phenotyp aufweisen. T-Zell-Transferexperimente mit WKY-Ratten [76] und HLA-DRB1*15:01 transgenen Mäusen [44] weisen auf eine direkte Beteiligung von T-Zellen bei der Krankheitsentstehung hin. In diesen Versuchen wurden 60×10^6bzw. 1×10^7 Zellen eines Klons intravenös transferiert. In den hier gezeigten Experimenten konnte in der Frühphase der EAG eine geringe Anzahl autoreaktiver T-Zellen in der Milz und später eine etwas größere Anzahl von spezifischen T-Zellen in der Niere detektiert werden. Insgesamt ist die Zahl der in der Niere nachweisbaren α3(IV)NC1-spezifischen T-Zellen aber relativ gering und es bleibt offen, wie diese wenigen Zellen die Rekrutierung einer großen Zahl von Makrophagen in die Niere bewerkstelligen und deren lokale Funktion regulieren.

5.2 Die Induktion der EAG in verschiedenen KO-Mäusen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die EAG in Tieren aus 3 verschiedenen *knockout*-Linien induziert. Hierfür wurden die Linien DB1-IFNgRKO, DB1-IL17AKO und DB1-IL23p19KO ausgewählt. Anhand des Krankheitsverlaufs sollte zunächst festgestellt werden, ob und in welchem Umfang die Immunisierung der Tiere mit α3(IV)NC1 zu einer Schädigung der Niere führt. Mit einer genaueren Analyse der Antikörperbildung und -ablagerung sowie der Proteinurie sollte die humorale Antwort näher untersucht werden. Unterschiede in der Bildung von Halbmonden und dem Auftreten erhöhter BUN-Werte sollten Hinweise auf den Einfluss der Mutationen in den Mäusen auf die zelluläre Immunantwort geben. Weiterhin sollten die Nieren auch mittels Histochemie und Expressionsanalyse untersucht werden. Aus schwer kranken Tieren sollten T-Zellen für die Zytokinprofilanalyse und den Test auf Autoreaktivität isoliert werden.

5.2.1 Der Verlauf der EAG in DB1-IFNgRKO-Mäusen

Zunächst wurde der Krankheitsverlauf in DB1-IFNgRKO-Tieren untersucht. Diese Tiere weisen eine Mutation im Exon V des Gens für den IFN-γR auf, welches für einen extrazellulären membranproximalen Teil kodiert. Diese Mutation führt zu einer

funktionellen Inaktivierung, da der extrazelluläre Teil des Rezeptors fehlt und keine Signalweiterleitung stattfinden kann. Die Entwicklung von Lymphozyten oder die Antigenpräsentation über MHCII wird durch die Mutation nicht beeinträchtigt. Da IFN-γ entscheidend für die frühe Immunantwort gegen intrazelluläre Parasiten und Viren ist, können die Mäuse die entsprechenden Infektionen nicht bekämpfen. Der Klassenwechsel der Antikörper von IgM zu IgG ist durch das Fehlen des IFN-γR nicht beeinträchtigt, jedoch ist die Generierung von IgG2a deutlich vermindert [23].

In der Linie DB1-IFNgRKO entwickelten die Mäuse nach 4-facher Immunisierung mit dem h-α3(IV)NC1 eine ansteigende Proteinurie mit schweren Ödemen im Endstadium der Krankheit in einem vergleichbaren Zeitraum wie die Wildtyp DBA/1J Mäuse. Die Entwicklung von hohen Konzentrationen α3(IV)NC1-spezifischer Antikörper und deren Ablagerung entlang der glomerulären Basalmembran war ebenfalls vergleichbar. Eine Analyse der Subklassen ließ keine unterschiedliche Zusammensetzung der Autoantikörper im Plasma erkennen. Deutliche Unterschiede zeigten sich aber in der Ausprägung der zellulären Immunantwort. Während in den WT-Tieren eine massive Makrophageninfiltration und eine starke Halbmondbildung zur terminalen Niereninsuffizienz mit erhöhten BUN-Werten führte, fand sich in den Nieren von DB1-IFNgRKO-Mäusen eine deutlich geringer Schädigung. Die Entzündung im Interstitium war zwar gegenüber den naiven Kontrollen signifikant erhöht, zeigte aber trotzdem nur eine milde Ausprägung. Die wenigen Tiere, bei denen eine glomeruläre Halbmondbildung beobachtet wurde, wiesen ebenfalls erhöhte BUN-Werte auf. Eine Anfärbung des Makrophagenmarkers F4/80 zeigte eine geringere Zahl von Makrophagen in der Niere und die im Vergleich zum Wildtyp signifikant geringere Expression von *Inos* und *Cxcl9* bestätigte diese Beobachtung. Das Fehlen des IFN-γR hatte keinen erkennbaren Effekt auf die Frequenz von autoreaktiven T-Zellen in der Niere schwer kranker Tiere. Im Median waren 0,4 % der $CD4^+$ T-Zellen nach Stimulation mir dem h-α3(IV)NC1 aktiviert und mehr als die Hälfte davon schüttete Zytokine aus. Die Frequenzen in den WT-Tieren waren hierzu vergleichbar.

