

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Innere Medizin  
III. Medizinische Klinik und Poliklinik  
Nephrologie

Prof. Dr. med Tobias Huber

**Die Rolle von IL-17 und ROR $\gamma$ t auf die glomeruläre Filtrationsrate  
bei experimenteller Glomerulonephritis**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:

Paula-Sophie Steffens  
aus Kiel

Hamburg 2023

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

**20.12.2023**

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

**Prof.Dr.Catherine  
Meyer-Schwesinger**

Prüfungsausschuss, 2.Gutachter/in:

**Prof. Dr. Ulrich Wenzel**

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung:.....	5
1.1 Die Niere:.....	5
1.2 Glomerulonephritis: .....	6
1.3 TH17 Zellen .....	8
1.3.1 TH17 Zellen und Autoimmunität: .....	10
1.3.2 TH17 Zellen und Glomerulonephritis .....	11
1.3.3 TH17 und regulatorische T Zellen.....	12
1.4 Arbeitshypothese: .....	14
2. Methoden:.....	15
2.1 Versuchstiere:.....	15
2.2 Tierexperimentelle Methoden: .....	16
2.2.1 Nephrotoxische Nephritis:.....	16
2.2.2 Organentnahme: .....	17
2.2.3 Einbetten der Mausnieren:.....	17
2.2.4 Stoffwechselkäfig:.....	17
2.2.5 GFR-Messung:.....	18
2.3 Proteinbiochemische Methoden:.....	20
2.3.1 Messung der Albuminurie: .....	20
2.3.2 Kreatinin-Bestimmung.....	21
2.3.3 Untersuchung des Plasmas:.....	21
2.4 Histopathologische Analyse: .....	22
2.5 Molekularbiologische Methoden: .....	23
2.5.1 Einzelzellsuspension: .....	23
2.5.2 Färbung:.....	23
2.5.3 Gating Strategie: .....	24
2.5.4 RNA-Isolation und cDNA-Synthese:.....	26
2.5.5 Quantitative Real-Time PCR: .....	26
2.6 Statistische Analyse: .....	27
3. Ergebnisse:.....	28
3.1 CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Knockout führt zum kompletten Fehlen von TH17 Zellen sowie der biTregs .....	28
3.2 Nephrotoxische Nephritis führt zu Einschränkung der Nierenfunktion.....	30
3.3 CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse weisen einen deutlich stärkeren Nierenschaden in der Histologie auf.....	33

3.4 Nephrotoxische Nephritis führt zu Expression proinflammatorischer Zytokine: .....	38
3.5 CD4-Cre RORyt <sup>fl/fl</sup> Mäusen zeigen eine erhöhte Anzahl an GammaDelta Zellen:	40
4. Diskussion: .....	43
5. Zusammenfassung .....	49
6. Summary .....	50
7. Erklärung des Eigenanteils.....	51
8. Abkürzungsverzeichnis: .....	52
9. Literaturverzeichnis: .....	53
10. Abbildungsverzeichnis: .....	59
11. Danksagung: .....	60
12. Publikationen .....	61
13. Lebenslauf.....	61
14. Eidesstattliche Erklärung: .....	61

# 1. Einleitung:

## 1.1 Die Niere:

Die Niere ist ein paarig angelegtes, beim Menschen etwa 10 cm langes Organ. Sie erfüllt mehrere wichtige Funktionen, unter anderem die Überwachung und Aufrechterhaltung des Wasser- und Salzhaushaltes sowie auch des Säure-Basen Haushalts. Über eine Regulation dieser Kreisläufe wird auch eine Kontrolle des Blutdruckes erreicht. Eine weitere wichtige Funktion ist die Elimination von körpereigenen Stoffen, wie zum Beispiel Endprodukten des Stickstoffstoffwechsels, sowie körperfremden toxischen Stoffen, wie Medikamenten, über den Urin (Welsch et al., 2018). Die spezifische Einheit der Niere ist das Nephron. Es setzt sich aus zwei Teilen zusammen: Dem Nierenkörperchen, welches aus dem Glomerulum sowie der Bowman-Kapsel besteht, und den Tubuli, die sich aus der Rinde bis ins Nierenmark fortsetzen. Im Alter von 20-30 Jahren finden sich in der Niere ca. 2 Millionen intakte Glomeruli, bis zum 70. Lebensjahr sinkt die Anzahl der funktionstüchtigen Glomeruli auf die Hälfte (Silbernagl, 2019). In den Kapillaren eines Glomerulus herrscht ein, für kapilläre Verhältnisse, hoher Blutdruck (55 mmHg), sodass Primärharn in großer Menge aus dem Blut filtriert („abgepresst“) wird. Filtriert wird der Primärharn über die sogenannte Blut-Harn-Schranke, welche sich aus dem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran sowie den Podozyten und ihrer Schlitzmembran zusammensetzt. Dabei spielen sowohl die Größe als auch die Ladung der Moleküle eine Rolle. Das primäre Ultrafiltrat gelangt anschließend in das Tubulussystem, wo der Urin durch Sekretions- und Reabsorptionsprozesse konzentriert wird. Die pro Zeiteinheit durch die Gesamtheit aller Glomeruli filtrierte Menge, die sogenannte glomeruläre Filtrationsrate (GFR), beträgt rund 180 l pro Tag. Sie ist vor allem von dem Filtrationsdruck sowie der Filtrationsfläche abhängig und wird beim Menschen vorrangig über eine Änderung des hydrostatischen Drucks im Kapillarbett reguliert. Die GFR kann indirekt über die Konzentrationsbestimmung harnpflichtiger Substanzen wie zum Beispiel dem Kreatinin bestimmt werden und so zur Bestimmung der Nierenfunktion herangezogen werden. Erkrankungen der Niere werden vor allem gefährlich, wenn die GFR auf sehr niedrige Werte absinkt und so die Funktionen der Niere nicht mehr aufrechterhalten werden können. Unterschieden werden

Erkrankungen des Glomerulus, wie Glomerulonephritiden, und tubulointerstitielle Nierenerkrankungen.

## **1.2 Glomerulonephritis:**

Zusammen mit den Nephropathien durch arteriellen Hypertonus und Diabetes mellitus gehören die Glomerulonephritiden zu den häufigsten Ursachen für Nierenversagen (Chadban and Atkins, 2005). Glomerulonephritis ist ein Sammelbegriff für mehrere immunologische Prozesse, die zu einer nicht-bakteriellen, entzündlichen Zerstörung der Glomeruli und damit zu einer Nierenfunktionseinschränkung führen. Es wird die primäre, auf die Niere begrenzte, Glomerulonephritis von der sekundären Glomerulonephritis unterschieden, bei der es im Rahmen einer Systemerkrankung, wie zum Beispiel Lupus erythematodes, zu der Schädigung an den Glomeruli kommt (Chadban and Atkins, 2005).

Es gibt unterschiedliche Einteilungen der Glomerulonephritis. Zum einen kann man verschiedene Lokalisationen der Schädigung voneinander differenzieren, es können sowohl die Endothelzellen als auch das Mesangium oder die Podozyten betroffen sein (Sethi et al., 2016). Die Ausprägung der Symptome kann sich ebenfalls stark unterscheiden und kann unter anderem eine Hämaturie (blutiger Urin) sowie auch eine Proteinurie (Eiweißausscheidung im Urin) mit folgender Bildung von Ödemen, erhöhten Blutfetten (Hyperlipoproteinämie) oder auch eine Entstehung von erhöhten Blutdruckwerten zeigen. Gemeinsam ist allen Formen der Glomerulonephritis eine Störung der Immunantwort mit Entzündung und Schädigung des Glomerulus und somit der Filtrationsbarriere mit einhergehender Einschränkung der Nierenfunktion (Chadban and Atkins, 2005).

Die Rapid-progressive Glomerulonephritis ist eine sehr schwere Verlaufsform einer Glomerulonephritis, die innerhalb weniger Tage zu einem kompletten Verlust der Nierenfunktion führen kann (Couser, 2012, Kurts et al., 2013). Kennzeichnend für die RPGN ist die Ausbildung sogenannter Halbmonde oder auch Crescents im Glomerulus, die durch eine starke Proliferation des Kapsel epithels entstehen. Auslöser ist eine Inflammation mit Bildung von

Immunkomplexen und Kapillarnekrasen, bis hin zur Ruptur der Basalmembran und nachfolgender Einwanderung von Leukozyten (Kurts et al., 2013). Auch eine Aktivierung des Gerinnungssystems mit Ausbildung von Fibrinansammlungen sowie eine Proliferation von Podozyten spielen bei der Halbmondbildung eine Rolle. Insgesamt wird die massive Schädigung des Glomerulus im Rahmen der rapid progressiven Glomerulonephritis durch eine Kombination von Kapillarschäden, Gerinnungssystem und Aktivierung unterschiedlicher immunologischer Zellen, ausgelöst durch eine starke Inflammationsreaktion, verursacht. Aufgrund von histologischen Markern und Pathomechanismen kann die RPGN in drei Subtypen unterteilt werden.

- 1) Eine seltene, aber sehr schwere Form der RPGN ist die, durch Autoantikörper gegen Kollagen Typ IV der glomerulären Basalmembran ausgelöste, Form. Typischerweise zeigen sich histologisch lineare Ablagerungen der Autoantikörper entlang der Basalmembran. Bei zusätzlicher Beteiligung der Lunge spricht man vom Goodpasture-Syndrom.
- 2) Die zweite Form ist die Immunkomplex-vermittelte Glomerulonephritis. Oft zeigt sich diese Form im Rahmen von Systemerkrankungen wie zum Beispiel Lupus erythematodes oder einer IgA-Nephropathie. Charakteristisch ist die Ablagerung von Immunkomplexen aus IgG und Komplement im granulären Muster an der glomerulären Basalmembran.
- 3) Die dritte und häufigste Form ist die sogenannte Pauci-immune Glomerulonephritis. Sie ist sehr oft mit der Bildung von Antizytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) assoziiert, die gegen Antigene im Zytoplasma von neutrophilen Granulozyten gerichtet sind. Meistens tritt diese Form der RPGN auch im Rahmen von Systemerkrankungen auf, besonders zwei Erkrankungen sind hier hervorzuheben: Die mikroskopische Polyangiitis und die granulomatöse Polyangiitis (Bosch et al., 2006, Kurts et al., 2013, Syed et al., 2015).

Die genauen immunologischen Mechanismen, die der Entstehung einer Rapid-progressiven Glomerulonephritis zugrunde liegen, sind noch nicht im Detail verstanden. Die Therapie besteht aus hochdosierter Immunsuppression, die jedoch wenig zielgerichtet ist und daher mit erheblichen Nebenwirkungen einhergeht. Daher ist es besonders wichtig, genaueres Wissen über den Pathomechanismus zu generieren, um spezifischere Therapien ermöglichen zu können (Kurts et al., 2013).

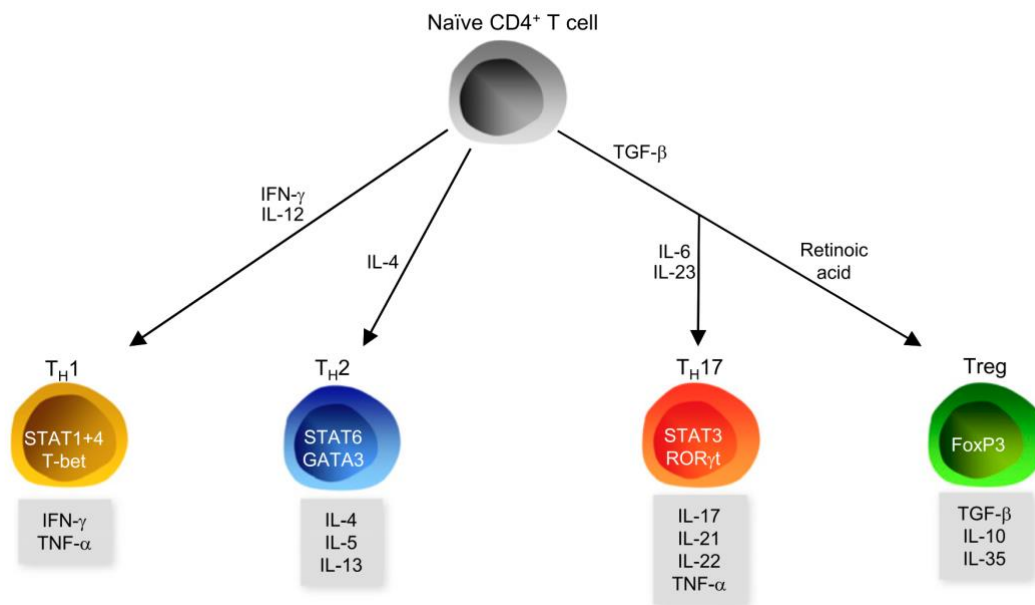
### **1.3 TH17 Zellen**

Die T-Zell vermittelte Immunantwort wurde lange Zeit zwei Zellpopulationen zugesprochen; den TH1 und TH2 Zellen. Diese CD4<sup>+</sup> Zellen differenzieren unter Antigenstimulation in die zwei Untergruppen, welche durch spezifische Zytokinprofile und Effektorfunktionen gekennzeichnet sind. Die TH1 Zellen sind vor allem für die Zell-vermittelte Abwehr von intrazellulären Erregern wie Viren oder Bakterien verantwortlich. Sie produzieren vor allem Interferon gamma (IFN $\gamma$ ). Die TH2 Zellen sind für die humorale Abwehr von extrazellulären Pathogenen wie Parasiten wichtig und kennzeichnen sich durch eine Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13. IL-12 induziert die Differenzierung naiver T-Zellen in TH1 Zellen, wohingegen IL-4 eine TH2-Differenzierung vermittelt (Harrington et al., 2005, Iwakura and Ishigame, 2006). 2005 führten Ergebnisse von Studien an zwei, bisher als TH1-typische Krankheitsmodelle angesehenen, Erkrankungen zu einem Paradigmenwechsel. Sowohl in der Autoimmun-Enzephalitis (EAE) als auch in der Typ II Arthritis zeigte sich die Rolle einer dritten Zellpopulation, IL-17 produzierende CD4-positive T-Zellen, den TH17 Zellen. In beiden Modellen zeigte sich eine Abmilderung der Krankheit durch eine Blockade von IL-23, welches die Produktion von IL-17 Effektorzellen fördert. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Blockade von IL-12 eine Aggravation der Erkrankung. (Langrish et al., 2005, Cua et al., 2003)

TH17 Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t und produzieren die Zytokine der IL-17 Familie. IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin und verstärkt die Reifung von T-Zellen. Außerdem stimuliert IL-17 Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und Epithelzellen zur Produktion von proinflammatorischen Mediatoren. Dazu gehören unter anderem IL-1, IL-6, TNF-



$\alpha$ , NOS-2 Metalloproteasen und Chemokine. Somit sorgen die TH17 Zellen für eine Induktion von Entzündung. (Kolls and Linden, 2004, Nakae et al., 2003). Abbildung 1 veranschaulicht die Polarisation von CD4<sup>+</sup> in die verschiedenen Subtypen.



**Abbildung 1: Polarisation von naiven CD4-positiven T-Zellen.**

TH1 Zellen sind abhängig von IFN $\gamma$  Stimulation und produzieren dieses Zytokin ebenfalls. Für die Differenzierung in TH2 Zellen ist IL-4 relevant. TH17 Zellen entstehen durch Stimulation durch IL-6 und IL-23 (Wenzel et al., 2016).

Initial konnte gezeigt werden, dass eine Produktion von IL-23 für die Differenzierung in TH17 Zellen relevant ist (Aggarwal et al., 2003, Harrington et al., 2005, Langrish et al., 2005). Im Verlauf zeigte sich jedoch, dass die Differenzierung in vitro eine Stimulation des T-Zellrezeptors sowie IL-6 benötigt, jedoch unabhängig von IL-23 ist. Trotzdem scheint IL-23 für die Aufrechterhaltung eines TH17 Phänotyps sowie die Proliferation und das Überleben der Zellen wichtig zu sein (Bettelli et al., 2006).

Der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t ist essenziell für die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu TH17 Zellen. Ivanov et al. zeigten 2006, dass ROR $\gamma$ t von naiven T-Zellen exprimiert wird und nach Stimulation durch IL-6 und TGF- $\beta$  zu einer

Differenzierung zu TH17 Zellen führte. Bei isolierten Zellen von ROR $\gamma$ t Knockout Mäusen zeigte sich eine deutliche Reduktion in der Produktion von TH17 Zellen (Ivanov et al., 2006). ROR $\gamma$ t und somit TH17 Zellen sind wichtig für die mukosale Barriere und finden sich vor allem in der Darmschleimhaut. Die Abwesenheit von TH17 Zellen bei IL-23 defizienten Mäusen führt zu einer schlechteren Abwehr gegen *Citrobacter rodentium* im Darm. Gleichzeitig führt die Anwesenheit dieses Bakteriums zu einer Stimulation der Expansion von TH17 Zellen in der Lamina propria (Mangan et al., 2006). Auch bei der Bekämpfung von pulmonalen Infektionen mit *Klebsiella pneumoniae* spielen IL-17 und IL-23 eine wichtige Rolle (Happel et al., 2005, Ye et al., 2001). Durch Induktion von Chemokin-Expression (unter anderem CXCL5) und G-CSF führen die ROR $\gamma$ t-abhängigen TH17 Zellen zu einer Expansion und Rekrutierung von Neutrophilen, um diese Erreger zu kontrollieren, sobald diese die epitheliale Grenze überschreiten (Ivanov et al., 2006).

### 1.3.1 TH17 Zellen und Autoimmunität:

Seit ihrer Entdeckung und Charakterisierung wurde die Rolle von TH17 Zellen in unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen untersucht (Bedoya et al., 2013). Cua et al. zeigten bereits 2003, dass IL-23 das entscheidende Zytokin im Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalitis ist (Cua et al., 2003). Mit Entdeckung der TH17 Zellen konnte im Verlauf sowohl im Tiermodell als auch in menschlichen Proben die elementare Rolle dieser Zellen in der Pathogenese der autoimmunen Enzephalitis dargestellt werden (Kebir et al., 2007, Tzartos et al., 2008). Auch in der Psoriasis konnten die TH17 Zellen als Hauptakteure identifiziert werden (Di Cesare et al., 2009). Die in der Haut lokalisierten TH17 Zellen regulieren über CCL20 und CCR6 die Population der TH17 Zellen insgesamt und führen so zu einer erhöhten Entzündungsaktivität (Homey et al., 2000). Passend dazu konnten in Psoriasis-Läsionen vermehrt TH17 Zellen sowie erhöhte Konzentrationen von CCL20 und CCR6 im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (Lewis et al., 2013). Mittlerweile sind durch die umfassende Forschung zur Rolle von TH17 Zellen in verschiedenen Autoimmunerkrankungen auch therapeutische Ansätze entwickelt worden. Verschiedene Antikörpertherapien sind sowohl in der Psoriasis-therapie sowie in

der Behandlung von Spondylitis im Einsatz (Baeten et al., 2013, Baeten et al., 2015, Leonardi et al., 2012, Mease et al., 2015).

