

**Bioinformatische Analysen zur Funktion von  
MAIT-Zellen in immunvermittelten  
Nierenerkrankungen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Alex Waterhölter

aus

Winsen (Luhe)

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Jan-Eric Turner

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Michael Bockmayr

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Michael Bockmayr

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

Mitglied der Prüfungskommission: PD Dr. Reiner Mailer

Datum der mündlichen Prüfung: 16.03.2026

## Inhaltsverzeichnis

1	Vorwort.....	1
2	Publikation .....	2
3	Darstellung der Publikation .....	19
3.1	Einleitung.....	19
3.2	Ergebnisse.....	20
3.2.1	Identifikation von humanen MAIT-Zellen .....	20
3.2.2	Identifikation und Charakterisierung von MAIT-Zellen in der murinen Niere .....	21
3.2.3	MAIT-Zellen haben einen protektiven Effekt in der experimentellen Glomerulonephritis.....	21
3.2.4	Expressionsprofile von MAIT-Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis.....	22
3.2.5	Bioinformatischer Ansatz zur Aufklärung des Mechanismus von MAIT-Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis .....	22
3.2.6	Protektiver Effekt von MAIT-Zellen ist abhängig von CXCR6-CXCL16-Achse ..	23
3.2.7	Pharmakologische Aktivierung von MAIT-Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis.....	23
3.3	Diskussion .....	23
3.3.1	Zusammenfassung .....	23
3.3.2	Protektiver Effekt von MAIT-Zellen: ein <i>off-Target</i> Effekt? .....	23
3.3.3	MAIT-Zellen in immunvermittelten Erkrankungen: ein <i>Common-Theme</i> ?.....	24
3.3.4	Übertragbarkeit der Experimente .....	24
3.3.5	Was vermittelt die Aktivierung von MAIT-Zellen?.....	25
3.3.6	Limitationen der Interaktom-Analyse .....	25
3.3.7	Die CXCR6-CXCL16-Achse: eine neue Entdeckung? .....	26
3.3.8	T-Zell-Erschöpfung und CTLA-4.....	26
3.3.9	TGFB1: ein zweiseitiges Schwert? .....	27
3.3.10	Abschließende Worte .....	28
4	Abkürzungsverzeichnis .....	29
5	Literaturverzeichnis .....	31
6	Zusammenfassung .....	36
7	Erklärung des Eigenanteils .....	37
8	Danksagungen.....	38
	Eidesstattliche Versicherung.....	39

## **1 Vorwort**

Die vorliegende Publikation mit dem Titel „Mucosal-associated invariant T cells contribute to suppression of inflammatory myeloid cells in immune-mediated kidney disease“ erschien am 15.11.2023 in Nature Communications, herausgegeben von der „Nature Publishing Group“. Die Arbeit ist das wesentliche Ergebnis meiner einjährigen extracurricularen Tätigkeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Jan-Eric Turner. Im Rahmen des Graduiertenkollegs des Sonderforschungsbereiches 1192 „Immune-mediated Glomerular Diseases - Basic Concepts and Clinical Implications“ erhielt ich ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und konnte durch das strukturierte Rahmenprogramm profitieren. Zudem wurde es mir nach diesem Jahr ermöglicht, als Hilfwissenschaftler in der AG Turner weitere 2 Jahre an dem Projekt zu arbeiten.

Ich teile die Erstautorenschaft dieser Publikation mit Dr. rer. nat. Ann-Christin Gnirck, welche ebenfalls in der AG Turner als Promovierende bzw. Post-Doc angestellt war, als auch mit Dr. rer. nat. Marie-Sophie Phillip, welche im Labor von Prof. Christian Kurts, Leiter des Instituts für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie (IMMEI) der Universität Bonn, angestellt war.

Das Ziel dieser Publikationsdissertation ist, die wesentlichen Ergebnisse der Publikation darzulegen sowie den Inhalt und die Methodik einer erneuten kritischen Diskussion zu unterstellen. Dabei möchte ich insbesondere auf meinen Anteil an der Publikation eingehen.


## 2 Publikation

# Mucosal-associated invariant T cells contribute to suppression of inflammatory myeloid cells in immune-mediated kidney disease

Received: 25 March 2022

Accepted: 6 November 2023

Published online: 15 November 2023

 Check for updates

Ann-Christin Gnirck<sup>1,2,3,9,12</sup>, Marie-Sophie Philipp<sup>4,10,12</sup>, Alex Waterhölter<sup>1,2,3,12</sup>, Malte Wunderlich<sup>1,2,3</sup>, Nikhat Shaikh<sup>1,2,3</sup>, Virginia Adamiak<sup>1,2,3</sup>, Lena Henneken<sup>1,2,3</sup>, Tobias Kautz<sup>1,2,3,11</sup>, Tingting Xiong<sup>1,2,3</sup>, Daniela Klaus<sup>4</sup>, Pascal Tomczyk<sup>5</sup>, Mohamad M. Al-Bahra<sup>5</sup>, Dirk Menche<sup>5</sup>, Mark Walkenhorst<sup>6</sup>, Olivier Lantz<sup>7</sup>, Anne Willing<sup>6</sup>, Manuel A. Friese<sup>6</sup>, Tobias B. Huber<sup>1,2,3</sup>, Christian F. Krebs<sup>1,2,3</sup>, Ulf Panzer<sup>1,2,3</sup>, Christian Kurts<sup>4,8,13</sup> ✉ & Jan-Eric Turner<sup>1,2,3,13</sup> ✉

Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells have been implicated in various inflammatory diseases of barrier organs, but so far, their role in kidney disease is unclear. Here we report that MAIT cells that recognize their prototypical ligand, the vitamin B2 intermediate 5-OP-RU presented by MR1, reside in human and mouse kidneys. Single cell RNAseq analysis reveals several intrarenal MAIT subsets, and one, carrying the genetic fingerprint of tissue-resident MAIT17 cells, is activated and expanded in a murine model of crescentic glomerulonephritis (cGN). An equivalent subset is also present in kidney biopsies of patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated cGN. MAIT cell-deficient MR1 mice show aggravated disease, whereas B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice, harboring higher MAIT cell numbers, are protected from cGN. The expanded MAIT17 cells express anti-inflammatory mediators known to suppress cGN, such as CTLA-4, PD-1, and TGF- $\beta$ . Interactome analysis predicts CXCR6 – CXCL16-mediated cross-talk with renal mononuclear phagocytes, known to drive cGN progression. In line, we find that cGN is aggravated upon CXCL16 blockade. Finally, we present an optimized 5-OP-RU synthesis method which we apply to attenuating cGN in mice. In summary, we propose that CXCR6<sup>+</sup> MAIT cells might play a protective role in cGN, implicating them as a potential target for anti-inflammatory therapies.

Pathogenic immune responses in the kidney often commence in the glomerulus, leading to glomerulonephritis that may spread over the tubulointerstitium and cause progressive impairment of kidney function, ultimately resulting in end-stage kidney disease. As a disease

group, the different glomerulonephritis forms underlie up to 20% of chronic kidney diseases in industrialized countries and hence represent a considerable financial burden for healthcare systems<sup>1</sup>. The most aggressive form of glomerulonephritis (GN) is characterized by

A full list of affiliations appears at the end of the paper. ✉ e-mail: [ckurts@uni-bonn.de](mailto:ckurts@uni-bonn.de); [j.turner@uke.de](mailto:j.turner@uke.de)

proliferation of Bowman's capsule parietal epithelial cells which, together with immune cell infiltration around and within the glomeruli, results in characteristic crescents. In most cases, crescentic GN (cGN) patients require intense immunosuppression to stop or delay disease progression, but the therapeutic regimens available are unspecific, hampered by limited effectiveness, and often show severe systemic side-effects<sup>1,2</sup>.

In recent years, numerous studies have elucidated the mechanisms underlying cGN by using the nephrotoxic nephritis model that mimics the histopathology and T cell-mediated immune responses of human cGN<sup>2-4</sup>. The early inflammatory phase is executed by cells of the innate immune system, followed by a pathogenic intrarenal T<sub>H</sub>17 response, and, at later stages, by an injurious T<sub>H</sub>1-mediated delayed type hypersensitivity reaction regulated by dendritic cells. Also anti-inflammatory players that partially downregulate the pathogenic immune response in experimental cGN have been identified, such as NKT cells in the T<sub>H</sub>17 phase and regulatory T cells in the T<sub>H</sub>1 phase<sup>2,4</sup>.

Recent immunological studies have highlighted the role of T cells with invariant T cell receptors (TCR) in various inflammatory and autoimmune diseases, such as Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, which express a semi-invariant T cell receptor, consisting of TRAV1-2 joined to TRAJ33 in mice and humans<sup>5</sup>. These cells are restricted by the non-polymorphic MHC class I-like protein MRI and recognize vitamin B2 metabolites produced by certain bacteria<sup>6,7</sup>. In most murine tissues, MAIT cells display a T-bet<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -producing MAIT1 or ROR $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17A-producing MAIT17 phenotype. Upon antigen recognition of bacterial metabolites, MAIT cells are activated, secrete various cytokines, and perform cytotoxic functions by producing granzyme B and perforin<sup>8-13</sup>. In addition to TCR-mediated antigen recognition, MAIT cells can be directly activated by cytokines, mainly IL-12 and IL-18, that are produced during viral infections<sup>14,15</sup>. These differential activation modes enable them to respond to bacterial and viral infections. While such antimicrobial functions of MAIT cells have been well documented, their role in non-infectious immune-mediated inflammatory diseases (IMID), especially glomerulonephritis, remains unclear<sup>16,17</sup>.

So far, most studies on MAIT cells in IMID patients, including anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis with cGN<sup>18,19</sup>, are limited to analyses of peripheral blood MAIT cells. These studies showed an activated, proinflammatory and/or exhausted phenotype of MAIT cells and reduced peripheral frequencies, suggesting their recruitment to inflammatory sites<sup>16,17</sup>. In contrast, several recent transcriptomic analyses of human and murine MAIT cells described upregulation of a tissue repair signature after activation, indicating that these cells might also play a role in tissue repair after injury<sup>20-22</sup>.