In unserem EAG-Modell beinflusst der Defekt in der IFN-γ-Funktion vor allem die Rekrutierung von Makrophagen in die Niere und ihre lokale Aktivierung. Dies führt zu einer deutlich milderen Entzündungsreaktion. Ähnliche Effekte zeigen sich im Modell der Nephrotoxischen Nephritis (NTN) in dem die Gabe von anti-Maus-GBM-Antikörper aus dem Schaf zu einer T-Zell-vermittelten Nierenschädigung führt. Im NTN-Modell zeigen IFN-γ-defiziente Mäuse einen deutlich milderen Krankheitsverlauf, was als Hinweis auf eine Beteiligung von Th1-Zellen an der Entstehung der Erkrankung und der Schädigung der Niere angesehen wird [28]. Die hier verwendeten DB1-IFNgRKO-Mäuse wurden auch in anderen Modellen für autoimmune Krankheiten untersucht. In einem Modell, in dem eine Arthritis durch Immunisierung mit Glucose-6-Phosphat-Isomerase (G6PI) in KFA induziert wird, führt das Fehlen von IFN-γ-Signalen zu einer abgeschwächten Form der Arthritis [16]. Neben der Rolle von IFN-γ als proinflammatorisches Zytokin wurden auch protektive Effekte von IFN-γ in anderen experimentellen Formen der Arthritis und weiteren Modellen von Autoimmunerkrankungen beschrieben [26]. Offenbar hängt die Wirkung von IFN-γ von der Natur des Antigens ab. Einen weiteren großen Einfluss haben die Adjuvantien und das Immunisierungsschema. Interessanterweise zeigte eine EAG-Studie mit C57BL/6-Mäusen, dass IFN-γ-defiziente Tiere einen schwereren renalen Scha-

den gegenüber den WT-Mäusen aufwiesen [29]. Neben den bereits beschriebenen Auswirkungen des Immunisierungsprotokoll könnten auch genetische Unterschiede zwischen C57BL/6- und DBA/1J-Mäusen für die gegensätzlichen Ergebnissen dieser und unserer Studie verantwortlich sein. In einem Vergleich verschiedener Mauslinien bezüglich der Suszeptibilität für die durch h-α3(IV)NC1 induzierte EAG zeigten C57B/6-Mäuse erst nach über drei Monaten milde Anzeichen einer Erkrankung [21]. Zu diesem Zeitpunkt waren die meisten der untersuchten DBA/1J-Tiere aufgrund terminaler Niereninsuffizienz bereits getötet worden. Aufgrund des relativ milden Verlaufs der EAG in C57BL/6 Mäusen könnte sich das Fehlen der IFN-γ-Wirkung anders auswirken als im fulminanten Verlauf der EAG in DBA/1J-Mäusen. Generell ist hier aber fraglich, in wie weit der sehr milde Verlauf der EAG in C57BL/6 Tieren die humane anti-GBM-Nephritis widerspiegelt.

Die hier gezeigten Ergebnisse für die DB1-IFNgRKO-Mäuse sind vergleichbar mit den Ergebnissen eines EAG-Modells, bei dem nur 2 statt 4 Immunisierungen mit dem h-α3(IV)NC1 in DBA/1J-Mäusen vorgenommen wurden. Die klinischen Parameter ähneln weniger denen einer anti-GBM-GN als vielmehr denen einer membranösen Nephropathie [77]. Die Tiere bildeten große Mengen von α3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern, die sich granulär entlang der GBM ablagerten. Aufgrund von Komplement-Aktivierung kam es zur Schädigung von Podozyten und einer Beeinträchtigung der Schlitzmembranen. Die daraus resultierende Proteinurie war die Ursache einer Hypoalbuminämie, einer Hyperlipidämie und letztendlich der Bildung von massiven Ödemen. Nur wenige Mäuse zeigten eine Halbmondbildung und alle wiesen nur geringe tubulointerstitielle Schäden auf. Die Übereinstimmung der Beobachtungen nach der 2-fachen Immunisierung und den hier gezeigten Daten für die IFN-γR defizienten Mäuse bestätigt die Hypothese, dass der EAG zwei immunologische Prozesse zugrunde liegen: Zunächst wird ein nephrotisches Syndrom durch die Immunisierung mit dem Antigen in komplettem Freundschen Adjuvans und einer Verstärkerimmunisierung induziert. Diese Erkrankung erfordert eine funktionierende humorale Immunantwort mit intakter B-Zell-Aktivierung und dem Klassenwechsel der Antikörper. Offenbar ist eine Signalübertragung durch IFN-γ hierfür nicht notwendig, da die DB1-IFNgRKO-Mäuse keinen Nachteil in der spezifischen Antikörperantwort hatten. Die Entwicklung der Erkrankung zu einer Nephritis hingegen ist nach den hier erhobenen Ergebnissen klar abhängig von einer intakten Th1-Antwort. In der Niere der schwer kranken DB1-IFNgRKO-Mäuse konnten autoreaktive T-Zellen nachgewiesen werden, die nach Stimulation mit dem Autoantigen TNF, IFN-γ und IL-17A produzierten. Durch die F4/80-Anfärbung und die Expressionsanalyse von Inos in der Niere wurde jedoch gezeigt, dass in Abwesenheit des IFN-γR die Rekrutierung und lokale Aktivierung von Makrophagen stark beeinträchtigt war. Es fanden sich nur wenige Glomeruli mit Halbmondbildung vorhanden und auch der tubulointerstitielle Schaden fiel gering aus. Im Gegensatz zu Wildtyptieren führte die 4-fache Immunisierung in DB1-IFNgRKO-Tieren nicht zum Übergang des nephrotischen Syndroms in eine fulminante Entzündungsreaktion mit Halbmondbildung. Diese Weiterentwicklung der Erkrankung war also strikt von einer IFN-γ-Wirkung und daher höchstwahrscheinlich von einer funktionalen Th1-Antwort abhängig.