### 1.3.2 TH17 Zellen und Glomerulonephritis

Beobachtende Studien in Patienten sowie in experimentellen Modellen haben bereits vor 20 Jahren gezeigt, dass in der Entstehung der rapid-progressiven Glomerulonephritis sowohl humorale wie auch zelluläre Mechanismen beteiligt sind und dass die CD4 positive T-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der rapid progressiven Form spielen (Holdsworth et al., 1999). Nach der Entdeckung der TH17 Zellen 2005 wurde ihre Rolle auch in verschiedenen Modellen der Glomerulonephritis untersucht. Zunächst zeigte sich in Modellen autoimmuner Nierenerkrankungen wie zum Beispiel der Anti-Myeloperoxidase Glomerulonephritis (Gan et al., 2010) sowie der ANCA-assoziierten Nephritis eine erhöhte Konzentration an IL-23 und IL-17, die eine Rolle der TH17 Zellen vermuten lässt (Abdulahad et al., 2008, Nogueira et al., 2010). Im Tiermodell der rapid-progressiven Glomerulonephritis, der nephrotoxischen Nephritis (NTN), konnten Paust et al. 2009 die funktionelle Rolle von IL-17A an der Entstehung der renalen Entzündungsmechanismen nachweisen. In der Studie zeigte sich ein deutlich milderer Krankheitsverlauf bei Mäusen mit einer IL-17A oder einer IL-23 Defizienz nach Induktion der nephrotoxischen Nephritis, verdeutlicht durch einen geringeren glomerulären Schaden und eine verbesserte Nierenfunktion (Paust et al., 2009). In Zelltransferversuchen zeigte sich, dass sowohl TH1 als auch TH17 Zellen eine progressive Glomerulonephritis auslösen. In den Glomeruli der Tiere, die TH17 Zellen injiziert bekamen, konnte jedoch eine höhere Anzahl von neutrophilen Granulozyten sowie von CXCL1 nachgewiesen werden (Summers et al., 2009). Nicht nur die Rolle des Effektorzytokins IL-17 sondern auch die Rolle des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t wurde untersucht. Steinmetz et al. zeigten, dass ein ROR $\gamma$ t-Knockout bei Mäusen ebenfalls zu einem deutlich abgemilderten Verlauf der experimentellen rapid progressiven Glomerulonephritis führt (Steinmetz et al., 2011).

Doch nicht nur TH17 Zellen produzieren IL-17. Auch andere Zellen des Immunsystems wie  $\gamma\delta$ -T-Zellen, natürliche Killerzellen, LTi Zellen (lymphoid tissue inducer cells) und auch myeloide Zellen wie neutrophile Granulozyten können IL-17 produzieren (Cua and Tato, 2010). Besonders für die  $\gamma\delta$ -T-Zellen konnte auch eine wichtige Rolle in der Entzündungsinduktion im Modell der experimentellen Glomerulonephritis gezeigt werden. Vor allem in der Anfangsphase der Entzündungsreaktion sind diese Zellen die Hauptproduzenten von IL-17 und tragen somit zu großen Teilen zur Induktion der Inflammation bei (Turner et al., 2012).

Welche Rolle die TH17 Zellen allein in der Entwicklung der experimentellen Glomerulonephritis spielen und was ein spezifischer Knockout dieser Zellen bewirkt, ist Gegenstand dieser Arbeit.

### 1.3.3 TH17 und regulatorische T Zellen

Regulatorische T-Zellen sind lange Zeit vor allem über den gemeinsamen Transkriptionsfaktor FOXP3 charakterisiert worden. In verschiedenen Studien gab es dann jedoch vermehrt Hinweise darauf, dass es viele verschiedene Subtypen von regulatorischen T-Zellen gibt, die neben FOXP3 andere Transkriptionsfaktoren exprimieren (Feuerer et al., 2009). Mehr noch zeigte sich, dass die regulatorischen T-Zellen einen spezifischen Gegenpart zu den Effektor-T-Zellen bilden und sogar dieselben Transkriptionsfaktoren exprimieren. So lassen sich beispielsweise die Treg1 Zellen mit einer Expression von FOXP3 und Tbet von den Treg17 Zellen unterscheiden, die neben FOXP3 auch STAT3 exprimieren (Kluger et al., 2016). Im Verlauf zeigte sich jedoch, dass nicht nur STAT3 von Tregs exprimiert wird, sondern auch der TH17-spezifische Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t (Lochner et al., 2008). Diese Zellen, auch biTregs genannt, produzieren in vitro das antiinflammatorische Zytokin IL-10. Zusätzlich konnte aber auch gezeigt werden, dass bei einer induzierten Pilzinfektion auch proinflammatorische Zytokine wie IL-17 produziert werden (Osorio et al., 2008). Die Präsenz der biTregs konnte für mehrere autoinflammatorische Erkrankungen gezeigt werden, unter anderem Colitis ulcerosa (Hovhannisyan et al., 2011), Psoriasis (Bovenschen et al., 2011) und Arthritis (Pesenacker and Wedderburn,

2013). Auch in der Glomerulonephritis zeigte sich eine wichtige Rolle für die biTregs. Ein Transfer von biTregs führte zu einer signifikant niedrigeren Schädigung im Modell der nephrotoxischen Nephritis. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die IL-17 Produktion durch die biTregs abhängig von der RORyt Expression war. Ein Ausknocken von RORyt in den biTregs führte ebenfalls zu einem milderem Krankheitsverlauf (Kluger et.al 2016).

## **1.4 Arbeitshypothese:**

Das Zytokin IL-17 spielt eine wichtige Rolle bei autoimmunen Nierenerkrankungen. ROR $\gamma$ t ist der definierende Transkriptionsfaktor in CD4 positiven T-Zellen zur Entwicklung von TH17 Zellen. Die selektive Bedeutung der TH17 Zellen in Bezug auf die Pathogenese der autoimmunen Glomerulonephritis wurde bislang nur unzureichend untersucht. Daher führten wir die Versuche mit einem selektiven Knockout von ROR $\gamma$ t in CD4-positiven Zellen durch. Um den Einfluss von ROR $\gamma$ t und IL-17 auf die glomeruläre Filtrationsrate und die autoimmune Glomerulonephritis zu untersuchen, etablierten wir zunächst die wiederholte transkutane Messung der GFR am wachen Tier durch Bestimmung der Eliminationskinetik eines Fluoreszenz-markierten Sinistrins in unserem Labor. Anschließend induzierten wir das Tiermodell einer autoimmunen Glomerulonephritis, der sogenannten nephrotoxischen Nephritis, in CD4-Cre und CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäusen.

Unsere Arbeitshypothese lautete, dass ein selektiver Knockout von ROR $\gamma$ t in CD4 positiven T-Zellen sich protektiv auf den Verlauf der nephrotoxischen Nephritis auswirkt und eine Abschwächung des Verlaufs der Nephritis zu einer verbesserten GFR führt.

## 2. Methoden:

### 2.1 Versuchstiere:

Für die Versuche verwendeten wir, zu Beginn der Versuche 8-10 Wochen alte, CD4-Cre bzw. CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse auf C57black6 Hintergrund. Cre wurde bei allen Tieren heterozygot exprimiert. Die Haltung erfolgte in Standardkäfigen (Typ II long) in Gruppen von ein bis sechs Tieren mit dauerhaftem Zugang zu Wasser und Futter. Drei bis viermal in der Woche erfolgte ein Käfigwechsel. In den Käfigen befand sich Einstreu auf Holzbasis und Zellstoff als Nestmaterial. Durch einen im gesamten Tierstall herrschenden Tages und Nachtzyklus wurde die zirkadiane Rhythmik der Tiere gewährleistet. Von 5-17 Uhr wurde der Tag definiert, von 17-5 Uhr die Nacht durch Dunkelheit bzw. Rotlicht. Die Temperatur lag zwischen 20° und 24°, die Luftfeuchtigkeit bei 50-60 %. Es erfolgte eine regelmäßige Kontrolle des Gesundheitszustands der Tiere durch Beurteilung von Aussehen, Aktivität und Gewicht. Für die beschriebenen Versuche wurden drei Versuchstiergruppen verglichen. Gesunde CD4-Cre Kontrollmäuse. CD4-Cre Mäuse mit nephrotoxischer Nephritis und CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse mit nephrotoxischer Nephritis. Tabelle 1 zeigt die Anzahl der einzelnen Versuchstiere pro Gruppe.

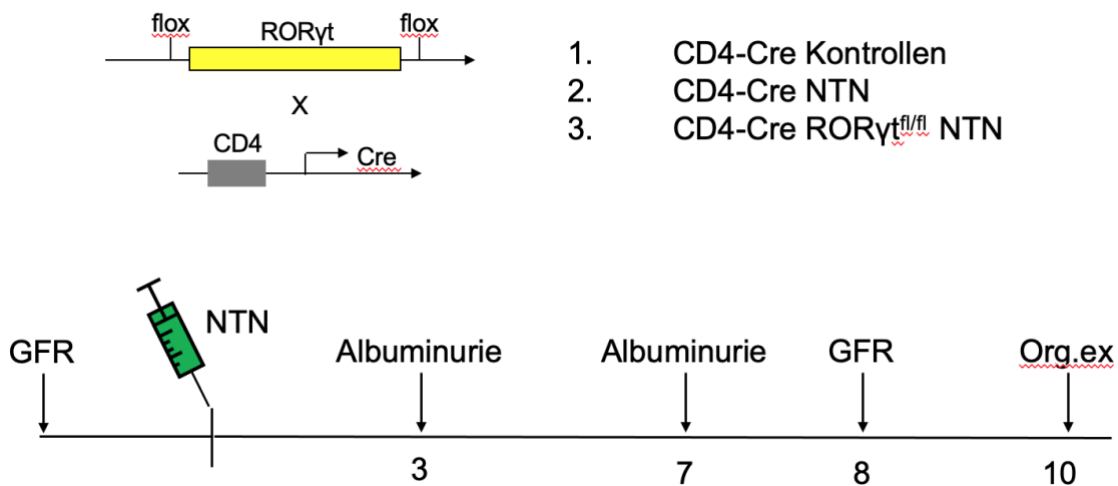
	CD4-Cre Kontrolle	CD4-Cre NTN	CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> NTN
Anzahl	12	20	29

**Tabelle 1: Anzahl der Versuchstiere in den einzelnen Versuchsgruppen**

## 2.2 Tierexperimentelle Methoden:

### 2.2.1 Nephrotoxische Nephritis:

Als experimentelles Modell der autoimmunen Glomerulonephritis wurde die nephrotoxische Nephritis genutzt. Abbildung 2 stellt den Versuchsaufbau dar. Die Nephrotoxische Nephritis wurde bei den Mäusen im Alter von 8-10 Wochen induziert. Das NTN-Serum wurde gewichtsadaptiert intraperitoneal injiziert, im Mittel etwa 300  $\mu$ l. Die Injektion wurde unter Isofluran Narkose vorgenommen. Anschließend wurden die Mäuse für einen Tag auf eine Wärmeplatte gestellt und erhielten Weichfutter. Es erfolgte eine engmaschige Kontrolle des Aussehens und der Aktivität. Die Entwicklung einer Proteinurie wurde an Tag 3 und Tag 7 mit Urinteststreifen sowie der Messung von Albumin und Kreatinin analysiert. Die Nierenfunktionseinschränkung wurde außerdem durch die Testung der glomerulären Filtrationsrate an Tag 2 und Tag 8 untersucht. Nach 10 Tagen wurden die Organe für die Analyse des Endorganschadens entnommen.



**Abbildung 2: Versuchsaufbau Nephrotoxische Nephritis:**

Dargestellt sind der Knockout Mechanismus der CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse (oben) sowie der chronologische Aufbau des Versuches (unten)



### 2.2.2 Organentnahme:

An Tag 10 nach Induktion der nephrotoxischen Nephritis erfolgte die Organentnahme. Zuvor erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch eine tiefe Isofluran-Narkose und nachfolgende cervicale Dislokation. Zunächst wurde durch perkutane Herzpunktion Blut für die nachfolgenden Analysen gewonnen. Anschließend wurde der Bauchraum eröffnet und die Nieren sowie die Milz entfernt. Die Milz wurde in zuvor gekühltem HBSS zwischengelagert. Von den Nieren wurde ein Stück für die PCR-Analyse auf Trockeneis gelagert. Anschließend wurde ein Querschnitt der Nieren in Formaldehyd gelagert. Das restliche Nierengewebe wurde in vorgekühltem HBSS für die Zellisolation gelagert. Zuletzt wurde noch die Tibia der Mäuse vermessen.

### 2.2.3 Einbetten der Mausnieren:

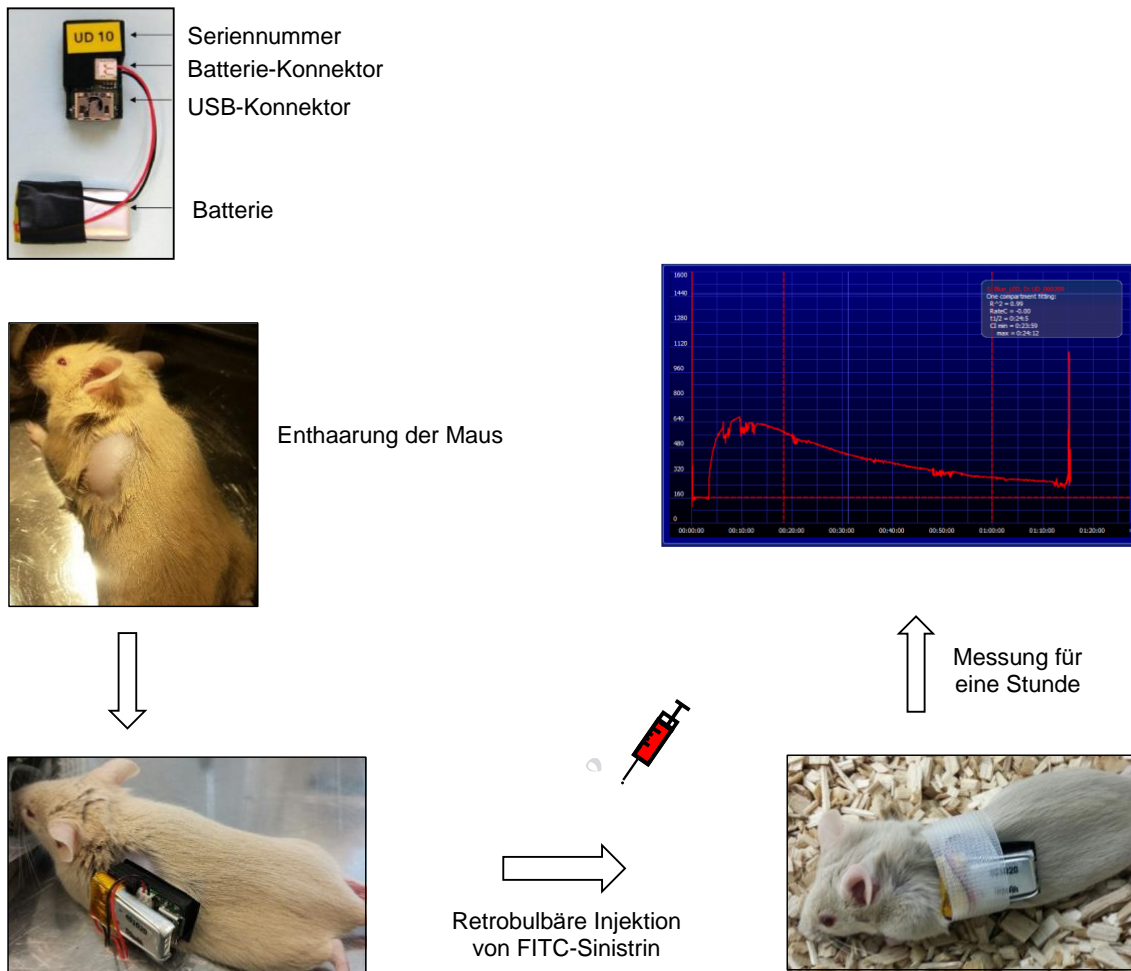
Für die histologische Analyse wurden, wie schon beschrieben, pro Versuchstier ein Nierenschnitt in gekühltem Formaldehyd über Nacht bei 4° gelagert. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte mit PBS gewaschen und anschließend in Paraffin eingebettet.

### 2.2.4 Stoffwechselkäfig:

Für die Gewinnung von Mausurin wurden die Versuchstiere in Stoffwechselkäfige gesetzt. Diese bestanden aus einer Mikrotiter-Testplatte als Boden sowie einem Plastikdeckel. Die Tiere wurden vorher gewogen. Wasser wurde in einigen Wells zu Verfügung gestellt. Die Versuchstiere waren nicht länger als 4 Stunden in dem Stoffwechselkäfig. Der Urin wurde anschließend mit einem Urinteststreifen auf Proteinurie untersucht und zur genaueren Bestimmung Albumin sowie Kreatinin bestimmt.

## 2.2.5 GFR-Messung:

Die Messung der glomerulären Filtrationsrate erfolgte transkutan und an der wachen Maus. Der genaue Ablauf der Messung ist in Abbildung 3 dargestellt.

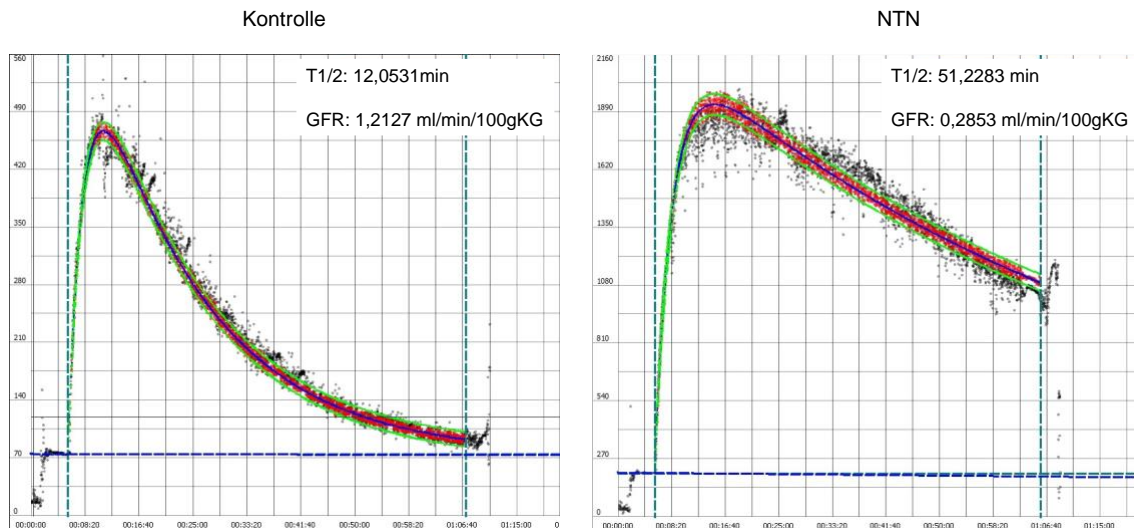


**Abbildung 3: GFR-Messung an der wachen Maus:**

Nach Enthaarung und Applikation des GFR-Senders unter Kurznarkose wird das FITC-Sinistrin retrobulbär appliziert und anschließend eine Stunde an der wachen Maus gemessen. Aus der Abklingkurve der Fluoreszenzintensität kann anschließend die GFR berechnet werden (Quelle: Eigene Darstellung).