Although initially identified in mucosal tissues, MAIT cells also populate internal organs. Indeed, limited evidence from experimental models of sterile inflammation of the central nervous system<sup>23,24</sup>, the pancreas<sup>25</sup>, and the liver<sup>26</sup> supports a tissue protective potential of MAIT cells in certain experimental settings. Recent reports have identified MAIT cells also in kidneys of humans and mice<sup>27-29</sup>. Some observations in a lupus nephritis model hinted at proinflammatory functions<sup>30</sup>, but the detailed role of MAIT cells in kidney inflammation is largely unclear.

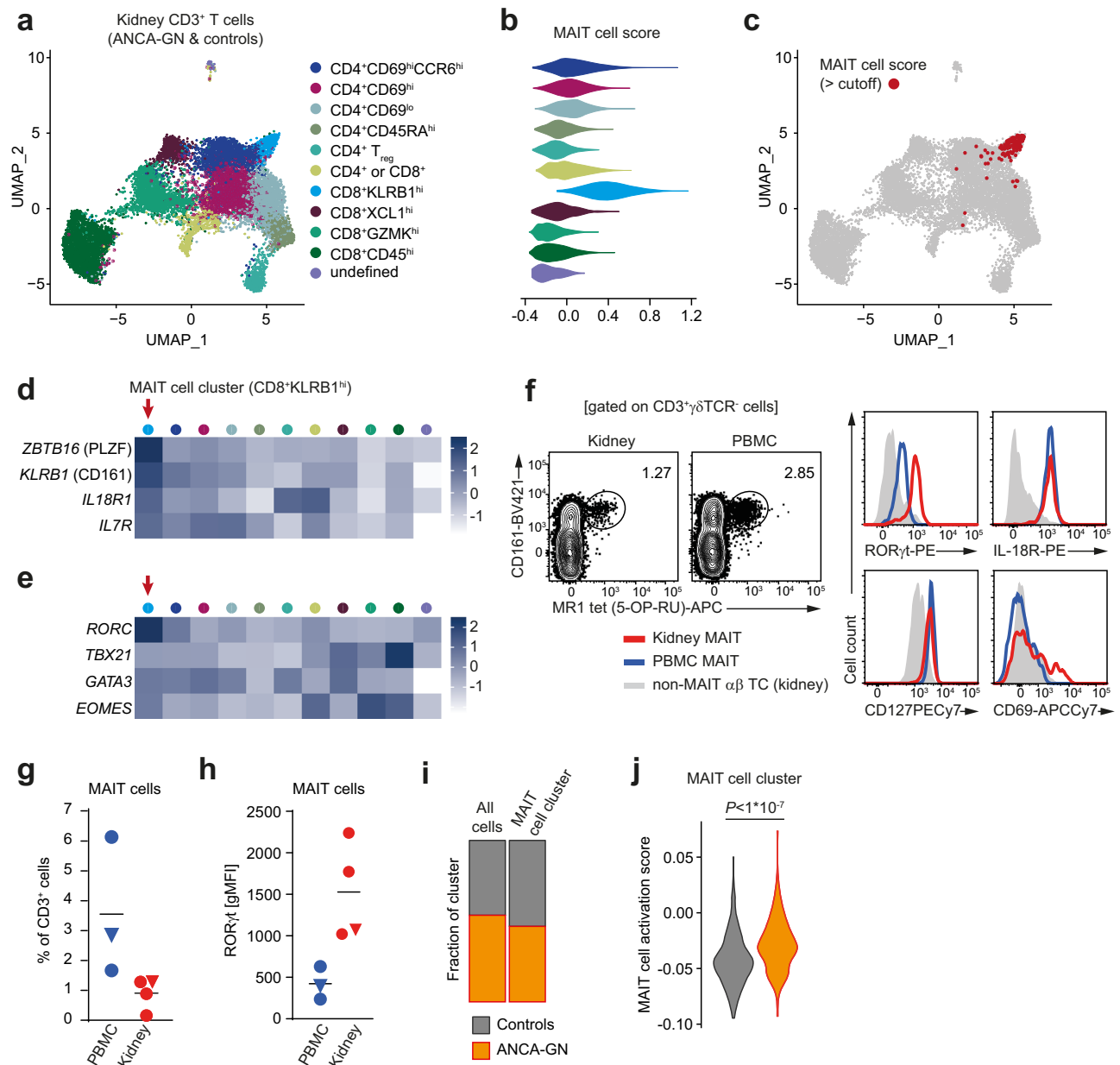
Here, we present the first evidence for a protective role of MAIT cells in renal inflammation. Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) analysis of MAIT cells residing in the mouse and human kidney reveals a MAIT17 subset that expands and gets activated during renal inflammation. These MAIT17 cells express anti-inflammatory mediators and interact with myeloid cells in the kidney tissue which might result in suppression of proinflammatory functions of the latter and thereby ameliorate cGN. In particular, we report that pharmacological MAIT cell activation attenuates a model of cGN, which might help to develop MAIT-cell-based therapeutic interventions in the future.