5.2.2 Die EAG in DB1-IL17AKO- und DB1-IL23p19KO-Mäusen

Th17-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung vieler Autoimmunkrankheiten im Menschen und ihren tierexperimentellen Modellen. Daher wurden DB1-IL17AKO-Mäuse mit dem h-α3(IV)NC1 immunisiert und der Verlauf der EAG analysiert. Diese Tiere exprimieren kein IL-17A, da die Exons 1 und 2 aus dem *Il-17*-Gen mutiert sind. Unter pathogenfreien Bedingungen zeigen die Mäuse keinen auffälligen Phänotyp und die T-Zellproliferation und Zytokinproduktion von Th1- und Th2-Zellen unter unspezifischer mitogener Stimulation sind nicht beeinflusst [42]. IL-17A induziert die verstärkte Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-6, CXCL1, CXCL8 und CCL2 im Gewebe und in infiltrierenden Entzündungszellen [67]. Dadurch wird die Rekrutierung von weiteren Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten verstärkt, die letztendlich zum Schaden im Zielorgan führt. In entzündeten Geweben treten Th17-Zellen häufig zusammen mit Th1-Zellen auf. IL-17A-defiziente Mäuse weisen in bestimmten Modellen eine verminderte Antikörperproduktion auf. Die Rolle von Th17-Zellen in Autoimmunkrankheiten wurde erstmals in IL23p19-defiziente Mäusen gezeigt. Diese Tiere besitzen eine intakte Th1-Antwort, aber eine stark reduzierte Anzahl an Th17-Zellen. Der Grund hierfür ist, dass IL23 zwar nicht für die Differenzierung von TH17-Zellen, aber für die Stabilisierung und Expansion der Population benötigt wird [67]. IL-23 besteht aus den Untereinheiten p19 und p40. Die Untereinheit p40 bildet zusammen mit p35 das IL-12, welches für die Differenzierung von Th1-Zellen benötigt wird. In den DB1-IL23p19KO-Mäusen wurde die gesamte Gensequenz für die p19 Untereinheit des IL-23 entfernt. Die Tiere zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten außer einer leichten Verschiebung der DC-Population zu einem $CD8^+$ Phänotyp. Die Entwicklung und das Priming von T-Zellen scheinen normal zu verlaufen[17]. Die Tiere weisen normale B-Zellfunktionen auf, die T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung ist jedoch deutlich gestört. Dies führt zu reduzierten Antikörperantworten für alle Subklassen im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem ist die Antwort von $CD4^+$ Gedächtinis-T-Zellen ineffizient. Die beobachteten Defekte der IL23p19-defiziente Mäuse werden von einer reduzierten IL-17A-Produktion begleitet und weisen große Ähnlichkeit zu denen in IL-17A-defiziente Tieren auf. Es ist jedoch nicht vollständig geklärt, ob die Immunantwort in IL-23p19-defiziente Mäusen darüber hinaus eingeschränkt ist.

Die Induktion der EAG durch 4-fache Immunisierung mit dem h-α3(IV)NC1-in DB1-IL17AKO-Mäusen und DB1-IL23p19KO-Mäusen führte zu einem ähnlichen Ergebnis wie die Induktion in DB1-IFNgRKO oder die 2-fache Immunisierung. Der Großteil der Mäuse entwickelte alle Anzeichen eines nephrotischen Syndroms mit der Ablagerung von Autoantikörpern und Proteinurie, die innerhalb von 9 bis 16 Wochen zu massiven Ödemen führte. In den DB1-IL23p19KO-Mäusen war die Konzentration von zirkulierenden α3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern gegenüber den WT-Mäusen signifikant reduziert. Eine Titration von spezifischem IgG1, IgG2a und IgG2b konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen. Die Tiere zeigten auch eine zu den Wildtyp Tieren vergleichbare IgG-Ablagerungen in den Nierenschnitten. Die Werte für den tubulointerstitiellen Schaden waren signifikant niedriger als die der Wildtyp-Mäuse, ebenso der Anteil Nieren, die mehr als 5 % glomeruläre Halbmonde

aufwiesen. Wie die DB1-IFNgRKO-Tiere zeigten auch die DB1-IL17AKO-Tiere und die DB1-IL23p19KO-Tiere autoreaktive T-Zellen in der Niere. In den DB1-IL23KO-Tieren waren nur sehr wenige IL-17A-Produzenten vorhanden, in DB1-IL17AKO Tieren fehlten sie, wie erwartet, ganz.

Die Expressionsanalyse von mRNAs für proinflammatorische Proteinen ergab einige Unterschiede zwischen DB1-IL17AKO, DB1-IL23p19KO und Wildtyp Tieren. Die Konzentration von *Inos* wurde in den Nieren der schwer kranken DB1-IL17AKO-Tieren etwas weniger stark hochreguliert als in den WT- oder DB1-IL23p19KO-Tieren. *Cxcl9* hingegen war in allen Proben der DB1-IL23p19KO-Tiere signifikant geringer exprimiert als in den WT- oder DB1-IL17AKO-Tieren. Direkte Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf konnten nicht festgestellt werden. In allen Nierenproben schwer kranker Mäuse war die Expression von *Cxcl1*, *Cxcl2* und *Cxcl5* im Vergleich zu den naiven Proben hochreguliert. In den DB1-IL17AKO- und DB1-IL23p19KO-Proben lagen die Expressionslevel von *Cxcl2* und *Cxcl5* jedoch jeweils signifikant unter denen der WT-Mäuse. Warum die als redundant geltenden Chemokine CXCL1 und CXCL2 unterschiedlich reguliert waren, ist nicht bekannt.