Die Methode basiert auf der Verwendung von FITC-Sinistrin, einem fluoreszierenden Farbstoff, der ausschließlich renal ausgeschieden wird. Mittels eines kleinen Senders auf dem Rücken der Maus, der konstant die Konzentration des FITC-Sinistrins im Blut misst, kann eine Kurve der Ausscheidungskinetik bestimmt werden. Aus dieser kann anschließend mit der MPDIab Software die GFR berechnet werden. Das FITC-Sinistrin wird zunächst in Natriumchlorid

gelöst und bei  $-30^{\circ}$  gelagert. Einen Tag vor der geplanten GFR-Messung werden die Mäuse unter Isoflurannarkose an einer Seite des Rückens enthaart, dort wird bei der Messung der Sender platziert. Wir nutzten für die Enthaarung der Mäuse einen Rasierer sowie Enthaarungscreme. Am Tag der Messung wurden Einzelkäfige für die Zeit der Messung vorbereitet. Die Mäuse wurden in kurze Isoflurannarkose gelegt. Nun wurde der Sender mit einer doppelseitig klebenden Folie auf die rasierte Stelle geklebt, die Batterie angeschlossen und der Sender zusätzlich auch von außen mit einem Klebeband fixiert. Das bereits auf Raumtemperatur aufgetaute FITC-Sinistrin wurde noch einmal gemischt und gewichtsadaptiert mit einer Dosis von  $0,15 \text{ mg/g}$  intravenös injiziert. Wir nutzten für die Injektion den retroorbitalen Venenplexus. Nach einer Basismessung von  $1 \text{ min}$  wurde die Narkose gestoppt und die Maus in den Käfig mit Zugang zu Wasser und Futter gesetzt. Nach einer Stunde wurden die Sender in einer weiteren Kurznarkose abgenommen. Nun konnte der Sender an den Computer angeschlossen werden und die Daten aus dem internen Speicher des Senders mit dem Programm MPDlab ausgewertet werden. Über die Eliminationskurve war es nun möglich, die GFR zu berechnen. Abbildung 4 zeigt beispielhafte Rohdaten der GFR-Messung einer Kontroll-Maus sowie einer Maus mit NTN. Aus der Zeitdifferenz zwischen Zeitpunkt 1 ( $0 \text{ min}$ ) und Zeitpunkt  $t_2$  ( $60 \text{ min}$ ) lässt sich die GFR berechnen. Diese Methode der GFR-Messung erlaubt eine sehr genaue Messung der Nierenfunktion am wachen Tier, welche auch wiederholt durchgeführt werden kann (Schreiber et al., 2012)



#### Abbildung 4: GFR-Messung an der wachen Maus:

Die Rohdaten aus der einstündlichen Messung werden in der MPD Lab Software ausgewertet. Aus der Zeitdifferenz zwischen Zeitpunkt 1 (0 min) und Zeitpunkt t2 (60 min) lässt sich die GFR berechnen. Beispielhaft sind hier eine Kontrolle mit einer normalen GFR sowie eine Maus mit NTN und einer deutlich reduzierten GFR zu sehen.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden:

### 2.3.1 Messung der Albuminurie:

Die Konzentration von Albumin im Urin wurde mittels eines ELISA bestimmt. Dafür wurde das ELISA Mouse Quantitation Kit verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurde eine 96-Well Mikrotiter Platte mit anti-Mausalbumin- Primärantikörper beschichtet und über Nacht bei 4° inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das dreimalige Auswaschen des Antikörpers mit Washing Diluent sowie anschließend die Inkubation mit Blocking Puffer für 30 min bei Raumtemperatur. 9 µl des Urins wurden auf das Proteinfeld eines Urinteststreifen pipettiert, und anhand der Stärke die Verdünnung bestimmt.

Folgende Verdünnungen wurden verwendet:

- 0: 1:500
- +: 1:5000
- ++: 1:20.000
- +++: 1:50.000
- ++++: 1:100.000

Die Standardreihe bestand aus Konzentrationen von 15,625 bis 10.000 ng/ml. Nachdem die Platte noch einmal gewaschen wurde, erfolgte das Pipettieren von je 100 µl Probe bzw. Standard pro Well und die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Es folgten wiederholte Waschungen der Platte (insgesamt 5-mal) und anschließend die Inkubation mit Meerrettich gekoppeltem Antikörper bei Raumtemperatur. Nach erneutem wiederholtem Waschen wurde Tetramethylbenzidin im Dunkeln hinzugefügt und für 7 min inkubiert. Nach dem Abstoppen mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung wurde die Extinktion am ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Für die Analyse der Albuminurie wurde der Albumin/Kreatinin Quotient bestimmt.

### 2.3.2 Kreatinin-Bestimmung

Der Urin-Kreatininwert wurde mithilfe eines kinetischen Assays nach der Jaffee Methode bestimmt. Diese Methode basiert auf einer Reaktion von Kreatinin mit Pikrinsäure, wobei sich im alkalischen Milieu ein orange-gelber Farbkomplex bildet. Die Referenz bildete eine Standardreihe mit den Konzentrationen 0,03 – 0,8 g/l. Für die Messung wurde je 10 µl Standard und Urin in Doppelbestimmung auf eine 96-Well Platte pipettiert und 50 µl Reagenz (Alkalischer Puffer NaOH und Pikrinsäure im Verhältnis 5:1) hinzugegeben. Nach einer Minute Inkubation wurde der Farbumschlag am Elisa Reader bei 492 nm gemessen und die Messung nach 5 min wiederholt.

### 2.3.3 Untersuchung des Plasmas:

10 Tage nach Induktion der nephrotoxischen Nephritis erfolgte die Organentnahme der Mäuse. Dabei wurde auch durch eine Herzpunktion in tiefer Isoflurannarkose heparinisiertes Blut entnommen. Daraus wurde Harnstoff bestimmt. Dies wurde durch das Zentrallabor des Instituts für klinische Chemie durchgeführt.

## **2.4. Histopathologische Analyse:**

Nach Entnahme der Organe wurde das Nierengewebe in 4% neutral gepuffertes Formalin gelegt und für 24 Stunden fixiert. Anschließend wurden die Organproben gewaschen, in Paraffin eingebettet und 1 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden deparaffinisiert und gefärbt. Zum einen erfolgte eine PAS-Färbung zur Bestimmung der glomerulären Größe und des glomerulären sowie tubulären Schadens. Zusätzlich erfolgten zellspezifische Färbungen, CD3 für T-Zellen, GR1 für neutrophile Granulozyten und F4/80 für Monozyten und Makrophagen. Der glomeruläre Schaden wurde mit einem Scoring-System unter 200facher Vergrößerung beurteilt. 0 steht in dem Score für keinen Schaden, 1 für einen milden Schaden in einem Drittel des Glomerulums, 2 für eine Schädigung des halben Glomerulums und 3 für ein komplett geschädigtes Glomerulum. Es wurden 30 Glomeruli pro Tier bewertet. Neben der Schädigung wurde auch die Größe der Glomeruli gemessen. Diese wurde computer-assistiert unter der 400fachen Vergrößerung gemessen. Um den spezifischen Schaden im Rahmen der Autoimmunnephritis zu bestimmen, wurden die renalen Halbmonde in den Glomeruli gezählt. Es wurden 30 Glomeruli ausgewertet und die Anzahl der Halbmonde bestimmt. Der tubuläre Schaden wurde ähnlich zu dem glomerulären Schaden durch einen semiquantitativen Score bestimmt. Dabei steht 0 für keinen Schaden, 1 für milden Schaden, 2 für moderate Schädigung und 3 für starke Schädigung. Tubulärer Schaden ist dabei definiert als Erweiterung des Tubuluslumens, Abflachung und Atrophie der Tubuluszellen mit Verbreiterung der Basalmembran und Erweiterung sowie Fibrosierung des Interstitiums. Es wurden unter 200facher Vergrößerung 15 Felder analysiert. Zusätzlich wurde die Infiltration von GR-1<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten, F4/80<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen und CD3<sup>+</sup> T-Zellen durch immunhistologische Färbung bestimmt. Dafür wurden unter 200facher Vergrößerung 30 Felder pro Tier ausgewertet und die Anzahl an Zellen pro Feld bestimmt. Alle histologischen Auswertungen wurden verblindet durchgeführt.

## **2.5 Molekularbiologische Methoden:**

### **2.5.1 Einzelzellsuspension:**

Zur Zellisolierung wurden das entnommene Gewebe von Niere und Milz zerkleinert und in Digestionsmedium (500 ml RPMI, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml Natrium Pyruvat, 10 ml HEPES) überführt. Anschließend wurde das Gewebe mit Kollagenase D und DNase (Roche, Mannheim) für 45 min im Wasserbad (37°) inkubiert und anschließend im GentleMACS (Milteny Biotec, Deutschland) verdaut. Die Suspension wurde danach über ein 70 µm Zellsieb (Falcon, USA) gegeben und mit 10 ml HBSS nachgespült und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Erythrozyten mit Ammonium Chlorid lysiert und die Reaktion nach 5-7 Minuten mit HBSS abgestoppt. Nach Zentrifugation und Abgießen des Überstandes wurde das Pellet erneut resuspendiert und über ein 40 µm Zellsieb gegeben. Danach erfolgte die Überführung in FACS-Tubes.

### **2.5.2 Färbung:**

Vor der Färbung wurden die Zellen für 150 min bei 37° und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank in Stimulationsmedium aus PMA (Sigma) und Ionomycin (Calbiochem) mit X-Vivo und β-Mercaptoethanol und Brefeldin A inkubiert. Nach einem Waschvorgang erfolgte das Überführen in eine 96-Well Platte. Zunächst wurden die Proben zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % Mausserum für 20 min bei 4° inkubiert. Anschließend erfolgte die Oberflächenfärbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern. Für diese Versuchsreihe wurden folgende Antikörper eingesetzt CD45 (30-F11), CD3 (17A2), CD4 (GK1.5), CD8 (53-6.7), γdTCR (GL3), NK1.1 (PK136). Um abgestorbene Zellen auszusortieren, wurde eine LIVE/DEAD Färbung mit Vivid (Invitrogen) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und fixiert, um die nachfolgende intrazelluläre Färbung vorzubereiten (Ebioscience FOXP3 staining kit). Für die intrazelluläre Färbung wurden folgende Antikörper verwendet: FOXP3 (FJK-16S), RORγt (Q31-378), IFNγ (XMG1.2) und IL17A (TC11-18H10.1). Die Proben wurden mit dem Becton&Dickinson LSRII System und mit

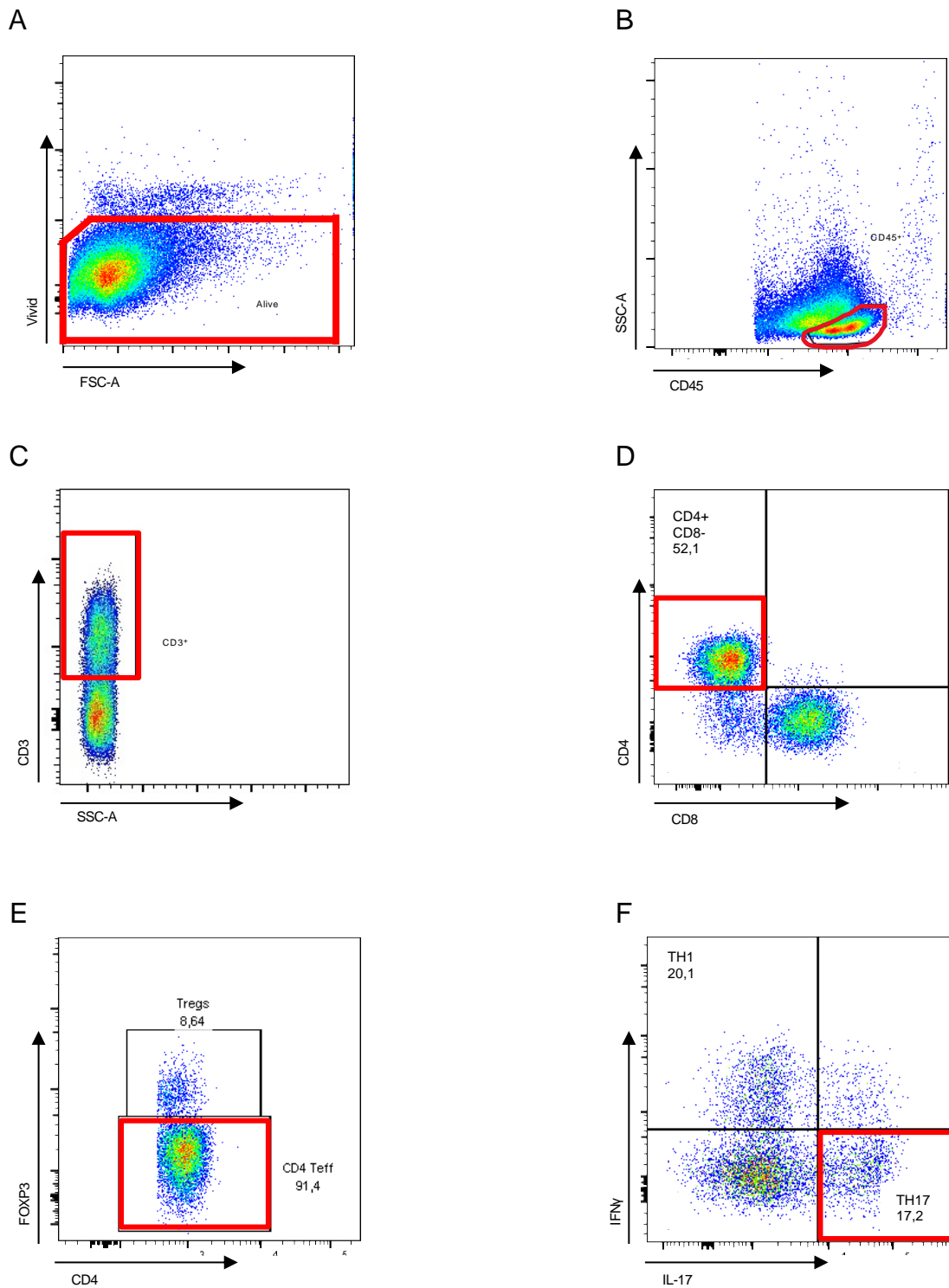
der DIVA-Software gemessen und mithilfe von FlowJo (Tree Star, USA) ausgewertet.

### 2.5.3 Gating Strategie:

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie werden in sogenannten FACS-Plots aufgetragen. Dort werden in einem Plot zwei Eigenschaften gegeneinander aufgetragen. Je nachdem wie die Zellwolken sich in den Plots verteilen, kann man anhand der Intensitäten Grenzwerte bestimmen, die die Zellen als positiv oder negativ für die jeweiligen Eigenschaften einteilen. Der Plot wird somit in Quadranten unterteilt. Die so entstehenden Subgruppen können anschließend in weiteren Plots erneut genauer unterteilt werden. So lassen sich einzelne Zellpopulationen in einer Gesamtprobe untersuchen. Zum Beispiel kann der Anteil der IL-17 produzierenden CD4-positiven Zellen (u.a. TH17 Zellen) an allen Lymphozyten oder an allen T-Zellen bestimmt werden.

Abbildung 5 veranschaulicht die Gating Strategie, die bei unseren Versuchen verwendet wurde. Aus den lebenden Zellen (5A) werden die CD45-positiven Lymphozyten herausgefiltert. (5B) Mithilfe eines Gates für die CD3-positiven Zellen können dann die T-Zellen von anderen Zellen unterschieden werden. (5C) Interessant für unsere Versuche waren dann die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen, wie in Abb. 5D dargestellt. Hieraus kann man dann zum einen durch FOXP3 in regulatorische T-Zellen und T-Effektorzellen einteilen (5E) oder durch IFN $\gamma$  und IL-17 zwischen TH1 und TH17 Zellen unterscheiden.





**Abbildung 5: Gating Strategie**

Aus den lebenden Zellen (A) werden die CD45 positiven Lymphozyten herausgefiltert. (B) Mithilfe eines Gates für die CD3 positiven Zellen können dann die T-Zellen von anderen Zellen unterschieden werden. (C) Interessant für unsere Versuche waren dann die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen, wie in Abb. D dargestellt. Hieraus kann man dann zum einen durch FOXP3 in regulatorische T-Zellen und T-Effektorzellen einteilen (E) oder durch IFN $\gamma$  und IL-17 zwischen TH1 und TH17 Zellen unterscheiden.

#### 2.5.4 RNA-Isolation und cDNA-Synthese:

Um die RNA aus dem Nierengewebe zu isolieren, wurde das NucleoSpin Plus RNA kit (Macherey und Nagel) verwendet und die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Um den Reinheitsgrad der Probe sowie die RNA-Konzentration zu untersuchen, wurden die Proben mit dem NanoDrop analysiert. Für die cDNA-Synthese wurden 200 ng (=2 µl) RNA mit 12,5 µl Mastermix I gemischt und 5 min bei 65° inkubiert. Hierzu wurde dann jeweils 5,5 µl Mastermix II gegeben und dies im Thermocycler inkubiert (10 min 25°, 60 min 42°, 15 min 70°)

#### 2.5.5 Quantitative Real-Time PCR:

Mit der quantitativen Real-Time PCR ist es möglich, in einer Probe indirekt über den cDNA-Gehalt den RNA-Gehalt zu bestimmen und so Rückschlüsse auf die Expression bestimmter Gene zu erhalten. Für die quantitative Real-Time PCR wurde das Applied Biosystems ABI Prism System und das SYBR Green JumpStart taq Ready Mix (Sigma) angewandt. Die Analyse erfolgte in Doppelbestimmung auf 96-Well Platten. Für jeden Ansatz wurden 1,5 µl cDNA mit 11 µl Mastermix vermischt und analysiert. Als Referenzgen wurde 18S mit einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Die Amplifizierung erfolgte mit dem StepOne Real-Time PCR System (95° für 10 min und danach 42 Wiederholungen von 15 Sekunden 95° und 1 Minute 60°). Es wurden mausspezifische Primer verwendet. Die Analyse erfolgte mit der StepOne Software und anschließend mit Microsoft Excel.

## **2.6 Statistische Analyse:**

Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism 7 angefertigt. Zunächst wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test die Gaußsche Normalverteilung untersucht. Bei drei Vergleichsgruppen (Kontrolle, Wildtyp und Knockout) wurde für die Analyse der ungepaarte One-Way Anova verwendet. Bei einer vorliegenden Normalverteilung für alle drei Gruppen benutzten wir für die Überprüfung der Signifikanz den One-Way Anova und die Post-Hoc Analyse nach Newman-Keuls (Korrektur für mehrfache Vergleichstests). Sobald mindestens ein Datenset nicht normalverteilt war, verwendeten wir den nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Test und die Post-Hoc Analyse nach Dunn's. Es wurden anschließend die Mittelwerte der einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Diese wurden mit Standardfehler (SEM) angegeben. In der Graphik wird die Signifikanz mit Sternchen verdeutlicht.