## Results

### MAIT17 cells reside in the human kidney and are activated in ANCA-associated glomerulonephritis

Recent reports indicate the presence of MAIT cells in human kidney tissue<sup>27-29</sup>, but their expression profile and potential contribution to renal inflammation has not been addressed so far. For a detailed profiling of human kidney MAIT cells in homeostasis and renal autoimmunity, we first re-analyzed a scRNAseq dataset of kidney T cells that we recently published<sup>31</sup>. A total of 12,734 T cells from controls ( $n = 3$ ) and patients with ANCA-associated glomerulonephritis (ANCA-GN) ( $n = 6$ ), a severe form of renal autoimmunity with cGN, were combined and subjected to unsupervised clustering by the UMAP algorithm (Fig. 1a). As previously described<sup>31</sup>, we identified 11 subclusters of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells with specific mRNA expression profiles (Fig. 1a) that were labeled according to cluster-defining genes (Supplementary Fig. 1A). Due to the limited sequencing depth we were unable to identify MAIT cells in this data set by their specific T cell receptor (TCR) sequences (e.g., *TRAV1-2*). Therefore, we aimed at identifying kidney MAIT cells in the ANCA-GN dataset by a broader gene expression profile specific for MAIT cells. To this end, we extracted a MAIT cell-defining gene expression module from an unrelated scRNAseq dataset of T cells isolated from the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of Coronavirus Disease 2019 (COVID19) patients, recently published by our group<sup>32</sup>. This more recent data set with improved sequencing depth allowed for unequivocal identification of TCR V $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> *TRAV1-2*-expressing MAIT cells by epitope measurement using barcoded antibodies (cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing = CITE-seq) (Supplementary Fig. 1B). Of note, the markers used to identify BALF MAIT cells by CITE-seq in this data set were also expressed on kidney MAIT cells, as demonstrated by flow cytometry (Supplementary Fig. 1C). The uncurated MAIT cell gene expression module (MAIT cell score) used to identify kidney MAIT cells in the ANCA-GN data set was composed of the 20 cluster-defining genes of the MAIT cell cluster in the BALF COVID19 data set (Supplementary Fig. 1D). The quantification of MAIT cell score expression in the 11 renal T cell clusters defined in Fig. 1a revealed that the CD8<sup>+</sup>*KLRB1*<sup>hi</sup> (the latter encoding for CD161) cluster showed an mRNA expression profile consistent with MAIT cells (Fig. 1b, d). Moreover, overlaying cells that showed high expression of the MAIT cell score onto the original UMAP plot confirmed that the vast majority of these cells were located in this CD8<sup>+</sup>*KLRB1*<sup>hi</sup> cluster (Fig. 1c). Since NKT cells might show a similar gene expression profile, we wished to exclude contamination of the identified MAIT cell cluster with this other innate-like T cell population. By using a similar strategy as described above for the MAIT cell score, we extracted a NKT cell-defining expression score (top 20 cluster defining genes of the NKT cell cluster) from the BALF COVID19 data set (Supplementary Fig. 2A-C) and overlaid cells with high NKT cell score expression onto the ANCA-GN data set (Supplementary Fig. 2D-G). These analyses confirmed that NKT cells did not contribute to the MAIT cell cluster.

To determine the predominant MAIT cell subset in the kidney, we analyzed the expression of T cell lineage-defining transcription factors in the 11 clusters that revealed high expression of *RORC* (encoding for the retinoic acid receptor-related orphan receptor C, ROR $\gamma$ t) in the MAIT cell population, identifying them as MAIT17 cells (Fig. 1e and Supplementary Fig. 1D). Next, we performed specific MAIT cell flow cytometric analyses with 5-OP-RU loaded MRI-tetramer (MRI tet(5-OP-RU)) in control kidneys and blood samples, confirming high protein expression of ROR $\gamma$ t in renal MAIT cells compared to their circulating counterparts (Supplementary Fig. 1E and Fig. 1f-h). The comparison of kidney MAIT cell frequency between controls and patients with ANCA-GN in the scRNAseq dataset showed that the proportion of MAIT cells in the total renal T cell population was unchanged in ANCA-GN (Fig. 1i).