Die DB1-IL17AKO- und DB1-IL23p19KO-Tiere zeigten eine ähnliche Veränderung des Krankheitsverlaufs gegenüber den Wildtyp-Tieren. Für die Induktion der EAG scheint also das Fehlen der normalen IL-17A-Produktion entscheident zu sein. Auch für die DB1-IL23p19KO-Tiere scheint in diesem Modell nur das Fehlen der Th17-Antwort den Krankheitsverlauf zu bestimmen. Zusätzliche Effekte der IL-23-Defizienz konnten hier nicht festgestellt werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Induktion der EAG in Mäusen mit gestörter T-Zellantwort zu einer Krankheit führt, die dem nephrotischen Syndrom ähnelt. Wie bei der von Zhang *et al.* publizierten 2-fach-Immunisierung fanden sich in den hier untersuchten Tieren keine glomerulären Halbmonde oder vergleichbare Gewebeschäden. Diese Ergebnisse weisen auf eine essentielle Rolle sowohl der Th1- als auch der Th17-Antwort bei der Entstehung der schweren Entzündung hin.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten autoreaktive IFN-γ^+ Th1- und IL-17A$^+$ Th17-Zellen im Endstadium der EAG in den Nieren mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Eine Induktion der EAG in Mäuse mit gestörter Th1- oder Th17-Antwort führte zu einem deutlich milderen Krankheitsverlauf. Die humorale Immunantwort verursachte zwar ein nephrotisches Syndrom, eine Glomerulonephritis mit Halbmondbildung konnte sich aber aufgrund der gestörten T-Zellantwort nicht ausbilden. Unklar ist bislang, ob das nephrotische Syndrom eine Voraussetzung für die Ausprägung der GN im Verlauf der EAG darstellt oder ob beide Krankheiten unabhängig voneinander auftreten können. Zur Untersuchung dieser Fragestellung bietet sich der Transfer von Antikörpern oder T-Zellen aus immunisierten Tieren in naive Tiere an. Zunächst ist zu klären, ob und inwieweit Serum aus immunisierten Mäusen in naiven Tieren eine Nephropatie auslösen kann. Bei erfolgreicher Induktion sollte versucht werden, einen pathogenen monoklonalen Antikörper herzustellen. Ein solcher Antikörper würde die Etablierung eines einfachen und reproduzierbaren Krankheitsmodells für das nephrotische Syndrom erlauben. Durch den Transfer von α3(IV)NC1-spezifischen T-Zelllinien oder angereicherten autoreaktiven CD4$^+$ T-Zellen sollte versucht werden, unabhängig von der humoralen Antwort eine zellvermittelte GN zu induzieren. Sollte dies gelingen, so könnten weitere Transfers mit polarisierten T-Zellen Aufschluss über die genaue Funktion von Th1- und Th17-Zellen bei der Krankheitsentstehung geben. Langfristiges Ziel von Arbeiten wie der vorliegenden ist es, das grundlegende Verständnis für Pathomechanismen zu verbessern und Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen. Eine genauere Analyse der Rolle von Th1- und Th17-Zellen im Goodpasture-Syndrom wäre durch Untersuchung von Patientenmaterial möglich. Eine Isolierung von T-Zellen aus Nierengewebe für die FACS-Analyse ist wahrscheinlich nur in seltenen Ausnahmefällen möglich. Praktikabel ist aber wahrscheinlich die Analyse von Blutproben aus Patienten auf das Vorhandensein von autoreaktiven T-Zellen. Interessant wäre zu sehen, welches Zytokinprofil diese Zellen besitzen, in welcher Zahl sie im Patienten vorliegen und ob diese Parameter mit der Nierenschädigung korrelieren. Veränderungen dieser Parameter im Verlauf von Erkrankung und Therapie könnten weitere Hinweise zur Funktion der Zellen in der Erkrankung geben und eventuell auch neue Behandlungsstrategien eröffnen.

7 Literaturverzeichnis

Literatur

[1] Bertani, T., Abbate, M., Zoja, C., Corna, D., Perico, N., Ghezzi, P., & Remuzzi, G. (1989). Tumor necrosis factor induces glomerular damage in the rabbit. *Am J Pathol*, **134**(2):419–430.

[2] Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, **15**:749–795.

[3] Bolton, W. K., Chen, L., Hellmark, T., Wieslander, J., & Fox, J. W. (2005). Epitope spreading and autoimmune glomerulonephritis in rats induced by a T cell epitope of Goodpasture's antigen. *J Am Soc Nephrol*, **16**(9):2657–2666.

[4] Bolton, W. K., Innes, Jr, D., Sturgill, B. C., & Kaiser, D. L. (1987). T-cells and macrophages in rapidly progressive glomerulonephritis: clinicopathologic correlations. *Kidney Int*, **32**(6):869–876.

[5] Bolton, W. K., May, W. J., & Sturgill, B. C. (1993). Proliferative autoimmune glomerulonephritis in rats: a model for autoimmune glomerulonephritis in humans. *Kidney Int*, **44**(2):294–306.

[6] Borza, D.-B., Bondar, O., Todd, P., Sundaramoorthy, M., Sado, Y., Ninomiya, Y., & Hudson, B. G. (2002). Quaternary organization of the goodpasture autoantigen, the alpha 3(IV) collagen chain. Sequestration of two cryptic autoepitopes by intrapromoter interactions with the alpha4 and alpha5 NC1 domains. *J Biol Chem*, **277**(42):40075–40083.

[7] Cairns, L. S., Phelps, R. G., Bowie, L., Hall, A. M., Saweirs, W. W. M., Rees, A. J., & Barker, R. N. (2003). The fine specificity and cytokine profile of T-helper cells responsive to the alpha3 chain of type IV collagen in Goodpasture's disease. *J Am Soc Nephrol*, **14**(11):2801–2812.

[8] Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, **162**(1):156–159.

[9] Collins, R. D. (2010). Dr Goodpasture: "I was not aware of such a connection between lung and kidney disease". *Ann Diagn Pathol*, **14**(3):194–198.

[10] Couser, W. G. (2012). Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *Journal of the American Society of Nephrology*, **23**(3):381–399.

[11] Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S. A., Gorman, D., Kastelein, R. A., & Sedgwick, J. D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, **421**(6924):744–748.

[12] De Filippo, K., Dudeck, A., Hasenberg, M., Nye, E., van Rooijen, N., Hartmann, K., Gunzer, M., Roers, A., & Hogg, N. (2013). Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*, **121**(24):4930–4937.