Dabei bedeutet:

\*:  $p < 0,05$

\*\* :  $p < 0,01$

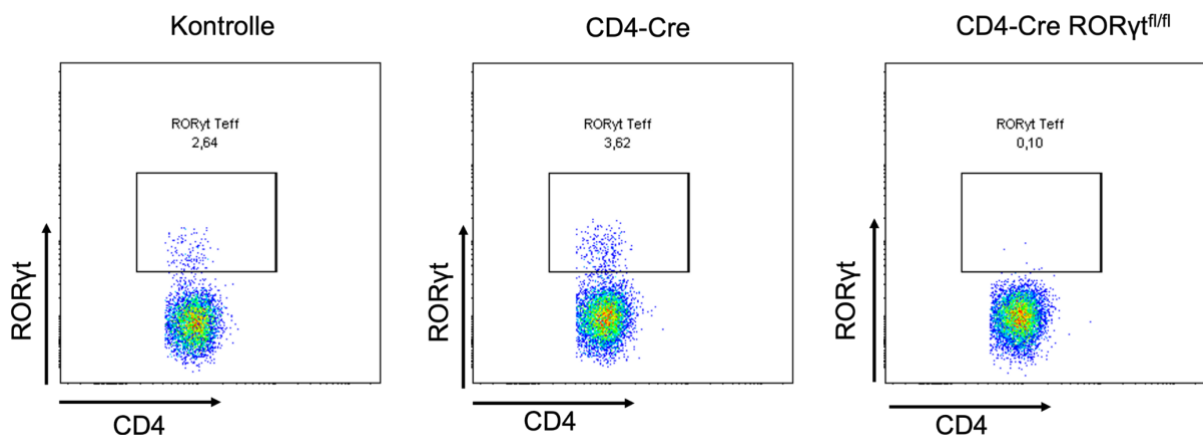
\*\*\*:  $p < 0,001$

\*\*\*\*:  $p < 0,0001$

### 3. Ergebnisse:

#### 3.1 CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Knockout führt zum kompletten Fehlen von TH17 Zellen sowie der biTregs

Zunächst führten wir als Kontrolle des CD4-Cre RORyt Knockouts eine FACS-Analyse durch. Hierbei untersuchten wir die Expression von RORyt in CD4 positiven T-Zellen, wie beispielhaft in Abbildung 6 gezeigt. Im Vergleich zu den CD4-Cre Wildtyp Mäusen (RORyt Teff Zellen etwa  $6 \pm 0,97$  % der CD4 positiven Zellen, n=11) zeigte sich bei den CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Mäusen ein fast komplettes Fehlen der RORyt produzierenden T-Zellen. ( $0,2 \pm 0,04$  % der CD4 positiven Zellen, n=21) wie in Abbildung 7A zu sehen ist. Dadurch konnte der erfolgreiche Knockout nachgewiesen werden. Die Anzahl von CD4-positiven T-Zellen insgesamt war zwischen CD4-Cre und CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Mäusen nicht signifikant unterschiedlich. (siehe Abbildung 7B) Es zeigte sich jedoch eine Steigerung der CD4-positiven RORyt exprimierenden Zellen bei den CD4-Cre Mäusen mit Nephritis im Vergleich zu den CD4-Cre Kontrollen.

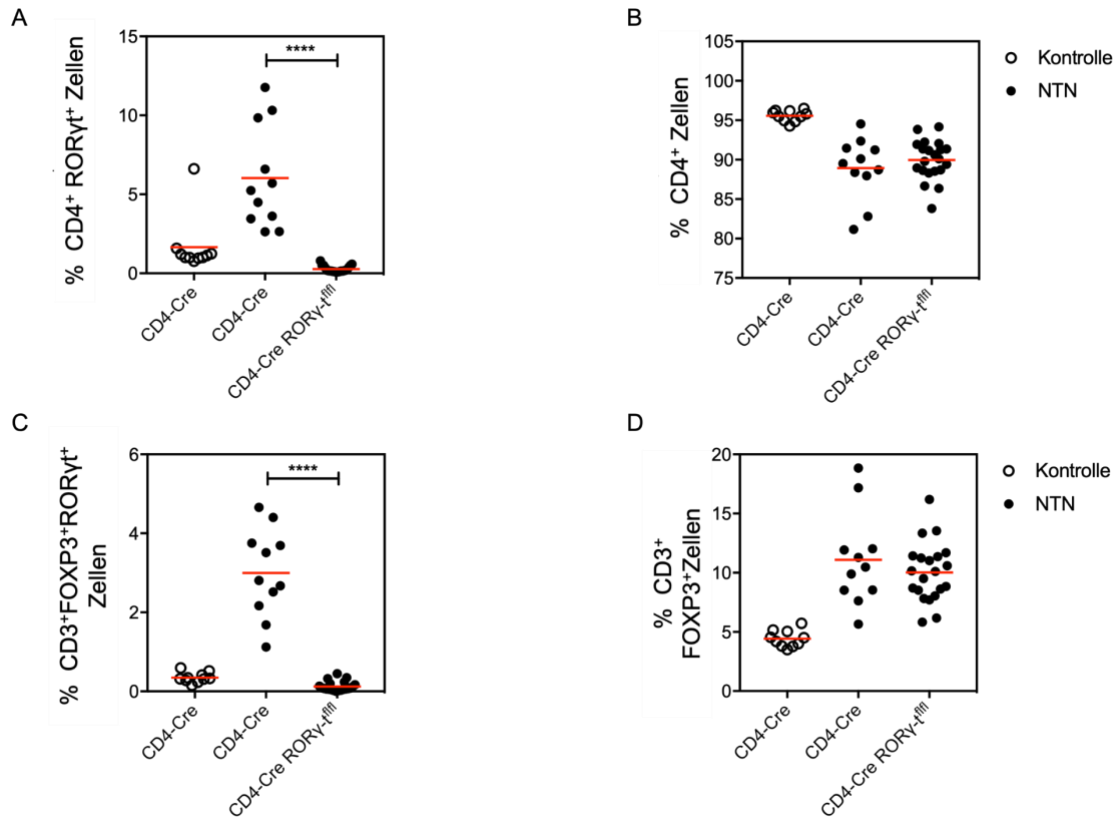


**Abbildung 6: Beispielhafte FACS-Analyse auf CD4<sup>+</sup>RORyt<sup>+</sup> Zellen:**

Dargestellt ist der Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen, die RORyt<sup>+</sup> sind. Bei den CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Mäusen zeigt sich, wie zu erwarten ein komplettes Fehlen der RORyt<sup>+</sup> Zellen mit 0,1 %.

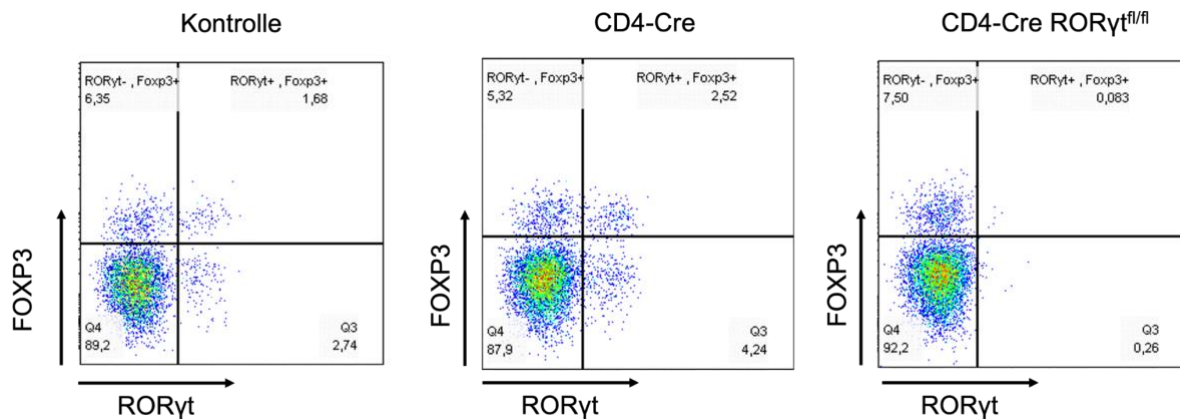
Zusätzlich testeten wir auch die Auswirkungen des Knockouts auf andere CD4 positive Zellgruppen. BiTregs sind eine Untergruppe der regulatorischen T-Zellen und definieren sich über die Koexpression von FOXP3 und RORyt. Abbildung 8 zeigt eine beispielhafte FACS-Analyse der biTregs. Diese doppelt positiven

Tregs waren in der Gruppe der CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse ebenfalls signifikant reduziert ( $0,12 \pm 0,03$  % der CD3<sup>+</sup> Zellen, n=21) im Vergleich zur Gruppe der CD4-Cre Wildtyp Mäuse ( $2,9 \pm 0,33$  % der CD3<sup>+</sup> Zellen, n=11, Abbildung 7C). Auch hier zeigte sich bei der Anzahl der Tregs insgesamt kein Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout Mäusen (siehe Abbildung 7D).



**Abbildung 7: Quantifizierung der FACS-Daten**

In der Gruppe der CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse zeigt sich ein kompletter Knockout der CD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ <sup>t</sup><sup>+</sup> Zellen (A), während die Anzahl der CD4<sup>+</sup>Zellen insgesamt keinen Unterschied zu den CD4-Cre Wildtyp Mäusen ergab. (B). Ebenso führt der Knockout zu einem Fehlen der FOXP3<sup>+</sup> ROR $\gamma$ <sup>t</sup><sup>+</sup> biTregs in der Gruppe der CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse (C) ohne einen signifikanten Unterschied der Tregs (D)

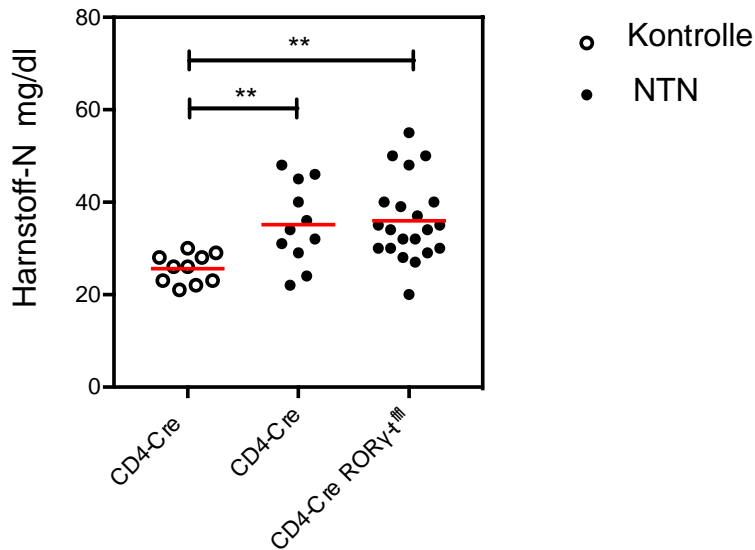


**Abbildung 8: Beispielhafte FACS-Analyse der RORyt-FOXP3 doppelt positiven biTregs:**

Intrazelluläre Färbung von renalen T-Zellen mit FOXP3 und RORyt. Die doppelt positiven biTregs sind im oberen rechten Quadranten abgebildet. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigt sich ein leichter Anstieg der biTregs bei den CD4-Cre Mäusen. In der Gruppe der CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Mäuse lassen sich wie zu erwarten keine biTregs nachweisen

**3.2 Nephrotoxische Nephritis führt zu Einschränkung der Nierenfunktion**

Die Harnstoffkonzentration im Plasma ist ein bisher oft verwendeter Marker für die Nierenfunktion. Daher analysierten wir die Konzentration von Harnstoff-N im Plasma 10 Tage nach Induktion der Nephritis. Dies ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Induktion der Nephritis führte sowohl bei den CD4-Cre als auch den CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der Harnstoffkonzentration im Plasma (CD4-Cre: 35,18 ±2,64 mg/dl, n=11 und CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup>: 35,95 ±1,9 mg/dl, n=21). Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen CD4-Cre Wildtyp und CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Mäusen (siehe Abbildung 9).



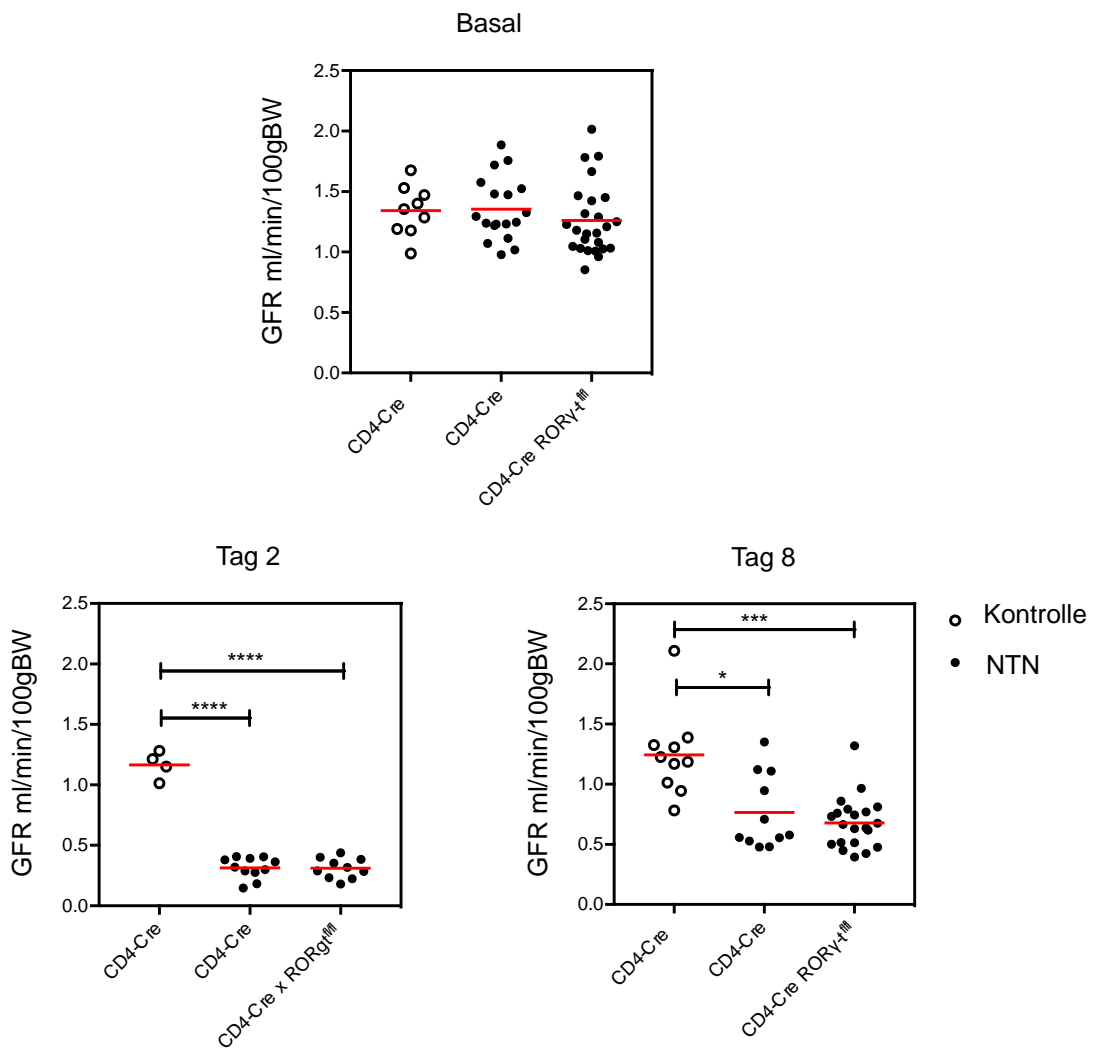
### Abbildung 7: Anstieg der Retentionsparameter unter Nephritis

Im Vergleich zu den Kontrollmäusen zeigen die nephritischen Mäuse einen Anstieg in der Plasmakonzentration von Harnstoff-N. Es zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen CD4-Cre Wildtyp und CD4-Cre RORγt<sup>fl/fl</sup> Mäusen.

Die Bestimmung von Harnstoff-N im Plasma ist jedoch nur eine ungenaue Abbildung der glomerulären Filtrationsrate. Die Plasmaspiegel steigen meist erst ab 50 % Funktionseinschränkung, zusätzlich werden sie durch andere Faktoren wie die Ernährung beeinflusst.

Der Goldstandard, um die Nierenfunktion darzustellen, ist die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (Scarfe et al., 2015). Um die Nierenfunktion genau darstellen zu können, wurde die glomeruläre Filtrationsrate mit einer FITC-Sinistrin basierten Methode gemessen, die wiederholte Messungen an einer wachen Maus ermöglicht. Zuerst führten wir eine basale Messung vor Induktion der Nephritis durch. Wie in Abbildung 10 dargestellt, zeigte sich eine durchschnittliche GFR von 1,3 ml/min/100g Körpergewicht in allen drei Gruppen (CD4-Cre Kontrolle, CD4-Cre Wildtyp, CD4-Cre RORγt<sup>fl/fl</sup>). Die zweite Messung erfolgte zwei Tage nach Induktion der Nephritis. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der GFR auf etwa 23 % der Basalwerte (CD4-Cre: 0,314 ± 0,026 ml/min/100g, n=11 und CD4-Cre RORγt<sup>fl/fl</sup> 0,31 ± 0,027 ml/min/100g, n=10). Die Mäuse der Kontrollgruppe zeigten weiterhin eine GFR bei 1,16 ml/min/100g

Körpergewicht ( $\pm 0,057$  ml/min/100g Körpergewicht, n=4). Ein signifikanter Unterschied zwischen CD4-Cre und CD4-Cre ROR $\gamma^t^{fl/fl}$  Mäusen zeigte sich nicht. Acht Tage nach Nephritis Induktion führten wir die dritte Messung durch. Hier zeigte sich ein leichter Anstieg der GFR auf etwa 50 % (CD4-Cre:  $0,765 \pm 0,09$  ml/min/100g, n=11 und CD4- Cre ROR $\gamma^t^{fl/fl}$   $0,67, \pm 0,046$  ml/min/100g, n=21). Weiterhin konnte kein signifikanter Unterschied zwischen CD4-Cre und CD4-Cre ROR $\gamma^t^{fl/fl}$  Mäusen gezeigt werden.

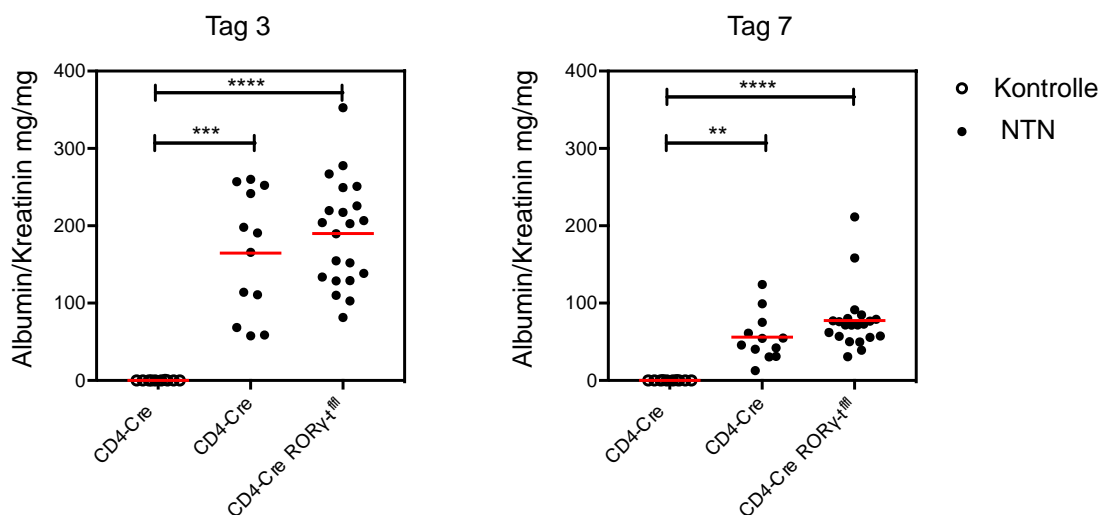


**Abbildung 8: GFR-Messung im Verlauf der Nephritis**

In der basalen Messung zu Beginn des Versuches zeigen alle drei Versuchsgruppen eine ähnliche GFR. An Tag 2 zeigt sich die deutliche Reduktion der GFR durch die Nephritis auf etwa 23 % der Basalwerte. Die GFR steigt an Tag 8 wieder auf etwa 50 % der Basalwerte an. Ein signifikanter Unterschied zwischen CD4-Cre und CD4-Cre ROR $\gamma^t^{fl/fl}$  Mäusen zeigt sich nicht.