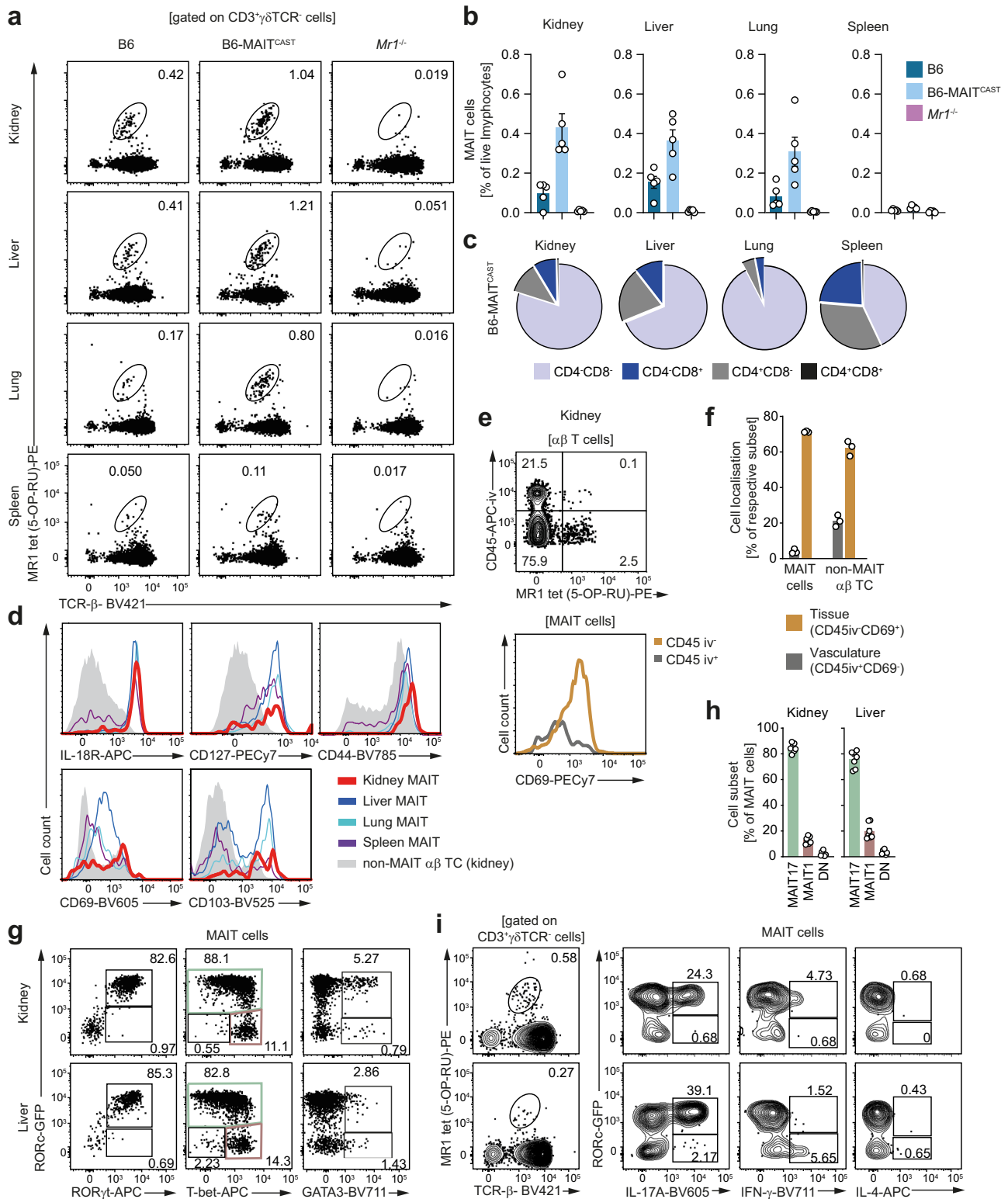


**Fig. 1 | Mucosal-associated invariant T (MAIT) 17 cells reside in the human kidney and are activated in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated glomerulonephritis (GN).** **a** Unsupervised Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) clustering (resolution 0.6) of a published data set<sup>31</sup> of pooled single-cell RNA sequencing (scRNAseq) data from CD3<sup>+</sup> T cells isolated from kidney biopsy specimens of ANCA-GN patients ( $n = 6$ ) and unaffected kidney tissue of tumor nephrectomy patients (controls,  $n = 3$ ). Eleven clusters were identified and named according to cluster defining genes. **b** Expression of an uncured MAIT cell-defining gene signature generated from a MAIT cell cluster identified in the bronchoalveolar lavage fluid of Coronavirus Disease 2019 patients<sup>32</sup> (MAIT cell score, see Supplementary Fig. 1) in the indicated clusters. Color coding as in (a). **c** Cells that show high expression of the MAIT cell score were marked in red and plotted on the original UMAP plot. Gene expression heatmap of MAIT cell-defining genes (d) and T cell lineage-defining transcription factors (e) in the indicated clusters. Color coding as in (a). **f** Representative flow cytometric identification and characterization of MAIT cells in paired kidney and blood samples of a tumor

nephrectomy patient. Gating strategy is specified in brackets and numbers indicate the percentage of cells in the gate. MAIT cell frequencies in the CD3<sup>+</sup> T cell fraction (g) and RORγt expression in MAIT cells (h) from unaffected kidney tissue and blood of tumor nephrectomy patients, as well as from the blood of healthy human donors. Samples from the same patient are marked with a triangle symbol. Each symbol in (g) and (h) represents one biologically independent sample ( $n = 3$  for PBMC,  $n = 4$  for kidney) and horizontal lines represent the mean. **i** Contribution of cells from controls and ANCA-GN patients to the MAIT cell cluster (CD8<sup>+</sup>KLRB1<sup>hi</sup>) identified in scRNAseq analyses. **j** Expression of an uncured gene signature defining in vitro activated human peripheral blood MAIT cells (MAIT cell activation score (Hinks et al.<sup>23</sup>)) in the MAIT cell cluster of controls and ANCA-GN patients. The two-sided Student's *t* test was used for comparison between the two groups. (UMAP uniform manifold approximation and projection for dimension reduction, ANCA-GN anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis, PBMC peripheral blood mononuclear cells, gMFI geometric mean fluorescent intensity). Source data are provided as a Source Data file.