[13] Desjardins, M., Gros, F., Wieslander, J., Gubler, M. C., & Bendayan, M. (1990). Heterogeneous distribution of monomeric elements from the globular domain (NC1) of type IV collagen in renal basement membranes as revealed by high resolution quantitative immunocytochemistry. *Lab Invest*, **63**(5):637–646.

[14] Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2008). Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, :10–3.

[15] Frentsch, M., Arbach, O., Kirchhoff, D., Moewes, B., Worm, M., Rothe, M., Scheffold, A., & Thiel, A. (2005). Direct access to $CD4^+$ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med*, **11**(10):1118–1124.

[16] Frey, O., Mitera, T., Kelchtermans, H., Schurgers, E., Kamradt, T., & Matthys, P. (2011). Ameliorated course of glucose-6-phosphate isomerase (G6PI)-induced arthritis in IFN-y receptor knockout mice exposes an arthritis-promoting role of IFN-y. *J Autoimmun*, **36**(2):161–169.

[17] Ghilardi, N., Kljavin, N., Chen, Q., Lucas, S., Gurney, A. L., & De Sauvage, F. J. (2004). Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23-deficient mice. *J Immunol*, **172**(5):2827–2833.

[18] Holdsworth, S. R., Kitching, A. R., & Tipping, P. G. (1999). Th1 and Th2 T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis. *Kidney Int*, **55**(4):1198–1216.

[19] Holzer, J. (2012). *Charakterisierung der T-Zellantwort in der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis der Maus*. Dissertation, Universität Hamburg.

[20] Hopfer, H., Holzer, J., Hünemörder, S., Paust, H.-J., Sachs, M., Meyer-Schwesinger, C., Turner, J.-E., Panzer, U., & Mittrücker, H.-W. (2012). Characterization of the renal $CD4^+$ T-cell response in experimental autoimmune glomerulonephritis. *Kidney Int*, **82**(1):60–71.

[21] Hopfer, H., Maron, R., Butzmann, U., Helmchen, U., Weiner, H. L., & Kalluri, R. (2003). The importance of cell-mediated immunity in the course and severity of autoimmune anti-glomerular basement membrane disease in mice. *FASEB J*, **17**(8):860–868.

[22] Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Cerretti, D. P., Urdal, D. L., & Conlon, P. J. (1988). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Biotechnology*, **6**(1205):5.

[23] Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R. M., & Aguet, M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*, **259**(5102):1742–1745.

[24] Hudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., & Neilson, E. G. (2003). Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med*, **348**(25):2543–2556.

[25] Kalluri, R., Danoff, T. M., Okada, H., & Neilson, E. G. (1997). 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*, **100**(9):2263–2275.

[26] Kelchtermans, H., Billiau, A., & Matthys, P. (2008). How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol*, **29**(10):479–486.

[27] Kitching, A. R. & Holdsworth, S. R. (2011). The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury. *J Am Soc Nephrol*, **22**(2):235–238.

[28] Kitching, A. R., Holdsworth, S. R., & Tipping, P. G. (1999). IFN-gamma mediates crescent formation and cell-mediated immune injury in murine glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, **10**(4):752–759.

[29] Kitching, A. R., Turner, A. L., Semple, T., Li, M., Edgtton, K. L., Wilson, G. R., Timoshanko, J. R., Hudson, B. G., & Holdsworth, S. R. (2004). Experimental autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis: a protective role for IFN-gamma. *J Am Soc Nephrol*, **15**(7):1764–1774.

[30] Kluth, D. C. & Rees, A. J. (1999). Anti-glomerular basement membrane disease. *J Am Soc Nephrol*, **10**(11):2446–2453.

[31] Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., & Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, **177**(1):566–573.

[32] Kurts, C., Panzer, U., Anders, H.-J., & Rees, A. J. (2013). The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol*, **13**(10):738–753.

[33] Lacotte, S., Brun, S., Muller, S., & Dumortier, H. (2009). CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*, **1173**:310–317.

[34] Lerner, R. A., Glassock, R. J., & Dixon, F. J. (1967). The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. *J Exp Med*, **126**(6):989–1004.

[35] Lowenstein, C. J. & Padalko, E. (2004). iNOS (NOS2) at a glance. *J Cell Sci*, **117**(Pt 14):2865–2867.

[36] Luo, W., Wang, X.-P., Kashtan, C. E., & Borza, D.-B. (2010). Alport alloantibodies but not Goodpasture autoantibodies induce murine glomerulonephritis: protection by quinary crosslinks locking cryptic a3(IV) collagen autoepitopes in vivo. *J Immunol*, **185**(6):3520–3528.

[37] Mei, J., Liu, Y., Dai, N., Hoffmann, C., Hudock, K. M., Zhang, P., Guttentag, S. H., Kolls, J. K., Oliver, P. M., Bushman, F. D., & Worthen, G. S. (2012). Cxcr2 and Cxcl5 regulate the IL-17/G-CSF axis and neutrophil homeostasis in mice. *J Clin Invest*, **122**(3):974–986.

[38] Miner, J. H. (1999). Renal basement membrane components. *Kidney Int*, **56**(6):2016–2024.

[39] Mittrücker, H.-W., Steinhoff, U., Köhler, A., Krause, M., Lazar, D., Mex, P., Miekley, D., & Kaufmann, S. H. E. (2007). Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(30):12434–12439.

[40] Murphy, C. A., Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R. A., Sedgwick, J. D., & Cua, D. J. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*, **198**(12):1951–1957.

[41] Murphy, K. (2011). *Janeway's Immunobiology (Immunobiology: The Immune System (Janeway))*. Garland Science.

[42] Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., & Iwakura, Y. (2002). Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, **17**(3):375–387.

[43] Onishi, R. M. & Gaffen, S. L. (2010). Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, **129**(3):311–321.