Die Albuminurie wurde an Tag 3 und 7 nach Induktion der Nephritis gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 veranschaulicht. Für die genauere Analyse wurde die Albumin/Kreatinin Ratio bestimmt. Drei Tage nach Induktion der Nephritis zeigte sich eine Albumin/Kreatinin Ratio von 164 mg/mg ( $\pm 23,1$  mg/mg, n=12) bei den CD4-Cre Wildtyp Mäusen und 190 mg/mg ( $\pm 14,85$  mg/mg, n=21) bei den CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Mäusen. Diese ging zu Tag 7 leicht zurück und betrug dort im Mittel noch 56 mg/mg ( $\pm 8,96$  mg/mg, n=12) in der CD4-Cre Wildtyp Gruppe sowie 77,5 mg/mg ( $\pm 8,67$  mg/mg, n=21) in der CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Gruppe. Ein signifikanter Unterschied zwischen CD4-Cre Wildtyp und CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Mäusen zeigte sich zu beiden Zeitpunkten nicht.



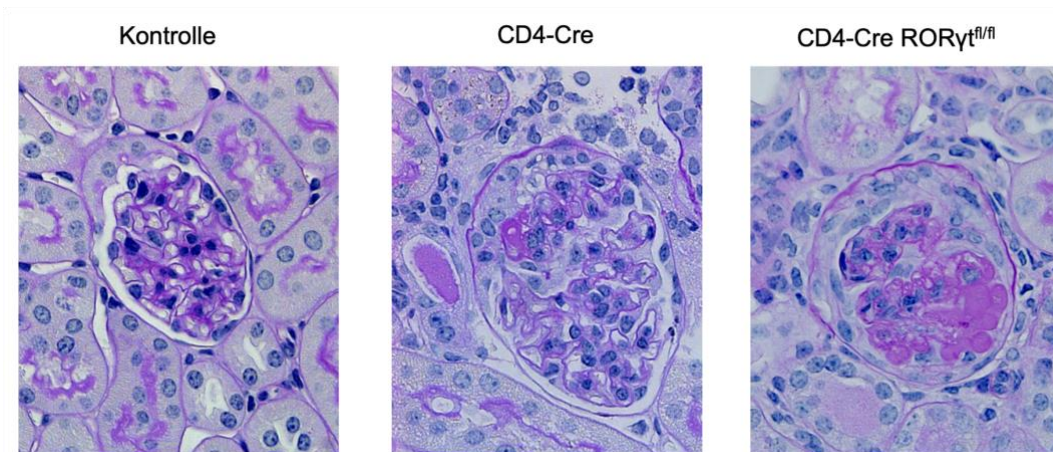
**Abbildung 9: Nephrotoxische Nephritis führt zu signifikantem Anstieg der Albuminurie**

Sowohl 3 Tage nach Induktion der Nephritis als auch 7 Tage danach zeigt sich eine deutliche Albuminurie bei den nephritischen Mäusen, im Vergleich zu den Kontrollen. Ein signifikanter Unterschied zwischen CD4-Cre und CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Mäusen lässt sich aber nicht nachweisen.

### **3.3 CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Mäuse weisen einen deutlich stärkeren Nierenschaden in der Histologie auf**

Um den Effekt des RORyt Knockouts in CD4-positiven Zellen auf den renalen Schaden im Rahmen der Nephritis zu evaluieren, analysierten wir Nierenschnitte 10 Tage nach Induktion der Nephritis. Dafür wurden die Nieren mit der PAS-Färbung gefärbt und die Schädigung mithilfe von semiquantitativen Scores ausgewertet. Die Induktion der nephrotoxischen Nephritis führte sowohl in der

Gruppe der CD4-Cre Mäuse als auch in der Gruppe der CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse zu einem renalen Schaden, charakterisiert durch eine Schwellung und Schädigung der Glomeruli, das Ausbilden der krankheitstypischen Halbmonde. Abbildung 12 zeigt repräsentative Fotos der PAS-Färbung von CD4-Cre, CD4-Cre Wildtyp und CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen.

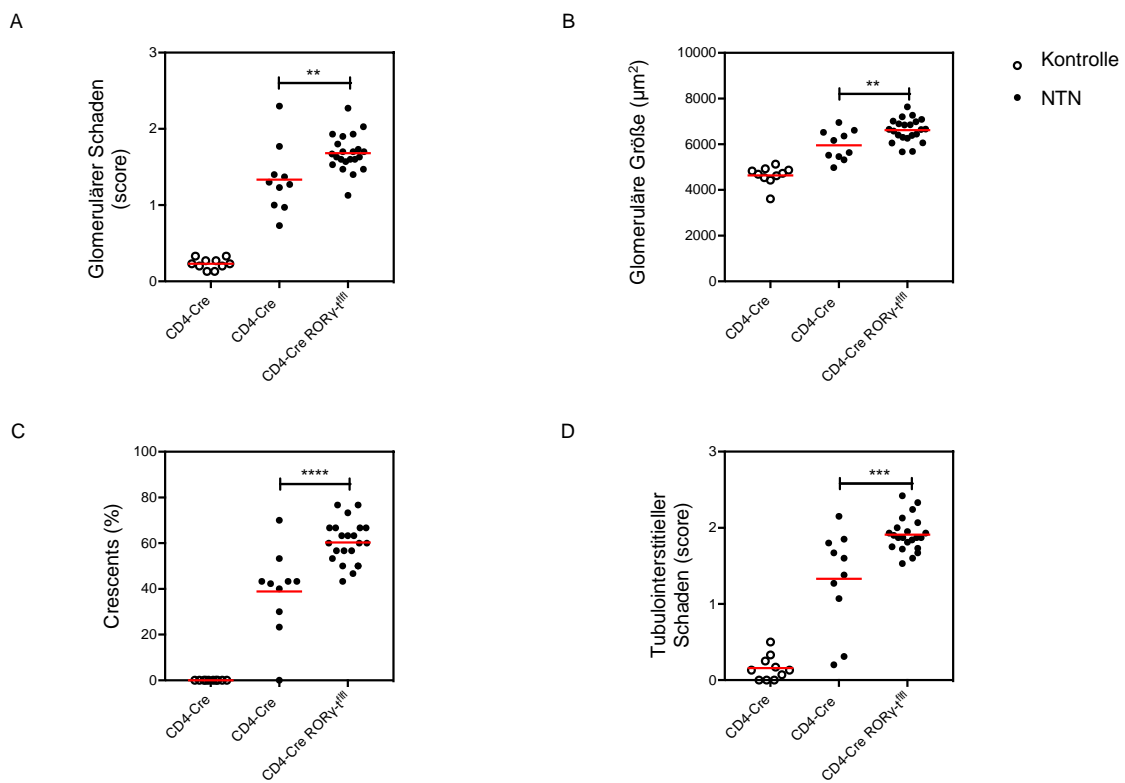


#### Abbildung 10: PAS-Färbung von renalen Schnitten

Im Vergleich zu den Kontrollen zeigen die Mäuse nach Induktion der Nephritis eine renale Schädigung, sowohl glomerulär als auch tubulointerstitiell. Dabei zeigen die CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen einen deutlich stärkeren Schaden. Hier zu sehen ist außerdem die Ausbildung sogenannter Halbmonde.

Überraschenderweise zeigten die CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse einen deutlich aggravierten Schaden im Vergleich zu den CD4-Cre Wildtyp Mäusen. Der quantitative glomeruläre Schaden wurde durch einen Score ermittelt und zeigte signifikant höhere Schädigung bei den Knockout Mäusen mit einem mittleren Score von 1,68 ( $\pm 0,05$ , n=21) im Vergleich zu 1,3 ( $\pm 0,13$ , n=11) bei den Wildtyp Mäusen (siehe Abbildung 13 A). Dies wurde unterstützt durch ebenfalls signifikant größere Glomeruli bei den CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen ( $6600 \pm 110,1 \mu\text{m}^2$ , n=21) im Vergleich zu den CD4-Cre Mäusen ( $6050 \pm 210,2 \mu\text{m}^2$ , n=11), wie Abbildung 13 B verdeutlicht. Ein krankheitsspezifischer Marker für die experimentelle rapid-progressive Glomerulonephritis (crescentic glomerular nephritis) ist die Ausbildung sogenannter Halbmonde, auch Crescents genannt. Die Anzahl dieser Halbmonde wurde ebenfalls ausgezählt und ergab signifikant höhere Anzahlen von Halbmonden bei den CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen. (siehe

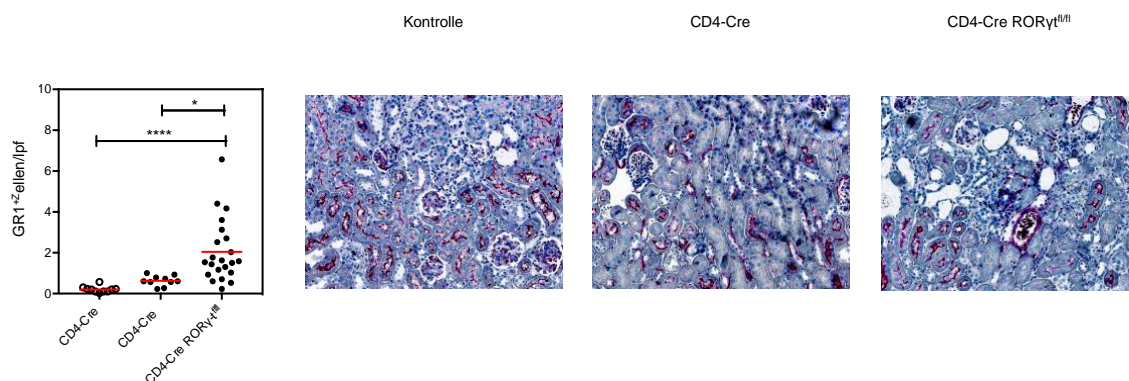
Abbildung 13 C) In der Gruppe der CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse zeigten sich bei Auszählung von 30 Glomeruli im Mittel 60 % Halbmonde ( $\pm 2,05$  %, n=21), in der Gruppe der CD4-Cre Wildtyp Mäuse hingegen nur im Mittel 40 % Halbmonde. ( $\pm 5,63$  %, n=11) Zusätzlich analysierten wir auch den tubulointerstitiellen Schaden, ebenfalls mit Hilfe eines Scores. Auch hier zeigten die CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse eine deutlich ausgeprägtere Schädigung ( $1,9 \pm 0,05$ , n=21) im Vergleich zu den CD4-Cre Wildtyp Mäusen. ( $1,3 \pm 0,19$ , n=11, siehe Abbildung 13 D)



**Abbildung 11: CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen zeigen einen deutlich aggravierten Schaden**

Die Induktion der Nephritis führt zu einer Ausbildung eines renalen Schadens. Die CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse zeigen jedoch einen signifikant stärkeren Schaden. Verdeutlicht wird dies durch einen höheren Schädigungs-Score glomerulär (A) sowie signifikant größere Glomeruli. (B) Auch die krankheitstypischen Halbmonde sind in den CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen signifikant mehr vorhanden. (C) Aber nicht nur glomerulär sondern auch tubulointerstitiell zeigt sich eine deutlich stärkere Schädigung im Vergleich zu den CD4-Cre Wildtyp Mäusen. (D)

Die Entzündungsreaktion in der Niere wird hervorgerufen durch die Infiltration verschiedener Immunzellen. Diese wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen analysiert. Wie bereits beschrieben, werden über eine Ausschüttung von Zytokinen (wie CXCL5) Neutrophile Granulozyten angelockt. Die Infiltration dieser Zellen kann durch eine Färbung GR1 positiver Zellen verdeutlicht werden. Eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten durch die Induktion der Nephritis konnte in beiden Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden, Abbildung 14 zeigt beispielhafte Fotos sowie die Quantifizierung der ausgezählten Zellen.

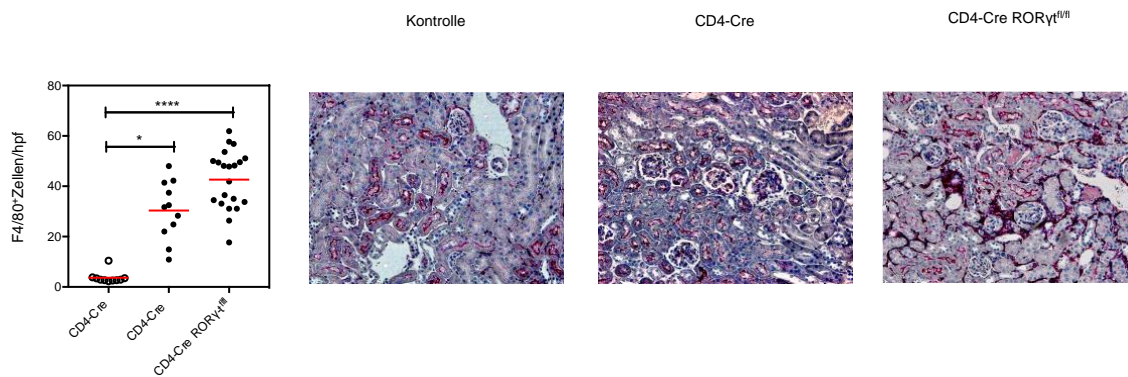


**Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung auf GR1-positive Zellen.**

CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäuse zeigen eine signifikant höhere Anzahl von eingewanderten neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den CD4-Cre Wildtyp Mäusen.

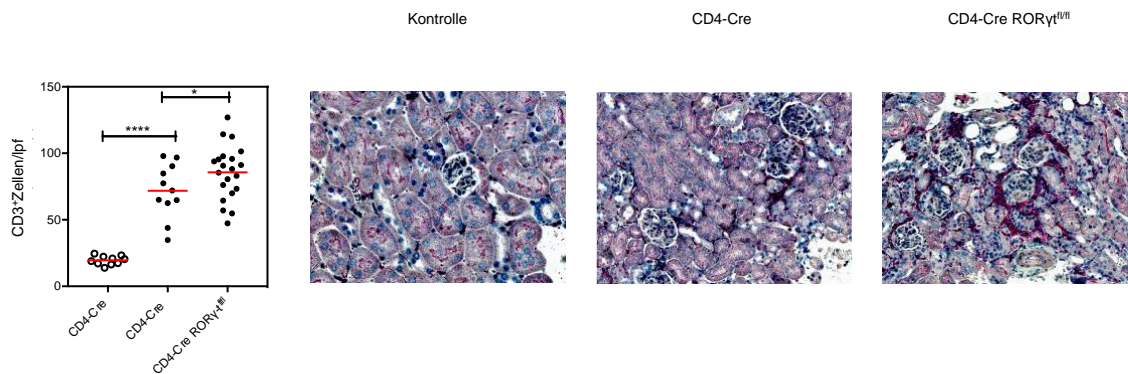
Der CD4-spezifische Knockout von ROR $\gamma$ t führte interessanterweise zu einer signifikant höheren Infiltration durch GR1-positive neutrophile Granulozyten. Es zeigten sich bei den CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäusen im Schnitt 2,07 Zellen pro low power field ( $\pm 0,34$  Zellen/lpf, n=21) im Vergleich zu 0,7 Zellen/lpf bei den CD4-Cre Wildtyp Mäusen ( $\pm 0,1$  Zellen/lpf, n=11)

Auch die Anzahl von F4/80<sup>+</sup> Makrophagen und Monozyten sowie der CD3<sup>+</sup> T-Zellen war erhöht, hier war der Unterschied zwischen Knockout und Wildtyp jedoch nicht signifikant, wie in Abbildung 15 und 16 zu erkennen.



**Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung auf F4/80**

CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Mäuse zeigen ebenfalls eine stärkere Infiltration von F4/80 positiven Makrophagen und Monozyten im Vergleich zu den CD4-Cre Wildtyp Mäusen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigt sich jedoch nicht.



**Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung auf CD3**

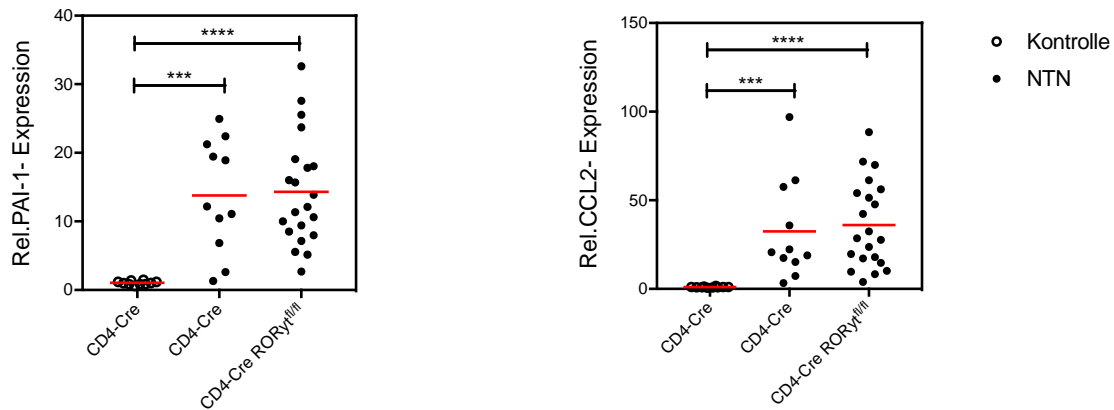
Auch bei der immunhistochemischen Färbung auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich bei den CD4-Cre RORyt<sup>fl/fl</sup> Mäusen signifikant mehr Zellen nachweisen als bei den CD4-Cre Wildtyp Mäusen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine signifikant aggravierte Schädigung der Nieren im Rahmen der Nephritis bei Mäusen ohne CD4<sup>+</sup> RORyt<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen.

### 3.4 Nephrotoxische Nephritis führt zu Expression proinflammatorischer Zytokine:

Mithilfe von Real-Time PCR Analyse wurde die Expression von verschiedenen, an der Pathogenese des renalen Schadens beteiligten, Faktoren analysiert.

In den nephritischen Mäusen zeigte sich eine erhöhte Expression des profibrotischen Markers PAI-1 sowie des proinflammatorischen Chemokins CCL2. Abbildung 17 zeigt den Anstieg der Expression von PAI-1 und CCL2 nach Induktion von NTN. Es zeigt sich kein Unterschied in der Expression zwischen CD4-Cre und CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen.