However, application of a MAIT cell activation score, composed of a module of genes upregulated in human peripheral blood MAIT cells after in vitro activation with 5-OP-RU-loaded MR1 tetramers<sup>22</sup>, to the cell clusters showed significant MAIT cell activation in ANCA-GN

(Fig. 1j). In summary, these data indicate the presence of MAIT17 cells in healthy and inflamed human kidney tissue and are consistent with their activation in autoimmune renal inflammation in ANCA-associated small vessel vasculitis.



**MAIT cells display a tissue-resident MAIT17 phenotype in the murine kidney**

In order to investigate the potential functional significance of a kidney-residing MAIT17 cell population in a preclinical model, we addressed the question whether the kidney of laboratory mice harbors a comparable population of MAIT cells. The gating strategy for analysis of MAIT cells in mice is depicted in Supplementary Fig. 3A. Since tissue-residing and circulating MAIT cell numbers in the standard C57BL/6 (B6) mouse strains are relatively low compared to those in humans, we

additionally employed the widely used congenic B6-MAIT<sup>CAST</sup> mouse strain that contains a genetic trait of wild-derived inbred CAST/Eij mice, leading to a substantial increase in MAIT cell abundance<sup>33</sup>. MAIT cell-deficient *Mr1*<sup>-/-</sup> mice were used as negative controls<sup>6</sup>. Indeed, specific flow cytometric analyses of MAIT cells from kidney and various other organs with MRI-tet(5-OP-RU) showed comparable frequencies of MAIT cells in the kidney compared to the liver and lung, organs in which these cells have been shown to play important roles in the immune response (Fig. 2a, b and Supplementary Fig. 3D)<sup>16</sup>. Moreover,

**Fig. 2 | Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells display a tissue-resident MAIT17 phenotype in the murine kidney.** **a** Representative flow cytometry plots of leukocytes isolated from kidney, liver, lung, and spleen of naïve B6, B6-MAIT<sup>CAST</sup>, and *Mr1*<sup>-/-</sup> mice. **b** Quantification of MAIT cell frequencies in the live lymphocyte gate in the respective organs and mouse strains (see (a)). **c** Distribution of CD4 and CD8 surface expression in the MAIT cell population of naïve B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice in kidney, liver, lung, and spleen. **d** Representative flow cytometric analysis of surface marker expression on MAIT cells in kidney, liver, lung, and spleen of naïve B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice. **e** Representative flow cytometry plots of  $\alpha\beta$  T cells from kidneys of naïve B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice euthanized shortly after intravenous (i.v.) injection of an fluorochrome coupled  $\alpha$ -CD45 antibody (upper panel) and histogram of CD69 surface expression in the CD45<sup>iv+</sup> and CD45<sup>iv-</sup> MAIT cell population (lower panel). **f** Distribution of CD45<sup>iv+</sup> CD69<sup>-</sup> (intravascular) and CD45<sup>iv-</sup> CD69<sup>+</sup> (tissue)

populations in the MAIT cell and non-MAIT  $\alpha\beta$  T cell compartment in the kidneys of naïve B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice ( $n = 3$  biologically independent animals per group). Representative flow cytometry plots of transcription factor expression (**g**) and quantification of MAIT cell subsets (RORc-GFP<sup>+</sup>T-bet<sup>-/-</sup> = MAIT17, RORc-GFP<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> = MAIT1, RORc-GFP<sup>-</sup>T-bet<sup>-</sup> = double negative (DN)) (**h**) in kidney and liver MAIT cells from naïve RORc-GFP B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice ( $n = 7$  biologically independent animals per group). **i** Cytokine production (after restimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate/ionomycin) in kidney and liver MAIT cells from naïve RORc-GFP B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice. Gating strategies are specified in brackets and numbers indicate percentage of cells in the gates. Bars represent mean  $\pm$  SEM and symbols represent individual animals. All experiments were performed twice with at least three mice per group. Source data are provided as a Source Data file.

MAIT cell frequencies in the kidney of naïve B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice were similar to those in healthy human kidney tissue (see Figs. 1g and 2a). Consistent with the MAIT cell phenotype in other anatomical locations, detailed flow cytometric characterization of kidney MAIT cells in B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice revealed a predominantly CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> phenotype, high expression of IL-18R, CD127, and CD44, as well as of the tissue residency markers CD69 and CD103 (Fig. 2d). Moreover, renal MAIT cells were almost exclusively negative for staining with an intravenously injected CD45 antibody, confirming their location within the kidney tissue (Fig. 2e, f). An assessment of transcription factor expression profiles revealed that the vast majority of kidney MAIT cells in B6-MAIT<sup>CAST</sup> and C57BL/6 mice were positive for ROR $\gamma$ t, intermediate for T-bet, and negative for GATA-3 (Fig. 2g, h and Supplementary Fig. 3E). Consistent with the ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> MAIT17 profile, IL-17A was the main lineage-defining cytokine produced by MAIT cells isolated from the kidney and restimulated with PMA and ionomycin (Fig. 2i). Taken together, these analyses show that murine kidney MAIT cells show a tissue-resident MAIT17 phenotype that resembles basic characteristics of MAIT cells in human kidneys.