[44] Ooi, J. D., Chang, J., O'Sullivan, K. M., Pedchenko, V., Hudson, B. G., Vandenbark, A. A., Fugger, L., Holdsworth, S. R., & Kitching, A. R. (2013). The HLA-DRB1*15:01-Restricted Goodpasture's T Cell Epitope Induces GN. *J Am Soc Nephrol*, **24**(3):419–431.

[45] Ooi, J. D., Kitching, A. R., & Holdsworth, S. R. (2010). Review: T helper 17 cells: their role in glomerulonephritis. *Nephrology (Carlton)*, **15**(5):513–521.

[46] Ooi, J. D., Phoon, R. K. S., Holdsworth, S. R., & Kitching, A. R. (2009). IL-23, not IL-12, directs autoimmunity to the Goodpasture antigen. *J Am Soc Nephrol*, **20**(5):980–989.

[47] Ooi, J. D., Snelgrove, S. L., Engel, D. R., Hochheiser, K., Ludwig-Portugall, I., Nozaki, Y., O'Sullivan, K. M., Hickey, M. J., Holdsworth, S. R., Kurts, C., & Kitching, A. R. (2011). Endogenous foxp3(+) T-regulatory cells suppress anti-glomerular basement membrane nephritis. *Kidney Int*, **79**(9):977–986.

[48] Panzer, U. & Kurts, C. (2010). T cell cross-talk with kidney dendritic cells in glomerulonephritis. *J Mol Med (Berl)*, **88**(1):19–26.

[49] Paust, H.-J., Ostmann, A., Erhardt, A., Turner, J.-E., Velden, J., Mittrücker, H.-W., Sparwasser, T., Panzer, U., & Tiegs, G. (2011). Regulatory T cells control the Th1 immune response in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*, **80**(2):154–164.

[50] Paust, H.-J., Turner, J.-E., Riedel, J.-H., Disteldorf, E., Peters, A., Schmidt, T., Krebs, C., Velden, J., Mittrücker, H.-W., Steinmetz, O. M., Stahl, R. A. K., & Panzer, U. (2012). Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*, **82**(1):72–83.

[51] Paust, H.-J., Turner, J.-E., Steinmetz, O. M., Peters, A., Heymann, F., Hölscher, C., Wolf, G., Kurts, C., Mittrücker, H.-W., Stahl, R. A. K., & Panzer, U. (2009). The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, **20**(5):969–979.

[52] Pedchenko, V., Bondar, O., Fogo, A. B., Vanacore, R., Voziyan, P., Kitching, A. R., Wieslander, J., Kashtan, C., Borza, D.-B., Neilson, E. G., Wilson, C. B., & Hudson, B. G. (2010). Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis. *N Engl J Med*, **363**(4):343–354.

[53] Peto, P. & Salama, A. D. (2011). Update on antiglomerular basement membrane disease. *Curr Opin Rheumatol*, **23**(1):32–37.

[54] Phelps, R. G. & Rees, A. J. (1999). The HLA complex in Goodpasture's disease: a model for analyzing susceptibility to autoimmunity. *Kidney Int*, **56**(5):1638–1653.

[55] Pusey, C. D., Holland, M. J., Cashman, S. J., Sinico, R. A., Lloveras, J. J., Evans, D. J., & Lockwood, C. M. (1991). Experimental autoimmune glomerulonephritis induced by homologous and isologous glomerular basement membrane in Brown-Norway rats. *Nephrol Dial Transplant*, **6**(7):457–465.

[56] Reynolds, J. (2011). Strain differences and the genetic basis of experimental autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Int J Exp Pathol*, **92**(3):211–217.

[57] Reynolds, J., Albouainain, A., Duda, M. A., Evans, D. J., & Pusey, C. D. (2006). Strain susceptibility to active induction and passive transfer of experimental autoimmune glomerulonephritis in the rat. *Nephrol Dial Transplant*, **21**(12):3398–3408.

[58] Reynolds, J., Mavromatidis, K., Cashman, S. J., Evans, D. J., & Pusey, C. D. (1998). Experimental autoimmune glomerulonephritis (EAG) induced by homologous and heterologous glomerular basement membrane in two substrains of Wistar-Kyoto rat. *Nephrol Dial Transplant*, **13**(1):44–52.

[59] Robertson, H., Wheeler, J., & Morley, A. R. (1995). Anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in the mouse: the role of macrophages. *Int J Exp Pathol*, **76**(2):157–162.

[60] Ryan, J. J., Reynolds, J., Norgan, V. A., & Pusey, C. D. (2001). Expression and characterization of recombinant rat alpha 3(IV)NC1 and its use in induction of experimental autoimmune glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*, **16**(2):253–261.

[61] Sado, Y., Boutaud, A., Kagawa, M., Naito, I., Ninomiya, Y., & Hudson, B. G. (1998). Induction of anti-GBM nephritis in rats by recombinant alpha 3(IV)NC1 and alpha 4(IV)NC1 of type IV collagen. *Kidney Int*, **53**(3):664–671.

[62] Sado, Y., Okigaki, T., Takamiya, H., & Seno, S. (1984). 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*, **15**(4):199–204.

[63] Salant, D. J. (2010). Goodpasture's disease–new secrets revealed. *N Engl J Med*, **363**(4):388–391.

[64] Steblay, R. W. (1962). Glomerulonephritis induced in sheep by injections of heterologous glomerular basement membrane and Freund's complete adjuvant. *J Exp Med*, **116**:253–272.

[65] Tam, F. W., Karkar, A. M., Smith, J., Yoshimura, T., Steinkasserer, A., Kurrle, R., Langner, K., & Rees, A. J. (1996). Differential expression of macrophage inflammatory protein-2 and monocyte chemoattractant protein-1 in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int*, **49**(3):715–721.