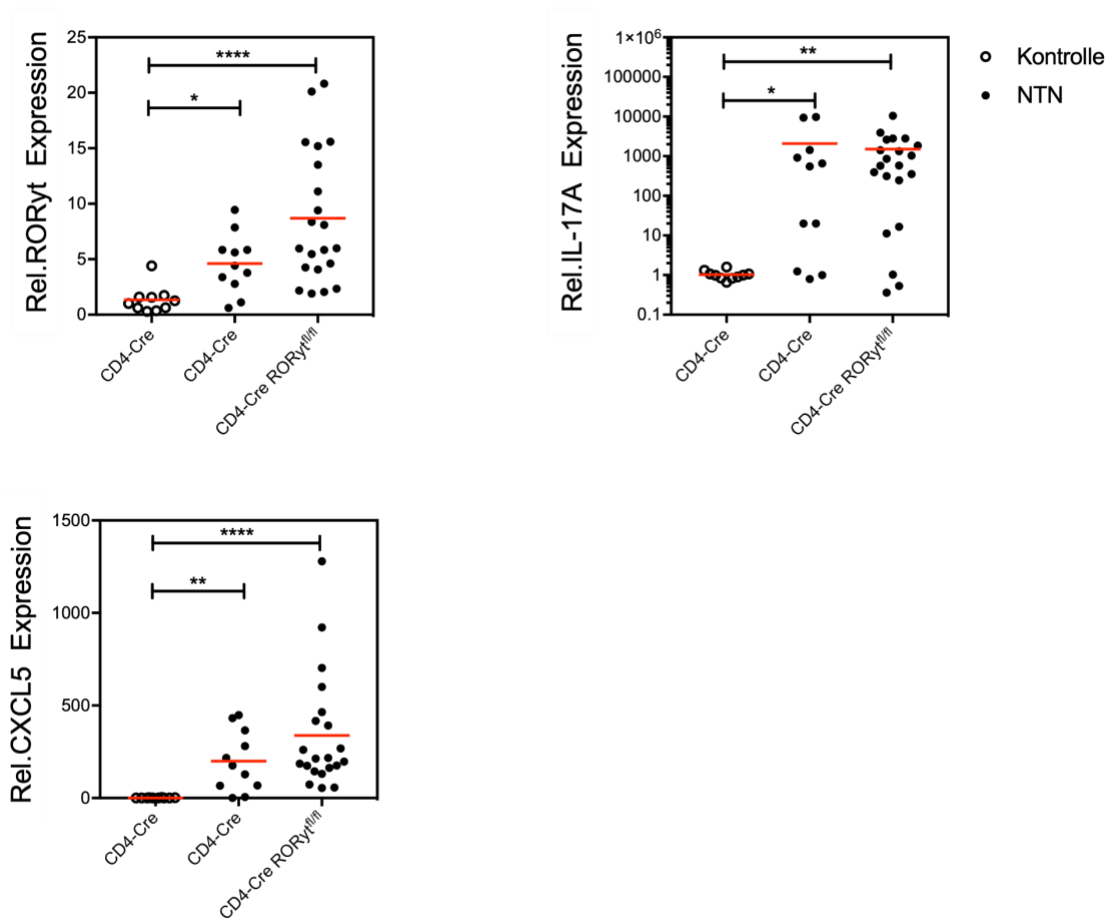
**Abbildung 15: Real-Time PCR Analyse der Niere auf PAI-1 und CCL2**

Induktion von nephrotoxischer Nephritis führt zu einem Anstieg der Expression profibrotischer Marker wie PAI-1 sowie proinflammatorischer Zytokine wie CCL2. Es zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen CD4-Cre Wildtyp und CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen

Interessanterweise ließ sich in der Gesamtniere eine im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen erhöhte Expression von ROR $\gamma$ t und IL-17A nachweisen, wobei der



Unterschied statistisch nicht signifikant war. IL-17A führt über die Hochregulation von CXCL5 zu einer Attraktion von neutrophilen Granulozyten an den Schauplatz der Entzündung. Passend zu der erhöhten Expression von IL-17 in den CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen zeigte sich, wie in Abbildung 18 gezeigt, auch eine erhöhte Expression von CXCL5 in der Niere, auch hier war der Unterschied statistisch jedoch nicht signifikant.

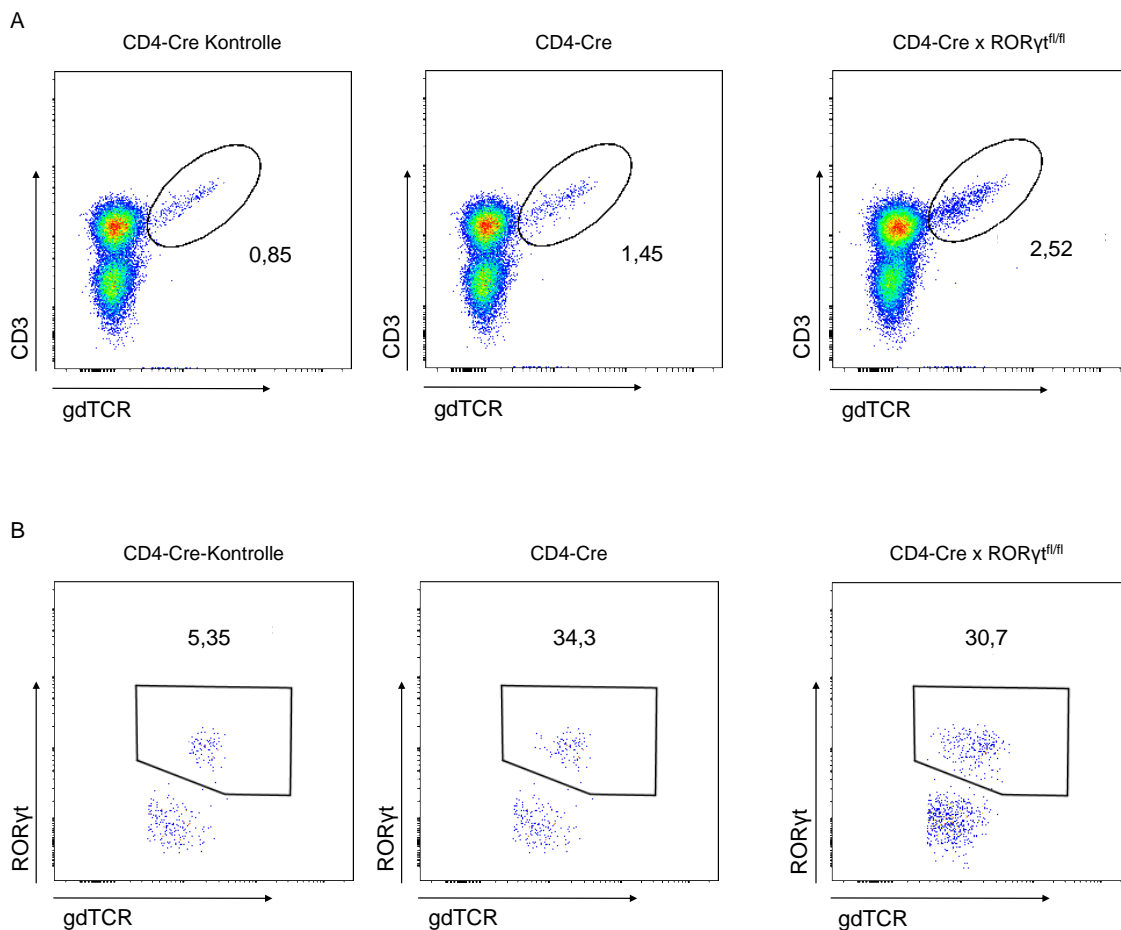


**Abbildung 16: Real-Time PCR Analyse der Niere auf IL-17 und ROR $\gamma$ t**

Die Induktion der Nephritis verursacht einen Anstieg von ROR $\gamma$ t und IL-17A, sowie CXCL5. Die Expression von IL-17A ist logarithmisch aufgetragen.

### 3.5 CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäusen zeigen eine erhöhte Anzahl an GammaDelta Zellen:

$\gamma\delta$ -T-Zellen sind eine weitere Zell-Linie, die ROR $\gamma$ t exprimiert und somit ebenfalls IL-17 produziert. Es konnte bereits eine pathogene Rolle der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Rahmen der Glomerulonephritis, besonders in der Entzündungsreaktion zu Beginn der Erkrankung, gezeigt werden. Die ROR $\gamma$ t Expression in  $\gamma\delta$ -T-Zellen wird durch einen CD4-spezifischen Knockout nicht beeinflusst. Wir führten eine FACS-Analyse der  $\gamma\delta$ -T-Zellen 10 Tage nach Induktion der Nephritis durch. Die Induktion der Nephritis führt zu einem Anstieg der  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Abbildung 19 zeigt beispielhafte FACS-Plots von aus der Analyse 10 Tage nach Nephritisinduktion.

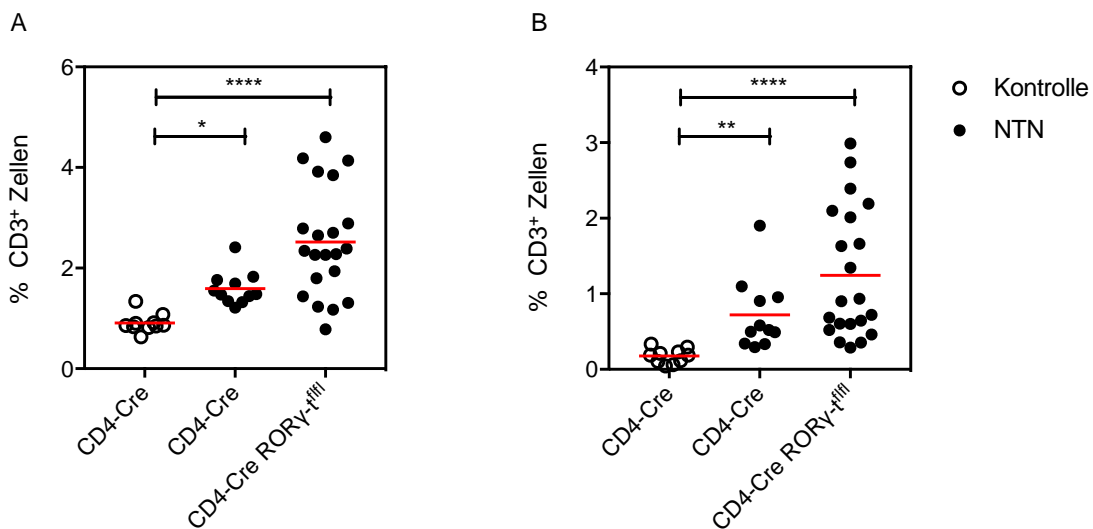


**Abbildung 17: Beispielhafte FACS-Plots aus der Analyse der  $\gamma\delta$ -T-Zellen an Tag 10**

Die Nephritis führt zu einem Anstieg der  $\gamma\delta$ -T-Zellen 10 Tage nach Induktion. Wie in Abbildung 19 A dargestellt zeigen die CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäuse eine höhere Anzahl von  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dabei ist der Anteil ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht deutlich unterschiedlich zu den CD4-Cre Wildtyp Mäusen. (Abbildung 19 B)



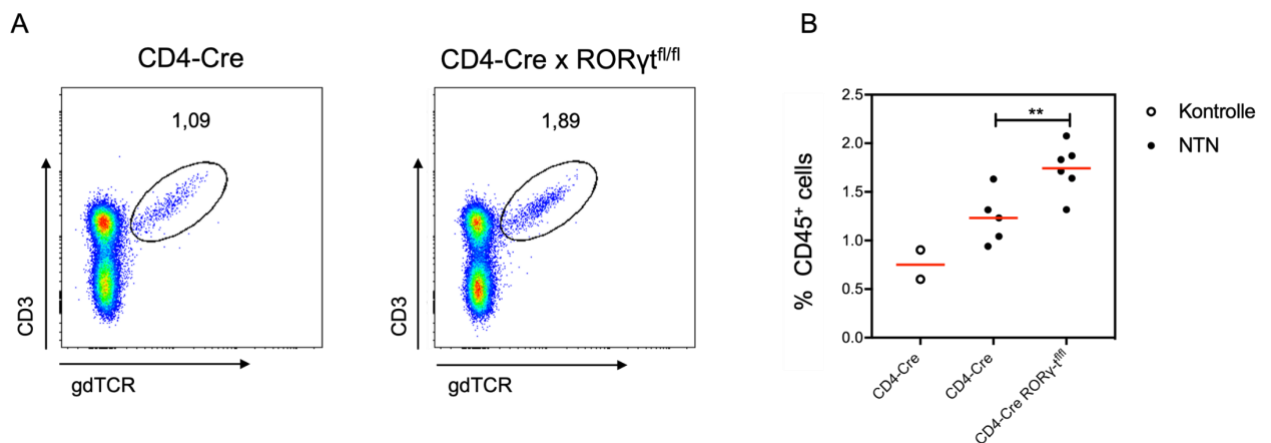
Interessanterweise zeigte sich eine höhere Anzahl dieser Zellen in den CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäusen, wie die Quantifizierung der Daten in Abbildung 20 zeigt ( $2,5 \pm 0,24$  % der CD3<sup>+</sup> Zellen, n=21). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Wildtyp Gruppe ( $1,6 \pm 0,09$  % der CD3<sup>+</sup> Zellen, n=11). Auch die Anzahl ROR $\gamma$ t-exprimierender  $\gamma\delta$ -T-Zellen war numerisch höher in den CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäusen ( $1,24 \pm 0,18$  % der CD3<sup>+</sup>Zellen, n=21) im Vergleich zu der Gruppe der CD4-Cre Wildtyp Mäuse ( $0,72 \pm 0,14$  % der CD3<sup>+</sup> Zellen, n=11).



**Abbildung 18: Quantifizierung der FACS-Analyse der  $\gamma\delta$ -T-Zellen an Tag 10 nach Nephritisinduktion**

10 Tage nach Induktion der Nephritis zeigen sich eine numerisch höhere Anzahl an  $\gamma\delta$ -T-Zellen (A) sowie ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -T-Zellen (B) in der Gruppe der CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäuse. Der Unterschied ist statistisch jedoch nicht signifikant.

Da  $\gamma\delta$ -T-Zellen vor allem in der Frühphase der Nephritis erhöht sind, führten wir auch eine Analyse der Expression 3 Tage nach Induktion der Nephritis durch. Die Daten sind in Abbildung 21 dargestellt. Hier zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl von  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Niere der CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse ( $1,74 \pm 0,10$  % der CD3<sup>+</sup>Zellen, n=21) im Vergleich zu den CD4-Cre Wildtyp Mäusen ( $1,23 \pm 0,12$  % der CD3<sup>+</sup> Zellen, n=11).



**Abbildung 19: FACS-Analyse der  $\gamma\delta$ -T-Zellen an Tag 3 nach Nephritisinduktion**

In Abbildung A sind beispielhafte FACS-Plots dargestellt. Hier zeigt sich bereits eine höhere Anzahl von  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei den CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen. Dies zeigt sich auch in der Quantifizierung. (B) Es zeigen sich signifikant mehr  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Gruppe der CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse im Vergleich zu den CD4-Cre Wildtyp Mäusen.

## 4. Diskussion:

Die TH17 Zellen und deren Effektorzytokin IL-17 sind bekannt dafür, eine wichtige Rolle in der Pathogenese von verschiedenen Autoimmunerkrankungen zu spielen. Dazu zählen unter anderem Arthritis (Bush et al., 2002), die experimentelle autoimmune Enzephalitis (Chen et al., 2006, Hofstetter et al., 2005), Colitis (Yen et al., 2006) sowie Glomerulonephritis (Steinmetz et al., 2011). ROR $\gamma$ t ist der definierende Transkriptionsfaktor für die Produktion von IL-17 (Ivanov et al., 2006). Die Forschungsergebnisse zur Rolle von IL-17 in Autoimmunerkrankungen haben bereits zu der Entwicklung von IL-17 Antikörpern geführt, die ein vielversprechender Ansatzpunkt in der Therapie von zum Beispiel Spondylarthritis oder Psoriasis sind. TH17 Zellen sind der Hauptproduzent von IL-17, es gibt jedoch auch viele andere Zellen, die dieses Zytokin produzieren. Dazu zählen  $\gamma\delta$ -T-Zellen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen (Cua and Tato, 2010). Um die Rolle von ROR $\gamma$ t in CD4-positiven Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis besser zu verstehen und von anderen Zellen zu unterscheiden, induzierten wir die nephrotoxische Nephritis in CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäusen und CD4-Cre Wildtyp Mäusen, in denen ROR $\gamma$ t spezifisch nur in CD4-positiven T-Zellen fehlt. Die wichtige Rolle von TH17 Zellen in der Glomerulonephritis wurde bereits in vielen Versuchen gezeigt. TH17 Zellen fanden sich vermehrt in den Nieren von Mäusen mit experimenteller Nephritis, zusätzlich zeigten IL-23 Knockout Mäuse einen deutlich abgemilderten Verlauf (Paust et al., 2009).

Unterstützend dazu konnten Steinmetz et al. nachweisen, dass ROR $\gamma$ t als definierender Transkriptionsfaktor der TH17 Zellen ebenfalls eine wichtige Rolle spielt, da auch in ROR $\gamma$ t Knockout Mäusen der Verlauf der Nephritis deutlich abgeschwächt war (Steinmetz et al., 2011).

Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse zu der Rolle der TH17 Zellen und ihres Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t in der experimentellen Glomerulonephritis. In unseren Versuchen waren die CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäuse überraschenderweise nicht gegen den Nephritis-induzierten Schaden geschützt. Im Gegenteil, CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäuse zeigten einen deutlich stärkeren Nierenschaden und höhere

Scores des tubulointerstitiellen Schadens sowie der glomerulären Halbmondbildung in der histologischen Untersuchung.

Obwohl die CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäuse einen signifikant höheren histologischen Schaden aufweisen als die CD4-Cre Mäuse, zeigt sich kein Unterschied bei der GFR und der Albuminurie. Dieses ist ein generelles Phänomen bei der nephrotoxischen Nephritis. Offenbar sind GFR und Albuminurie zu wenig sensitiv, bei einem immunologisch verursachten Unterschied in der Histologie mitzureagieren. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Methode des Knockouts sein. Während in den meisten anderen Studien IL-23, IL-17 oder ROR $\gamma$ t in allen Zellen ausgeknockt wurde, verwendeten wir in unseren Versuchen einen CD4-spezifischen Knockout von ROR $\gamma$ t. Dafür benutzten wir das Cre-LoxP System. Dieses System ist seit vielen Jahren gängig, um gezielt DNA-Sequenzen zu entfernen. Es gibt jedoch in den letzten Jahren vermehrt Hinweise, dass die Cre-Rekombinase an sich toxische Eigenschaften besitzt. So konnte zum Beispiel eine vermehrte Aktivierung der Apoptose (Naiche and Papaioannou, 2007) und auch chromosomale Veränderungen gezeigt werden, die von dem Level der Cre Aktivität abhängig sind (Loonstra et al., 2001). Um einen Effekt auf die Unterscheidung zwischen Wildtyp und Knockout Mäusen zu verhindern, verwendeten wir die CD4-Cre Mäuse als Kontrollen und Wildtyp Mäuse. Die hier verwendete CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Maus wurde bisher in nicht vielen Veröffentlichungen verwendet. Im Modell der CDSS-Colitis zeigte sich interessanterweise, vergleichbar zu unseren Ergebnissen, eine vermehrte Aktivität der Entzündung. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte jedoch in einem anderen Modell der Colitis eine verminderte Ausprägung der Erkrankung in den CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen (Mickael et al., 2022). Evans-Marin nutzte das Modell zur Untersuchung der Rolle der TH17 Zellen in inflammatorischer Arthritis. Sie konnte eine Verminderung der Arthritis in CD4-Cre ROR $\gamma$ <sup>fl/fl</sup> Mäusen zeigen (Evans-Marin et al., 2018). In beiden Studien zeigte sich allerdings, ähnlich wie bei unseren Ergebnissen, keine generell verminderte IL-17 Produktion. Dies spricht für eine relevante Rolle der anderen IL-17 produzierenden, nicht CD4-positiven, Zellen.