### Kidney MAIT17 cells express pro- and anti-inflammatory mediators in experimental cGN

After establishing the B6-MAIT<sup>CAST</sup> mouse strain as a suitable model for human kidney MAIT cell biology, we induced a widely used experimental model for cGN (nephrotoxic serum nephritis)<sup>3,4</sup> that mimics features of human ANCA-GN in these mice. To provide a deep profiling of MAIT cells at different time points of kidney inflammation, we isolated MRI-tet(5-OP-RU)<sup>+</sup> MAIT cells from the kidneys of naïve B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice and on days 1 and 9 after induction of cGN and subjected them to scRNAseq. The sorting strategy for isolation of MAIT cells is depicted in Supplementary Fig. 3B. These analyses yielded a total of 9212 cells that divided into seven subsets by unsupervised UMAP clustering, two of which were composed of MAIT17 cells, as indicated by high expression of MAIT cell-defining genes such as the *Trav1* (coding for the MAIT cell TCR), *Il18r1*, *Zbtb16* (encoding for PLZF), *Rorc*, *Il17a*, and *Il23r* (Fig. 3a–c and Supplementary Fig. 4). From the remaining minority of cells, one smaller cluster expressed *Trav1* along with other non-MAIT TCR genes, *Cd4*, *Cd8*, as well as a mixture of type 1, type 2, and type 17 markers, indicating contamination with non-MAIT CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Another *Trav1*-low cluster showed high expression of NK cell and type 1 markers, as well as cytotoxic molecules, indicating NKT cell origin.

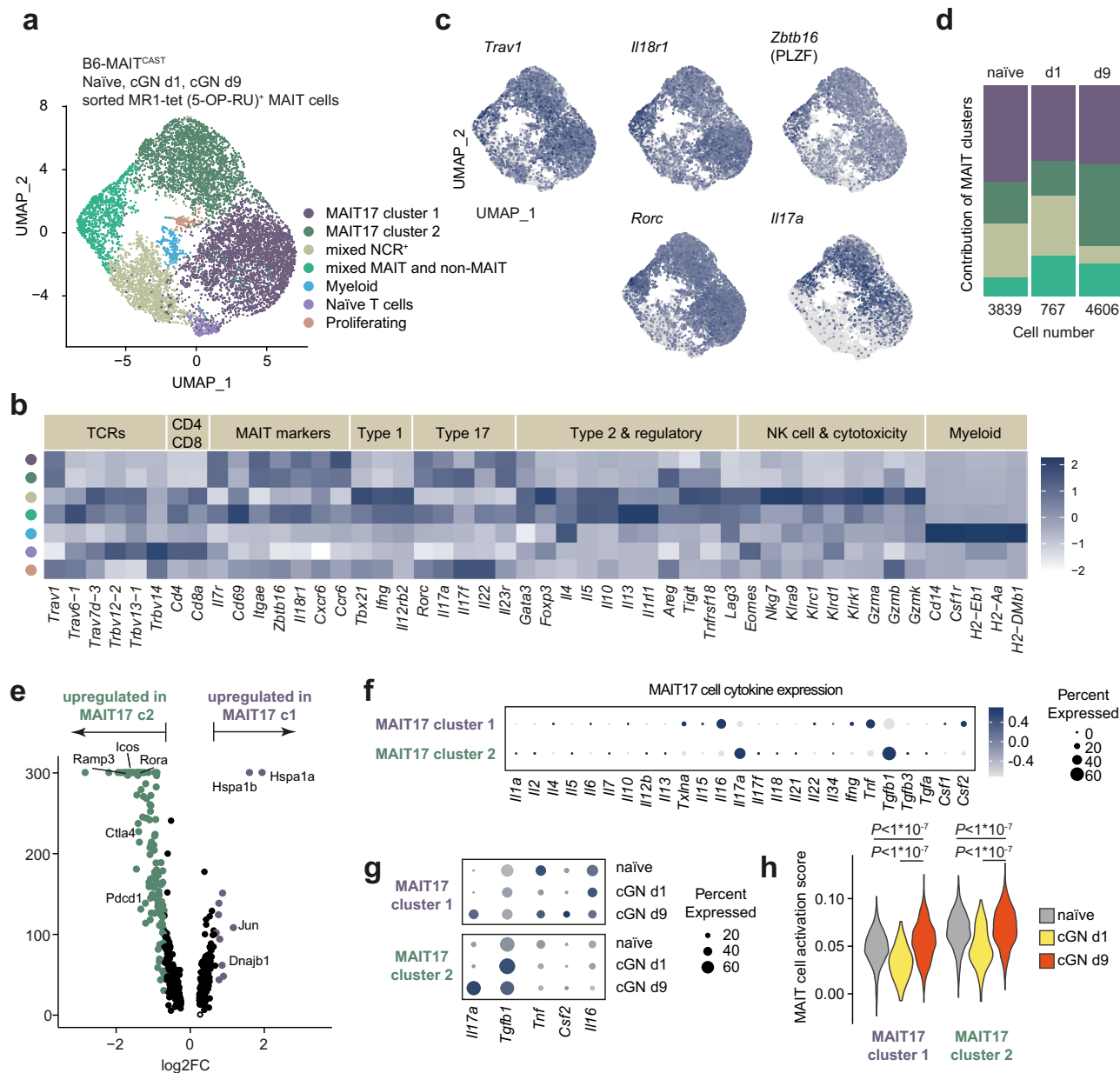
The two major clusters of MAIT17 cells comprised 50–80% of cells depending on the time point. Interestingly, both MAIT17 cell cluster 1 (c1) and MAIT17 cell cluster 2 (c2) were present in the kidney of naïve mice, but only c2 expanded with the progression of cGN (naïve and day 1 vs. day 9), whereas c1 remained unchanged in frequency (Fig. 3d and Supplementary Fig. 4A). Unbiased differential expression analysis of MAIT17 c1 vs. c2 showed an upregulation of several cell contact-dependent stimulatory and inhibitory immune cell regulators such as *Icos*, *Ctla4*, and *Pdcd1* (encoding for