[66] Tomita, M., Reinhold, M. I., Molkentin, J. D., & Naski, M. C. (2002). Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis. *J Biol Chem*, **277**(44):42214–42218.

[67] Turner, J.-E., Paust, H.-J., Steinmetz, O. M., & Panzer, U. (2010). The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int*, **77**(12):1070–1075.

[68] Vanacore, R., Ham, A.-J. L., Voehler, M., Sanders, C. R., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Sharpless, K. B., Dawson, P. E., & Hudson, B. G. (2009). A sulfilimine bond identified in collagen IV. *Science*, **325**(5945):1230–1234.

[69] Vanacore, R., Pedchenko, V., Bhave, G., & Hudson, B. G. (2011). Sulphilimine cross-links in Goodpasture's disease. *Clin Exp Immunol*, **164 Suppl 1**:4–6.

[70] Vanacore, R. M., Ham, A.-J. L., Cartailler, J.-P., Sundaramoorthy, M., Todd, P., Pedchenko, V., Sado, Y., Borza, D.-B., & Hudson, B. G. (2008). A role for collagen IV cross-links in conferring immune privilege to the Goodpasture autoantigen: structural basis for the crypticity of B cell epitopes. *J Biol Chem*, **283**(33):22737–22748.

[71] Weber, M., Lohse, A. W., Manns, M., Meyer zum Büschenfelde, K. H., & Köhler, H. (1988). IgG subclass distribution of autoantibodies to glomerular basement membrane in Goodpasture's syndrome compared to other autoantibodies. *Nephron*, **49**(1):54–57.

[72] Weiss, A., Wiskocil, R. L., & Stobo, J. D. (1984). The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol*, **133**(1):123–128.

[73] Whiteside, C. I., Cameron, R., Munk, S., & Levy, J. (1993). Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol*, **142**(5):1641–1653.

[74] Wolf, G. (2003). Rasch progrediente Glomerulonephritis: Ein nephrologischer Notfall. *Dtsch Arztebl International*, **100**(33):A–2123–.

[75] Wu, J., Arends, J., Borillo, J., Zhou, C., Merszei, J., McMahon, J., & Lou, Y.-H. (2004). A self T cell epitope induces autoantibody response: mechanism for production of antibodies to diverse glomerular basement membrane antigens. *J Immunol*, **172**(7):4567–4574.

[76] Wu, J., Hicks, J., Borillo, J., Glass, 2nd, W. F., & Lou, Y.-H. (2002). CD4(+) T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis. *J Clin Invest*, **109**(4):517–524.

[77] Zhang, J.-J., Malekpour, M., Luo, W., Ge, L., Olaru, F., Wang, X.-P., Bah, M., Sado, Y., Heidet, L., Kleinau, S., Fogo, A. B., & Borza, D.-B. (2012). Murine membranous nephropathy: immunization with a3(IV) collagen fragment induces subepithelial immune complexes and FcγR-independent nephrotic syndrome. *J Immunol*, **188**(7):3268–3277.

8 Abkürzungen

Aminsäuren und Nukleotide werden nach dem internationalen Einbuchstabencode bzw. Dreibuchstabencode benannt.

AF	Alexa Fluor®
ANCA	*antineutrophil cytoplasmatic antibodies*
anti-GBM GN	anti-glomeruläre Basalmembran Glomerulonephritis
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
α3(IV)NC1	alpha3-Kette des Typ IV Kollagens der Nicht-Kollagen- Domäne 1
BSA	Rinderserumalbumin, engl.: *bovine serum albumin*
BUN	Blut-Harnstoff-Stickstoff, engl.: *blood urea nitrogen*
CD	Nomenklatur für Oberflächenproteine, engl.: *cluster of differentiation*
CXCL	Chemokin (CXC-Motiv) Ligand
Cy	Cyanin
DBA	engl.: *dilute brown non-agouti*
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
EAG	Experimentelle Autoimmune Glomerulonephritis
EBNA	Epstein-Barr nukleäres Antigen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*
FACS	Durchflusszytometrie, engl.: *fluorescence activated cell sorting*
FKS	fötales Kälberserum
Foxp3	*Forkhead-Box-Protein p3*
FSC	Vorwärtsstreulicht, engl.: *forward scatter*
GBM	glomeruläre Basalmembran
GN	Glomerulonephritis
h	human
HEK293-Zellen	humane embryonale Nierenzellen 293, engl.: *human embryonic kidney cells* 293
HLA	humanes Leukozytenantigen, engl.: *human leukocyte antigen*
HRP	Meerrettichperoxidase, engl.: *horseradish peroxidase*
IFA	inkomplettes Freundsches Adjuvans
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

iNOS	induzierbare NO Synthase
KFA	komplettes Freundsches Adjuvans
KO	*knockout*
m	Maus / murin
MHC	Haupthistokompatibilitatskomplex, engl.: *major histocompatibility complex*
NC1	Nicht-Kollagen-Domäne 1
NTN	Nephrotoxische Serumnephritis
p-Wert	Signifikanzwert für statistische Analysen
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*
18 S	Svedberg, Sedimentationskoeffizient
S=N	Sulfilimin-Bindungen
SSC	Seitwärtsstreulicht, engl.: *side scatter*
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung, engl.: *tris buffered saline*
TGF	engl.: *transforming growth factor*
Th	T-Helferzellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	engl.: *tumor necrosis factor-a*
Treg	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
WT	Wildtyp

9 Publikationen

Publikation in Fachzeitschrift

Hopfer H.*, Holzer J.*, Hünemörder S.*, Paust H.-J., Sachs M., Meyer-Schwesinger C., Turner J.-E., Panzer U. & Mittrücker H.-W. (2012). Characterization of the renal $CD4^+$ T-cell response in experimental autoimmune glomerulonephritis. *Kidney Int.* **82**(1): 60-71. * gleicher Beitrag

Kongressbeiträge – Poster

Holzer J., Hünemörder S., Panzer U., Hopfer H. & Mittrücker H.-W. (2010). The function of CD4 lymphocytes in experimental autoimmune glomerulonephritis. 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fur Immunologie (DGfI). Leipzig. *Abstractband.* p. 64.