Der Hinweis, dass es neben den TH17 Zellen noch andere Zellen gibt, die ebenfalls IL-17 produzieren und eine Rolle in der Entstehung der

Autoimmunerkrankungen spielen, ergab sich schon kurz nach Entdeckung der TH17 Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass IL-23 auch in RAG-Mäusen, denen sowohl B- als auch T-Zellen fehlen, in der Lage ist, eine IL-17 Produktion zu induzieren. Daraus ließ sich schließen, dass es auch andere Zellen geben muss, die in der Lage sind IL-17 zu produzieren (Uhlir et al., 2006). Dazu gehören  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Sutton et al., 2009), lymphoid tissue inducer cells (Takatori et al., 2009) und natürliche Killer-Zellen (Michel et al., 2007). Besonders den  $\gamma\delta$ -T-Zellen kommt eine wichtige Rolle in der IL-17 vermittelten Immunabwehr oder auch Autoimmunität zu. Schon früh konnte gezeigt werden, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielen, wie zum Beispiel der experimentellen autoimmunen Enzephalitis, der Kollagen-induzierten Arthritis oder verschiedenen Kollitismodellen (Jensen et al., 2008, Nanno et al., 2008, Roark et al., 2007, Spahn et al., 1999). Zunächst war vermutet worden, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen über eine IFN $\gamma$ -Produktion zu autoimmunen Prozessen beitragen. Im Verlauf zeigte sich aber, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen tatsächlich nicht nur IFN $\gamma$ , sondern auch IL-17 produzieren und dies unabhängig von IL-6, einem für die Entwicklung von TH17-Zellen wichtigen Zytokin (Lochner et al., 2008).  $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren ebenfalls den TH17-typischen Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t und produzieren IL-17 nach Stimulation mit IL-23 und IL-1 $\beta$  (Sutton et al., 2009). In der Folge konnte in verschiedenen Modellen von Autoimmunerkrankungen gezeigt werden, welchen großen Anteil die IL-17 Produktion der  $\gamma\delta$ -T-Zellen zusätzlich zu der Produktion durch die TH17 Zellen spielt. Im Modell der EAE konnten die  $\gamma\delta$ -T-Zellen als wichtiger Produzent von IL-17 identifiziert werden, da sich eine signifikant geringere IL-17 Produktion und nachfolgend eine deutlich geringere Krankheitsaktivität in Tcrd<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte, also Mäusen ohne  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Sutton et al., 2009). Turner et al. verdeutlichten die Rolle von  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Pathogenese der experimentellen Glomerulonephritis. In ihren Versuchen zeigte sich vor allem eine Bedeutung in der Frühphase der Nephritis, während in der späteren Phase der Krankheit die TH17 Zellen eine größere Rolle spielten. Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen führten zu einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten und somit zu einer Aggravation des renalen Schadens. Zusätzlich funktionieren die  $\gamma\delta$ -T-Zellen als Verstärker der TH17 Zell Antwort. Ein Fehlen von IL-17 produzierenden  $\gamma\delta$ -T-Zellen führte zu einer signifikanten Verminderung der Neutrophilen-Infiltration und Halbmondbildung (Turner et al., 2012). Passend

dazu konnten wir 3 Tage nach Induktion der Nephritis eine erhöhte Anzahl ROR $\gamma$ t positiver  $\gamma\delta$ -T-Zellen in den Nieren nachweisen. Interessanterweise zeigten die CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäuse eine signifikant höhere Anzahl an ROR $\gamma$ t positiven  $\gamma\delta$ -T-Zellen. 10 Tage nach Nephritisinduktion war der Unterschied zwischen CD4-Cre Wildtyp und CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäusen nicht mehr signifikant, es zeigten sich numerisch jedoch weiterhin mehr  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Gruppe der CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäuse. Dies könnte in Zusammenschau mit der vermehrten Schädigung in der Histologie sowie der schlechteren glomerulären Filtrationsrate in der Gruppe der CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäuse eine mögliche Erklärung sein, warum keine Abmilderung der Nephritis durch den Knockout der TH17 Zellen zu sehen ist. Unterstützend zu der Hypothese, dass die  $\gamma\delta$ -T-Zellen in Abwesenheit der TH17 Zellen übernehmen, zeigte sich in der Real-Time PCR Analyse aus der Gesamtniere keine verminderte IL-17A Expression in den CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass trotz eines Fehlens der TH17 Zellen eine relevante IL-17 Produktion stattfindet, die in diesem Fall sogar zu einem deutlich aggravierteren Schaden führt. Zelltransfer Versuche in IL-17 oder ROR $\gamma$ t Knockout Mäusen mit Transfer von TH17 Zellen wären notwendig um spezifisch die Rolle der TH17 Zellen in Abwesenheit anderer IL-17 produzierender Zellen zu untersuchen.

Es gibt noch eine andere Zellgruppe, die ebenfalls CD4<sup>+</sup> so wie auch ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> ist und eine Rolle in der glomerulären Nephritis spielt: Die ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> biTregs. Die Gruppe von Kluger et. al hat bereits mehrfach die wichtige Rolle dieser doppelt-positiven regulatorischen T-Zellen in der Abmilderung von inflammatorischen Prozessen im Rahmen der Glomerulonephritis gezeigt. Diese Zellen besitzen eine sehr starke anti-inflammatorische Kapazität, aber auch eine, durch ROR $\gamma$ t vermittelte, pro-inflammatorische Funktion. Ein Transfer von biTregs in Mäuse mit nephrotoxischer Nephritis zeigt daher eine deutliche Abmilderung der Schädigung, was für die potente Unterdrückung immunogener Prozesse durch diese Zellen spricht. Auf der anderen Seite führt ein selektiver Knockout von ROR $\gamma$ t in biTregs zu einer verminderten Schwere der Erkrankung, was auch die proinflammatorische Seite der biTregs unterstreicht. In der nephrotoxischen Nephritis zeigen die biTregs vor allem in der Frühphase die größte Expansion, parallel zur Expansion der TH17 Zellen (Kluger et al., 2016).

In unserer Studie führt der Knockout von ROR $\gamma$ t in CD4 positiven Zellen nicht nur zu einer Abwesenheit der TH17 Zellen, sondern ebenfalls zu einem Mangel an biTregs. Aufgrund der Tatsache, dass die CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäuse keine signifikante Reduktion des renalen Schadens zeigen, scheint vor allem die immunsuppressive Kapazität der biTregs einen großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu haben, mehr noch als das Fehlen der TH17 Zellen. Sowohl TH17 Zellen als auch biTregs werden durch das Zytokin IL-6 reguliert. Dieses wurde bisher vor allem durch die Hochregulation von TH17 Zellen als primär proinflammatorisches Zytokin angesehen. Hagenstein et al. konnten vor kurzem nachweisen, dass nicht nur die Expansion von TH17 Zellen, sondern auch die der biTregs von IL-6 abhängig ist. In den Experimenten der Arbeitsgruppe wurde ebenfalls das Modell der nephrotoxischen Nephritis verwendet. Als in IL-6Ra Knockout Mäusen die Nephritis induziert wurde, konnte zwar eine reduzierte Anzahl von TH17 Zellen gezeigt werden, jedoch keine Reduktion der Krankheitsintensität und der damit einhergehenden renalen Funktionseinschränkung. Zusätzlich konnte ebenfalls eine biTreg Defizienz in Niere und Milz nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse geben Anlass zu der Hypothese, dass die Abwesenheit der TH17 Zellen gemeinsam mit der Abwesenheit der biTregs zum einen zu einer verminderten Migration der biTregs an den Ort der Entzündung und zum anderen zu einer vermehrten TH17 Zell-unabhängigen Schädigung führt (Hagenstein et al., 2019). Unsere Ergebnisse unterstützen die Aussage von Hagenstein et al., da ein spezifischer Knockout von ROR $\gamma$ t in CD4-Zellen sowohl im Fehlen von TH17 Zellen als auch in der Defizienz von biTregs resultiert, aber nicht zu einer Abmilderung der renalen Schädigung führt. Gemeinsam an den Versuchen ist, dass der selektive Knockout einer pro-inflammatorischen Zelllinie nicht wie vermutet zu einer Reduktion der Krankheitsintensität führt, sondern im Gegenteil zu einer Verstärkung des Schadens, dargestellt an der höheren Bildung von Crescents und tubulärem Schaden. In Abwesenheit von TH17 Zellen und auch von biTregs scheinen andere Immunzellen, mit der Fähigkeit ebenfalls IL-17 zu produzieren, zu übernehmen und zu einer verstärkten Schädigung zu führen.

Unsere Ergebnisse stellen die Rolle der TH17-Zellen als Hauptverantwortlicher für die Entwicklung des renalen Schadens im Modell der experimentellen Glomerulonephritis in Frage, da die CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäuse nicht nur nicht

geschützt vor der Erkrankung sind, sondern im Gegenteil noch schwerer betroffen.

Dies ist vor allem im Hinblick auf mögliche therapeutische Targets von Bedeutung. Ziel der targeted therapies ist es, eine möglichst spezifische Therapie zu etablieren, ohne dabei viel Einfluss auf den restlichen Organismus zu haben. In Tiermodellen konnte sowohl für IL-17 als auch für ROR $\gamma$ t Blockade ein positiver Effekt auf die Krankheitsschwere gezeigt werden. Der IL-17 Antikörper Secukinumab ist schon seit einigen Jahren etabliert in der Therapie der Psoriasis und für diese Indikation auch bereits zugelassen (Mease et al., 2015). In der ankylosierenden Spondylarthritis wurden bereits mehrere randomisierte doppelt verblindete Studien mit Secukinumab durchgeführt, die eine signifikante Reduktion der Krankheitssymptome zeigte (Baeten et al., 2013, Baeten et al., 2015, Pavelka et al., 2017). Zusätzlich laufen Studien zu IL-17 Antikörpertherapie bei systemischen rheumatischen Erkrankungen wie systemischer Sklerose, Riesenzellarteriitis sowie Lupusnephritis (Rafael-Vidal et al., 2020).

Unsere Studie gibt möglicherweise den Hinweis, dass eine zu spezifische Therapie nicht den gewünschten Effekt erzielt. Eine spezifische, auf die TH17 Zellen ausgerichtete Therapie, hätte möglicherweise auch im Menschen zur Folge, dass andere IL-17 produzierende Zellen übernehmen und eher zu einem aggravierten Krankheitsverlauf führen als zu einer mildereren Symptomatik.



## 5. Zusammenfassung

Das Zytokin IL-17 spielt eine wichtige Rolle bei autoimmunen Nierenerkrankungen. ROR $\gamma$ t ist der definierende Transkriptionsfaktor in CD4 positiven T Zellen zur Entwicklung von TH17 Zellen. Die selektive Bedeutung der TH17 Zellen in Bezug auf die Pathogenese der autoimmunen Glomerulonephritis wurde bislang nur unzureichend untersucht. Daher führten wir die Versuche mit einem selektiven Knockout von ROR $\gamma$ t in CD4<sup>+</sup> Zellen durch. Um den Einfluss von ROR $\gamma$ t und IL-17 auf die GFR und die autoimmune Glomerulonephritis zu untersuchen, etablierten wir zunächst die wiederholte transkutane Messung der GFR am wachen Tier durch Bestimmung der Eliminationskinetik eines Fluoreszenz-markierten Sinistrins in unserem Labor. Anschließend induzierten wir das Tiermodell der autoimmunen Glomerulonephritis, die nephrotoxische Nephritis, in CD4-Cre und CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäusen. Unsere Arbeitshypothese lautete, dass ein selektiver Knockout von ROR $\gamma$ t in CD4<sup>+</sup> T Zellen sich mitigierend auf den Verlauf der nephrotoxischen Nephritis auswirkt und eine Abschwächung des Verlaufs der Nephritis zu einer verbesserten GFR führt. In unseren Versuchen waren die CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäuse überraschenderweise nicht gegen den Nephritis-induzierten Schaden geschützt, was anhand des nicht signifikanten Unterschieds in der Albuminurie sowie der GFR-Verschlechterung gezeigt werden konnte. Im Gegenteil, CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> Mäuse zeigten einen deutlich stärkeren Nierenschaden und höhere Scores des tubulointerstitiellen Schadens sowie der glomerulären Halbmondbildung in der histologischen Untersuchung. Zusätzlich konnten wir eine erhöhte Anzahl von  $\gamma\delta$ -Zellen sowohl 3 als auch 10 Tage nach Nephritisinduktion zeigen. Diese Zellen sind ebenfalls in der Lage IL-17 zu produzieren. Der CD4-spezifische Knockout führt außerdem zu einer Abwesenheit der biTregs.

Unsere Ergebnisse stellen die Rolle der TH17 Zellen als Hauptverantwortlicher für die Entwicklung des renalen Schadens im Modell der experimentellen Glomerulonephritis in Frage. In Abwesenheit von TH17 Zellen und auch von biTregs scheinen andere Immunzellen, mit der Fähigkeit ebenfalls IL-17 zu produzieren, zu übernehmen und zu einer verstärkten Schädigung zu führen.

## 6. Summary

IL-17 plays an important role in autoimmune renal disease. ROR $\gamma$ t is the defining transcription factor in CD4 positive cells for development into TH17 cells. The role of TH17 cells for the pathogenesis of autoimmune glomerulonephritis is still inadequately researched. Due to this we performed our study in a knockout model which selectively lacks ROR $\gamma$ t in CD4-positive T cells. To analyze the effect of ROR $\gamma$ t and IL-17 on the glomerular filtration rate in autoimmune glomerulonephritis we first established the repetitive transcutaneous GFR measurement in the conscious mouse. This method is based on the measurement of the elimination kinetics of the fluorescent renal marker FITC-Sinistrin. Afterwards we induced nephrotoxic nephritis, an animal model of autoimmune glomerulonephritis, in CD4-Cre and CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> mice. We hypothesized that a selective knockout of ROR $\gamma$ t in CD4<sup>+</sup> cells attenuates the progress of disease of nephrotoxic nephritis and therefore leads to a better GFR. In our study surprisingly CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> mice were not protected against the nephritis-mediated tissue damage, shown by no significant difference in GFR and albuminuria between knockout and wildtype mice. On the contrary, CD4-Cre ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> mice showed even more aggravated kidney damage than wildtype mice with significantly higher scores of tissue damage and glomerular crescent formation in histology. In addition to this we found a higher number of  $\gamma\delta$ -cells on day 3 and day 10 after nephritis induction. These cells are also known to produce IL-17. The selective knockout in CD4<sup>+</sup> T cells also leads to an absence of biTregs. Our results question the role of TH17 cells being the main actor in mediating tissue damage in the experimental model of crescentic glomerulonephritis. In absence of TH17 cells and biTregs other immune cells with the ability to produce IL-17 seem to take over and lead to a more severe phenotype of the disease.

## 7. Erklärung des Eigenanteils

Folgende Anteile der vorliegenden Arbeit basieren auf meiner unmittelbaren Arbeit und Mitarbeit:

- Design und Planung der Versuche sowie Diskussion der Daten: gemeinsam mit Prof. Dr. Ulrich Wenzel, Dr. Alva Rosendahl und Prof. Dr. Heimo Ehmke
- Operative Eingriffe (NTN-Serum Applikation), GFR-Messungen sowie Organentnahmen: gemeinsam mit Dr. Alva Rosendahl und Marlies Bode
- Betreuung der Mäuse während des Versuches: gemeinsam mit Stefan Gatzemeier und dem Team der Versuchstierhaltung des UKE
- Herstellen einer Einzel-Zellsuspension für die FACS-Analyse: gemeinsam mit Dr. Alva Rosendahl
- FACS-Analyse: gemeinsam mit Dr. Alva Rosendahl und Dr. rer.nat. Hans-Joachim Paust
- Uringewinnung im Stoffwechselkäfig: gemeinsam mit Stefan Gatzemeier
- Albumin-ELISA: gemeinsam mit Stefan Gatzemeier
- Realtime RT-PCR: gemeinsam mit Stefan Gatzemeier
- Planung und Durchführung der statistischen Analyse: gemeinsam mit Prof. Dr. Ulrich Wenzel
- Erstellen der Abbildungen: gemeinsam mit Prof. Dr. Ulrich Wenzel und Marlies Bode
- Schreiben der Dissertation

## 8. Abkürzungsverzeichnis:

IL: Interleukin  
ROR $\gamma$ t: Retinoic acid receptor related orphan receptor gamma  
GFR: glomeruläre Filtrationsrate  
RPGN: rapid-progressive Glomerulonephritis  
Ig: Immunglobulin  
ANCA: Anti-cytoplasmatische Antikörper  
TH-Zelle: T-Helfer Zelle  
CD: Cluster of differentiation  
TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor  $\alpha$   
NOS-2: Nitric Oxide Synthase 2  
TGF- $\beta$ : Transforming growth factor  
IFN: Interferon  
CCL: CC chemokine ligand  
CCR: C chemokine receptor  
CXCL: CX chemokine ligand  
LTi: Lymphoid tissue inducer  
FOXP3: Forkhead box protein 3  
Tbet: T-box expressed in t cells  
Treg: regulatory t cell  
STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3  
NTN: Nephrotoxic nephritis  
HBSS: Hanks Balanced Salt Solution  
PCR: Polymerase chain reaction  
PBS: Phosphate buffered saline  
FITC: Fluorescein-5-isothiocyanate  
ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay  
PAS: Periodic acid Schiff  
FCS: Fetal calf serum  
HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure  
FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting  
RNA: Ribonucleic acid  
cDNA: complementary desoxyribonucleic acid  
Lpf: low power field  
Hpf: high power field  
PAI-1: Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1  
gdTCR: gammadelta T-cell receptor  
DSS-Colitis: Dextran sulfate sodium induced colitis  
RAG: Recombination Activating Protein

## 9. Literaturverzeichnis:

- ABDULAHAD, W. H., STEGEMAN, C. A., LIMBURG, P. C. & KALLENBERG, C. G. 2008. Skewed distribution of Th17 lymphocytes in patients with Wegener's granulomatosis in remission. *Arthritis Rheum*, 58, 2196-205.
- AGGARWAL, S., GHILARDI, N., XIE, M. H., DE SAUVAGE, F. J. & GURNEY, A. L. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, 278, 1910-4.
- BAETEN, D., BARALIAKOS, X., BRAUN, J., SIEPER, J., EMERY, P., VAN DER HEIJDE, D., MCINNES, I., VAN LAAR, J. M., LANDEWE, R., WORDSWORTH, P., WOLLENHAUPT, J., KELLNER, H., PARAMARTA, J., WEI, J., BRACHAT, A., BEK, S., LAURENT, D., LI, Y., WANG, Y. A., BERTOLINO, A. P., GSTEIGER, S., WRIGHT, A. M. & HUEBER, W. 2013. Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 382, 1705-13.
- BAETEN, D., SIEPER, J., BRAUN, J., BARALIAKOS, X., DOUGADOS, M., EMERY, P., DEODHAR, A., PORTER, B., MARTIN, R., ANDERSSON, M., MPOFU, S., RICHARDS, H. B., GROUP, M. S. & GROUP, M. S. 2015. Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. *N Engl J Med*, 373, 2534-48.
- BEDOYA, S. K., LAM, B., LAU, K. & LARKIN, J., 3RD 2013. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clin Dev Immunol*, 2013, 986789.
- BETTELLI, E., CARRIER, Y., GAO, W., KORN, T., STROM, T. B., OUKKA, M., WEINER, H. L. & KUCHROO, V. K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441, 235-8.
- BOSCH, X., GUILABERT, A. & FONT, J. 2006. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Lancet*, 368, 404-18.
- BOVENSCHEN, H. J., VAN DE KERKHOFF, P. C., VAN ERP, P. E., WOESTENENK, R., JOOSTEN, I. & KOENEN, H. J. 2011. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *J Invest Dermatol*, 131, 1853-60.
- BUSH, K. A., FARMER, K. M., WALKER, J. S. & KIRKHAM, B. W. 2002. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum*, 46, 802-5.
- CHADBAN, S. J. & ATKINS, R. C. 2005. Glomerulonephritis. *Lancet*, 365, 1797-806.
- CHEN, Y., LANGRISH, C. L., MCKENZIE, B., JOYCE-SHAIKH, B., STUMHOFER, J. S., MCCLANAHAN, T., BLUMENSCHEN, W., CHURAKOVSA, T., LOW, J., PRESTA, L., HUNTER, C. A., KASTELEIN, R. A. & CUA, D. J. 2006. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*, 116, 1317-26.
- COUSER, W. G. 2012. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*, 23, 381-99.
- 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, 744-8.

- CUA, D. J. & TATO, C. M. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 10, 479-89.
- DI CESARE, A., DI MEGLIO, P. & NESTLE, F. O. 2009. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*, 129, 1339-50.
- EVANS-MARIN, H., ROGIER, R., KORALOV, S. B., MANASSON, J., ROELEVELD, D., VAN DER KRAAN, P. M., SCHER, J. U., KOENDERS, M. I. & ABDOLLAHI-ROODSAZ, S. 2018. Microbiota-Dependent Involvement of Th17 Cells in Murine Models of Inflammatory Arthritis. *Arthritis Rheumatol*, 70, 1971-1983.
- FEUERER, M., HILL, J. A., MATHIS, D. & BENOIST, C. 2009. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol*, 10, 689-95.
- GAN, P. Y., STEINMETZ, O. M., TAN, D. S., O'SULLIVAN, K. M., OOI, J. D., IWAKURA, Y., KITCHING, A. R. & HOLDSWORTH, S. R. 2010. Th17 cells promote autoimmune anti-myeloperoxidase glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 21, 925-31.
- HAGENSTEIN, J., MELDERIS, S., NOSKO, A., WARKOTSCH, M. T., RICHTER, J. V., RAMCKE, T., HERRNSTADT, G. R., SCHELLER, J., YAN, I., MITTRUCKER, H. W., KLUGER, M. A. & STEINMETZ, O. M. 2019. A Novel Role for IL-6 Receptor Classic Signaling: Induction of ROR $\gamma$ <sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs with Enhanced Suppressive Capacity. *J Am Soc Nephrol*, 30, 1439-1453.
- HAPPEL, K. I., DUBIN, P. J., ZHENG, M., GHILARDI, N., LOCKHART, C., QUINTON, L. J., ODDEN, A. R., SHELLITO, J. E., BAGBY, G. J., NELSON, S. & KOLLS, J. K. 2005. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med*, 202, 761-9.
- HARRINGTON, L. E., HATTON, R. D., MANGAN, P. R., TURNER, H., MURPHY, T. L., MURPHY, K. M. & WEAVER, C. T. 2005. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6, 1123-32.
- HOFSTETTER, H. H., IBRAHIM, S. M., KOCZAN, D., KRUSE, N., WEISHAUPT, A., TOYKA, K. V. & GOLD, R. 2005. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*, 237, 123-30.
- 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, 1198-216.
- HOMEY, B., DIEU-NOSJEAN, M. C., WIESENORN, A., MASSACRIER, C., PIN, J. J., OLDFHAM, E., CATRON, D., BUCHANAN, M. E., MULLER, A., DEWAAL MALEFYT, R., DENG, G., OROZCO, R., RUZICKA, T., LEHMANN, P., LEBECQUE, S., CAUX, C. & ZLOTNIK, A. 2000. Upregulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol*, 164, 6621-32.
- HOVHANNISYAN, Z., TREATMAN, J., LITTMAN, D. R. & MAYER, L. 2011. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140, 957-65.
- IVANOV, II, MCKENZIE, B. S., ZHOU, L., TADOKORO, C. E., LEPELLEY, A., LAFAILLE, J. J., CUA, D. J. & LITTMAN, D. R. 2006. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell*, 126, 1121-33.
- IWAKURA, Y. & ISHIGAME, H. 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest*, 116, 1218-22.

- JENSEN, K. D., SU, X., SHIN, S., LI, L., YOUSSEF, S., YAMASAKI, S., STEINMAN, L., SAITO, T., LOCKSLEY, R. M., DAVIS, M. M., BAUMGARTH, N. & CHIEN, Y. H. 2008. Thymic selection determines  $\gamma\delta$  T cell effector fate: antigen-naïve cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity*, 29, 90-100.
- KEBIR, H., KREYMBORG, K., IFERGAN, I., DODELET-DEVILLERS, A., CAYROL, R., BERNARD, M., GIULIANI, F., ARBOUR, N., BECHER, B. & PRAT, A. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*, 13, 1173-5.
- KLUGER, M. A., MEYER, M. C., NOSKO, A., GOERKE, B., LUIG, M., WEGSCHEID, C., TIEGS, G., STAHL, R. A., PANZER, U. & STEINMETZ, O. M. 2016. ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Cells are an Independent Bifunctional Regulatory T Cell Lineage and Mediate Crescentic GN. *J Am Soc Nephrol*, 27, 454-65.
- KOLLS, J. K. & LINDEN, A. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, 21, 467-76.
- 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, 738-53.
- LANGRISH, C. L., CHEN, Y., BLUMENSCHNEIN, W. M., MATTSO, J., BASHAM, B., SEDGWICK, J. D., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. A. & CUA, D. J. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201, 233-40.
- LEONARDI, C., MATHESON, R., ZACHARIAE, C., CAMERON, G., LI, L., EDSON-HEREDIA, E., BRAUN, D. & BANERJEE, S. 2012. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med*, 366, 1190-9.
- LEWIS, B. J., RAJPARA, S., HAGGART, A. M., WILSON, H. M., BARKER, R. N. & ORMEROD, A. D. 2013. Predominance of activated, clonally expanded T helper type 17 cells within the CD4<sup>+</sup> T cell population in psoriatic lesions. *Clin Exp Immunol*, 173, 38-46.
- LOCHNER, M., PEDUTO, L., CHERRIER, M., SAWA, S., LANGA, F., VARONA, R., RIETHMACHER, D., SI-TAHAR, M., DI SANTO, J. P. & EBERL, G. 2008. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> and regulatory IL-10<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med*, 205, 1381-93.
- LOONSTRA, A., VOOIJS, M., BEVERLOO, H. B., ALLAK, B. A., VAN DRUNEN, E., KANAAR, R., BERNS, A. & JONKERS, J. 2001. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9209-14.
- MANGAN, P. R., HARRINGTON, L. E., O'QUINN, D. B., HELMS, W. S., BULLARD, D. C., ELSON, C. O., HATTON, R. D., WAHL, S. M., SCHOEB, T. R. & WEAVER, C. T. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the TH17 lineage. *Nature*, 441, 231-4.
- MEASE, P. J., MCINNES, I. B., KIRKHAM, B., KAVANAUGH, A., RAHMAN, P., VAN DER HEIJDE, D., LANDEWE, R., NASH, P., PRICOP, L., YUAN, J., RICHARDS, H. B., MPOFU, S. & GROUP, F. S. 2015. Secukinumab Inhibition of Interleukin-17A in Patients with Psoriatic Arthritis. *N Engl J Med*, 373, 1329-39.
- MICHEL, M. L., KELLER, A. C., PAGET, C., FUJIO, M., TROTTEIN, F., SAVAGE, P. B., WONG, C. H., SCHNEIDER, E., DY, M. & LEITE-DE-MORAES, M. C. 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1<sup>+</sup> iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med*, 204, 995-1001.

- MICKAEL, M. E., BHAUMIK, S., CHAKRABORTI, A., UMFRESS, A. A., VAN GROEN, T., MACALUSO, M., TOTENHAGEN, J., SORACE, A. G., BIBB, J. A., STANDAERT, D. G. & BASU, R. 2022. ROR $\gamma$ t-Expressing Pathogenic CD4<sup>+</sup> T Cells Cause Brain Inflammation during Chronic Colitis. *J Immunol*, 208, 2054-2066.
- NAICHE, L. A. & PAPAIOANNOU, V. E. 2007. Cre activity causes widespread apoptosis and lethal anemia during embryonic development. *Genesis*, 45, 768-75.
- NAKAE, S., SAIJO, S., HORAI, R., SUDO, K., MORI, S. & IWAKURA, Y. 2003. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5986-90.
- NANNO, M., KANARI, Y., NAITO, T., INOUE, N., HISAMATSU, T., CHINEN, H., SUGIMOTO, K., SHIMOMURA, Y., YAMAGISHI, H., SHIOHARA, T., UEHA, S., MATSUSHIMA, K., SUEMATSU, M., MIZOGUCHI, A., HIBI, T., BHAN, A. K. & ISHIKAWA, H. 2008. Exacerbating role of  $\gamma\delta$  T cells in chronic colitis of T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology*, 134, 481-90.
- NOGUEIRA, E., HAMOUR, S., SAWANT, D., HENDERSON, S., MANSFIELD, N., CHAVELE, K. M., PUSEY, C. D. & SALAMA, A. D. 2010. Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*, 25, 2209-17.
- OSORIO, F., LEIBUNDGUT-LANDMANN, S., LOCHNER, M., LAHL, K., SPARWASSER, T., EBERL, G. & REIS E SOUSA, C. 2008. DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur J Immunol*, 38, 3274-81.
- PAUST, H. J., TURNER, J. E., STEINMETZ, O. M., PETERS, A., HEYMANN, F., HOLSCHER, C., WOLF, G., KURTS, C., MITTRUCKER, H. W., STAHL, R. A. & PANZER, U. 2009. The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 20, 969-79.
- PAVELKA, K., KIVITZ, A., DOKOUPILOVA, E., BLANCO, R., MARADIAGA, M., TAHIR, H., PRICOP, L., ANDERSSON, M., READIE, A. & PORTER, B. 2017. Efficacy, safety, and tolerability of secukinumab in patients with active ankylosing spondylitis: a randomized, double-blind phase 3 study, MEASURE 3. *Arthritis Res Ther*, 19, 285.
- PESENACKER, A. M. & WEDDERBURN, L. R. 2013. T regulatory cells in childhood arthritis--novel insights. *Expert Rev Mol Med*, 15, e13.
- RAFAEL-VIDAL, C., PEREZ, N., ALTABAS, I., GARCIA, S. & PEGO-REIGOSA, J. M. 2020. Blocking IL-17: A Promising Strategy in the Treatment of Systemic Rheumatic Diseases. *Int J Mol Sci*, 21.
- ROARK, C. L., FRENCH, J. D., TAYLOR, M. A., BENDELE, A. M., BORN, W. K. & O'BRIEN, R. L. 2007. Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells. *J Immunol*, 179, 5576-83.
- SCARFE, L., RAK-RASZEWSKA, A., GERACI, S., DARSSAN, D., SHARKEY, J., HUANG, J., BURTON, N. C., MASON, D., RANJZAD, P., KENNY, S., GRETZ, N., LEVY, R., KEVIN PARK, B., GARCIA-FINANA, M., WOOLF, A. S., MURRAY, P. & WILM, B. 2015. Measures of kidney function by minimally invasive techniques correlate with histological glomerular damage in SCID mice with adriamycin-induced nephropathy. *Sci Rep*, 5, 13601.
- SCHREIBER, A., SHULHEVICH, Y., GERACI, S., HESSER, J., STSEPAKOU, D., NEUDECKER, S., KOENIG, S., HEINRICH, R., HOECKLIN, F., PILL, J., FRIEDEMANN, J., SCHWEDA,



- F., GRETZ, N. & SCHOCK-KUSCH, D. 2012. Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303, F783-8.
- SETHI, S., HAAS, M., MARKOWITZ, G. S., D'AGATI, V. D., RENNKE, H. G., JENNETTE, J. C., BAJEMA, I. M., ALPERS, C. E., CHANG, A., CORNELL, L. D., COSIO, F. G., FOGO, A. B., GLASSOCK, R. J., HARIHARAN, S., KAMBHAM, N., LAGER, D. J., LEUNG, N., MENGEL, M., NATH, K. A., ROBERTS, I. S., ROVIN, B. H., SESHAN, S. V., SMITH, R. J., WALKER, P. D., WINEARLS, C. G., APPEL, G. B., ALEXANDER, M. P., CATTRAN, D. C., CASADO, C. A., COOK, H. T., DE VRIESE, A. S., RADHAKRISHNAN, J., RACUSEN, L. C., RONCO, P. & FERVENZA, F. C. 2016. Mayo Clinic/Renal Pathology Society Consensus Report on Pathologic Classification, Diagnosis, and Reporting of GN. *J Am Soc Nephrol*, 27, 1278-87.
- SILBERNAGL, S. 2019. Überblick. In: PAPE, H.-C., KURTZ, A. & SILBERNAGL, S. (eds.) *Physiologie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- SPAHN, T. W., ISSAZADAH, S., SALVIN, A. J. & WEINER, H. L. 1999. Decreased severity of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 33-35-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice with a disrupted TCR delta chain gene. *Eur J Immunol*, 29, 4060-71.
- STEINMETZ, O. M., SUMMERS, S. A., GAN, P. Y., SEMPLE, T., HOLDSWORTH, S. R. & KITCHING, A. R. 2011. The Th17-defining transcription factor ROR $\gamma$ t promotes glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 22, 472-83.
- SUMMERS, S. A., STEINMETZ, O. M., LI, M., KAUSMAN, J. Y., SEMPLE, T., EDGTON, K. L., BORZA, D. B., BRALEY, H., HOLDSWORTH, S. R. & KITCHING, A. R. 2009. Th1 and Th17 cells induce proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 20, 2518-24.
- SUTTON, C. E., LALOR, S. J., SWEENEY, C. M., BRERETON, C. F., LAVELLE, E. C. & MILLS, K. H. 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*, 31, 331-41.
- SYED, R., REHMAN, A., VALECHA, G. & EL-SAYEGH, S. 2015. Pauci-Immune Crescentic Glomerulonephritis: An ANCA-Associated Vasculitis. *Biomed Res Int*, 2015, 402826.
- TAKATORI, H., KANNO, Y., WATFORD, W. T., TATO, C. M., WEISS, G., IVANOV, I., LITTMAN, D. R. & O'SHEA, J. J. 2009. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J Exp Med*, 206, 35-41.
- TURNER, J. E., KREBS, C., TITTEL, A. P., PAUST, H. J., MEYER-SCHWESINGER, C., BENNSTEIN, S. B., STEINMETZ, O. M., PRINZ, I., MAGNUS, T., KORN, T., STAHL, R. A., KURTS, C. & PANZER, U. 2012. IL-17A production by renal  $\gamma\delta$  T cells promotes kidney injury in crescentic GN. *J Am Soc Nephrol*, 23, 1486-95.
- TZARTOS, J. S., FRIESE, M. A., CRANER, M. J., PALACE, J., NEWCOMBE, J., ESIRI, M. M. & FUGGER, L. 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*, 172, 146-55.
- UHLIG, H. H., MCKENZIE, B. S., HUE, S., THOMPSON, C., JOYCE-SHAIKH, B., STEPANKOVA, R., ROBINSON, N., BUONOCORE, S., TLASKALOVA-HOGENOVA, H., CUA, D. J. & POWRIE, F. 2006. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity*, 25, 309-18.
- WELSCH, U., KUMMER, W. & DELLER, T. 2018. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie*, München, Jena, Urban&Fischer in Elsevier.

- WENZEL, U., TURNER, J. E., KREBS, C., KURTS, C., HARRISON, D. G. & EHMKE, H. 2016. Immune Mechanisms in Arterial Hypertension. *J Am Soc Nephrol*, 27, 677-86.
- YE, P., RODRIGUEZ, F. H., KANALY, S., STOCKING, K. L., SCHURR, J., SCHWARZENBERGER, P., OLIVER, P., HUANG, W., ZHANG, P., ZHANG, J., SHELLITO, J. E., BAGBY, G. J., NELSON, S., CHARRIER, K., PESCHON, J. J. & KOLLS, J. K. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*, 194, 519-27.
- YEN, D., CHEUNG, J., SCHEERENS, H., POULET, F., MCCLANAHAN, T., MCKENZIE, B., KLEINSCHEK, M. A., OWYANG, A., MATTSON, J., BLUMENSCHNEIN, W., MURPHY, E., SATHE, M., CUA, D. J., KASTELEIN, R. A. & RENNICK, D. 2006. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*, 116, 1310-6.

## 10. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Polarisation von naiven CD4-positiven T-Zellen. ....	9
Abbildung 2: Versuchsaufbau Nephrotoxische Nephritis: .....	16
Abbildung 3: GFR-Messung an der wachen Maus: .....	18
Abbildung 4: GFR-Messung an der wachen Maus: .....	20
Abbildung 5: Gating Strategie .....	25
Abbildung 6: Beispielhafte FACS-Analyse auf CD4 <sup>+</sup> ROR $\gamma$ t <sup>+</sup> Zellen:.....	28
Abbildung 9: Anstieg der Retentionsparameter unter Nephritis .....	31
Abbildung 10: GFR-Messung im Verlauf der Nephritis .....	32
Abbildung 11: Nephrotoxische Nephritis führt zu signifikantem Anstieg der Albuminurie.....	33
Abbildung 12: PAS-Färbung von renalen Schnitten .....	34
Abbildung 13: CD4-Cre ROR $\gamma$ t <sup>fl/fl</sup> Mäusen zeigen einen deutlich aggravierten Schaden .....	35
Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung auf GR1-positive Zellen. .	36
Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung auf F4/80.....	37
Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung auf CD3.....	37
Abbildung 17: Real-Time PCR Analyse der Niere auf PAI-1 und CCL2 .....	38
Abbildung 18: Real-Time PCR Analyse der Niere auf IL-17 und ROR $\gamma$ t .....	39
Abbildung 19: Beispielhafte FACS-Plots aus der Analyse der $\gamma\delta$ -T-Zellen an Tag 10.....	40
Abbildung 20: Quantifizierung der FACS-Analyse der $\gamma\delta$ -T-Zellen an Tag 10 nach Nephritisinduktion .....	41
Abbildung 21: FACS-Analyse der $\gamma\delta$ -T-Zellen an Tag 3 nach Nephritisinduktion .....	42

Tabelle 1:Anzahl der Versuchstiere in den einzelnen Versuchsgruppen ..	15
--	----

## 11. Danksagung:

Zuerst möchte ich mich hiermit bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel bedanken, der mich während meiner Zeit im Labor sehr gut betreute. Er nahm sich Zeit meine Fragen zu beantworten und eine Lösung für Probleme zu finden.

Besonders möchte ich mich auch bei meinem Mentor und Betreuer Prof. Dr. Heimo Ehmke bedanken. Durch seine Begeisterung für die experimentelle Forschung hat er in mir erst das Interesse daran geweckt und mich anschließend in Höhen und Tiefen meiner Doktorarbeit unterstützt. Und obwohl ich letztendlich nicht in der Nephrologie oder Physiologie gelandet bin, hat er mich weiterhin stets motiviert mein Interesse an der Wissenschaft nicht zu verlieren und weiter in der Forschung tätig zu sein.

Des Weiteren danke ich meiner Betreuerin Alva Rosendahl für die tatkräftige Unterstützung. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und die langen Stunden im Maus Keller während der GFR-Messungen wären alleine auch nur halb so schnell vergangen.

Auch Marlies Bode danke ich für ihre Hilfe, auch noch nach meiner Zeit im Labor, und die Unterstützung, falls doch noch Informationen für die Dissertation fehlten.

Stefan Gatzemeier danke ich für die gute Einarbeitung und Betreuung im Labor. Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Sigrid Harendza und Prof. Dr. Ulf Panzer für die Betreuung im Graduiertenkolleg, Dr. Hans-Joachim Paust für die Unterstützung bei Fragen zur FACS-Analyse und Färbung und Prof. Dr. Helga Vitzthum für die Einführung in die GFR-Messung.

Meinen Freunden bin ich sehr dankbar für die Unterstützung sowohl in meiner Laborzeit als auch in der Zeit des Schreibens. Ich habe so viel Motivation und Zuspruch erhalten, dass das Schreiben deutlich einfacher war.

Zuletzt danke ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern. Sie haben mich bei meinem bisherigen Lebensweg immer ausnahmslos unterstützt und dazu ermutigt meinen Interessen nachzugehen. In Höhen meiner Doktorarbeit haben sie mit mir gefeiert und mich in Tiefen aufgefangen, dafür bin ich sehr dankbar.

## 12. Publikationen

Ahadzadeh E, Rosendahl A, Czesla D, **Steffens P**, Prussner L, Meyer-Schwesinger C, Wanner N, Paust HJ, Huber TB, Stahl RAK, Wiech T, Kurts C, Seniuk A, Ehmke H, Wenzel UO (2018) The chemokine receptor CX3CR1 reduces renal injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. American journal of physiology Renal physiology 315(6):F1526-F1535.

## 13. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## 14. Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift.....