Holzer J., Hünemörder S., Paust H.-J., Panzer U., Hopfer H. & Mittrücker H.-W. (2011). The function of CD4 lymphocytes in experimental autoimmune glomerulonephritis. 3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fur Nephrologie. Berlin.

Hünemörder S., Holzer J., Paust H.-J., Panzer U., Hopfer H. & Mittrücker H.-W. (2011). The function of CD4 lymphocytes in experimental autoimmune glomerulonephritis. 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fur Immunologie (DGfI). Riccione. Publiziert in: *Minerva Medica.* **102 (Suppl.1)**: 83.

Hünemörder S., Holzer J., Paust H.-J., Panzer U., Hopfer H. & Mittrücker H.-W. (2012). Characterization of the renal CD4(+) T-cell response in experimental autoimmune glomerulonephritis. European Congress of Immunology. Glasgow, UK. Publiziert in: *Immunology* 2012; **137(Suppl.1**):384

Hünemörder S., Holzer J., Paust H.-J., Panzer U., Hopfer H. & Mittrücker H.-W. (2012). Charakterisierung der renalen CD4+ T-Zellantwort in der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis. 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fur Nephrologie. Hamburg.

Hünemörder S., Holzer J., Ahrens S., Panzer U., Hopfer H. & Mittrücker H.-W. (2013). The role of different CD4 T-cell subsets in Experimental Autoimmune Glomerulonephritis. 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fur Immunologie (DGfI). 2013, Mainz. *Abstractband.* p. 59.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Hans-Willi Mittrücker danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation am Institut für Immunologie anfertigen zu können. Vielen herzlichen Dank für die intensive und sehr gute Betreuung, die stets offene Bürotür, ein sehr angenehmes Arbeitsklima, die anregenden Gespräche und die Korrektur meiner Arbeit.

Professor Dr. Thomas Dobner danke ich für die Betreuung der Arbeit als Zweitgutachter.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Helmut Hopfer für die freundliche Kooperation und die Bereitstellung von Daten und Fotos aus histologischen und immunologischen Untersuchungen.

Diese Arbeit wurde im Rahmen der DfG-geförderten Klinischen Forschergruppe KFO228 „Immunpathogenesis and Therapy of Glomerulonephritis“ angefertigt. Die finanzielle Unterstützung ermöglichte mir die Durchführung des Projektes und die Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen im Bereich Immunologie und Nephrologie.

Danke auch an das nephrologische Labor um Prof. Dr. Ulf Panzer, insbesondere Dr. Hans-Joachim Paust, Sabrina Bennstein und Anett Peters für die gute Kooperation und viele technische Hilfestellungen. Für die Hilfe bei der Paraffineinbettung der Organe und bei der Durchführung von immunhistochemischen Färbungen danke ich Mariola Reszka und Dr. Catherine Meyer-Schwesinger.

Frau Dr. Julia Holzer danke ich für die Zusammenarbeit, die Einarbeitung in viele Methoden und besonders zum Ende hin für ihre Unterstützung und gute Gespräche.

Die Mitarbeiter in meiner Arbeitsgruppe haben ein besonders großes Dankeschön verdient. Valéa danke ich für die Genotypisierung der verwendeten Mäuse und die sehr gute Betreuung im Labor sowie die Hilfe bei administrativen Aufgaben. Kira, Friederike, Judith und Isabell haben durch Hilfsbereitschaft und Kollegialität immer für ein gutes Arbeitsklima gesorgt. Timo danke ich für viel Ernst bei und viel Quatsch nach der Arbeit. Gudrun und Marion danke ich für die technische Hilfe. Philine, Anne, Björn und dem gesamten Institut für Immunologie danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre, die freundliche Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen und die vielen nette Aktivitäten außerhalb des Labors.

Ich danke meiner Freundin Kathrin Kuhlmann für das Korrekturlesen der Arbeit, aber vor allem für viele tolle Gespräche und Einschätzungen von externer aber nicht fachfremder Seite.

Mein Studium wäre ohne die stetige Unterstützung meiner Eltern und Großeltern nicht möglich gewesen. Auch während der Doktorarbeit haben sie mich immer bestärkt und wo möglich Hilfe angeboten. Vielen Dank dafür!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken für regen Zuspruch, die nötige Ablenkung zwischendurch und das Verständnis für meine teilweise ungewöhnlichen Arbeitszeiten.

Korrekturen

Abweichend vom Prüfungsexemplar wurden folgende Korrekturen in dieser Arbeit vorgenommen:

Deckblatt	Entfernen des Zusatztes „Erstellt im Teilprojekt 3 der Klinischen Forschergruppe KFO 228 am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf“ sowie des Logos
S. 31	Korrektur des Hinweises auf Abb. 12 alt: „In Abbildung 12 sind exemplarisch Fotos von Schnitten einer schwer geschädigten Niere mit deutlicher Halbmondbildung (A) und Läsionen im Interstitium (C) dargestellt.“ korrigiert: „In Abbildung 12 sind exemplarisch Fotos von Schnitten eines gesunden Kontroll-Glomerulus (A) und eines schwer geschädigten Glomerulus mit deutlicher Halbmondbildung (B) dargestellt.“
S. 47	Korrektur Anordnung der Bilder: Vertauschen der Bilder „DBA/1J Kontrolle“ und „DB1-IFNgRKO Kontrolle“.
S.78	Einfügen des akademischen Titels bei Dr. Catherine Meyer-Schwesinger