PD-1) in MAIT17 c2 cells (Fig. 3e). To explore whether MAIT17 cells might employ additional cytokines, apart from IL-17A, to regulate the immune response in the kidney, we analyzed mRNA expression of all known interleukins and a selected list of other cytokines in the two clusters predominant in murine kidney inflammation (Fig. 3f, g). Unexpectedly, in addition to IL-17A, these analyses revealed a strong expression of *Tgfb1* (encoding for TGF- $\beta$ ) in MAIT17 c2 cells, a cytokine that has been implicated in the downregulation of inflammation in cGN<sup>35</sup>. While IL-17A production was low in both MAIT17 cell clusters from naïve mice, it appeared to be upregulated with the progression of cGN in both clusters (day 1 vs. day 9). In contrast, TGF- $\beta$  seemed to be a feature of kidney MAIT c2 cells already in homeostatic conditions and at an early disease stage (day 1) (Fig. 1g). In analogy to the analyses of MAIT cell activation in human control vs. ANCA-GN kidney tissue (see Fig. 1j), we extracted a gene list for a mouse MAIT cell activation score from a recent publication providing bulk RNAseq data of resting vs. activated mouse MAIT cells<sup>22</sup>. The application of this gene module to the MAIT17 clusters clearly indicated an increase in MAIT cell activation at the late time point of cGN (day 9 vs. day 1 and naïve) and an overall higher activation score in cluster c2 (Fig. 3h).

In summary, these scRNAseq analyses identify a MAIT17 cell cluster in the murine kidney, present in homeostasis, that expands and shows increased activation with the progression of cGN, expressing proinflammatory (IL-17A and ICOS) as well as anti-inflammatory (CTLA4, PD-1, and TGF- $\beta$ ) mediators that might regulate the renal immune response.

### MAIT cells protect from renal tissue damage in experimental cGN

To functionally validate the effect of MAIT cells in renal inflammation, we performed gain- and loss-of-function experiments, comparing the histopathological and clinical outcomes of B6 (low MAIT cell frequency), B6-MAIT<sup>CAST</sup> (4-fold increase in MAIT cell frequency, see Fig. 2a, b), and *Mr1*<sup>-/-</sup> (MAIT cell deficiency) mice in experimental cGN. In severe cGN, increased MAIT cell frequency in B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice (as compared to B6) correlated with significant renal tissue protection with reduced crescent formation, and tubulointerstitial inflammation as indicated by reduced GR-1<sup>+</sup> neutrophil infiltration into the kidney (Fig. 4a, b). While albuminuria was unchanged, we also observed a significant improvement in kidney function in B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice (reduced blood urea nitrogen levels) compared with that in B6 controls (Fig. 4c). As shown in Fig. 2, renal MAIT cell numbers were low in naïve B6 mice but we could demonstrate a 4–5-fold inflammation-induced increase at day 9 of cGN (Supplementary Fig. 5). In line with the hypothesis that MAIT cells have regulatory functions, the comparison of nephritic B6 mice with *Mr1*<sup>-/-</sup> mice in cGN of moderate severity revealed significant aggravation of histopathological and clinical parameters (Fig. 4d–f), indicating that even the low numbers of MAIT cells in B6 mice might limit renal tissue damage.



**Fig. 3 | Kidney mucosal-associated invariant T (MAIT) 17 cells express pro- and anti-inflammatory mediators in experimental crescentic**

**glomerulonephritis (cGN).** **a** Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) dimensionality reduction (resolution 0.2) of pooled single-cell RNA sequencing data of MR1 tetramer (5-OP-RU)<sup>+</sup> MAIT cells isolated by flow cytometric cell sorting from kidneys of naïve B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice and on day 1 and 9 after induction of cGN (naïve  $n = 18$ , cGN day 1  $n = 11$ , cGN day 9  $n = 13$ ;  $n$  represents the number of biologically independent, male, 9–14 week-old mice that were pooled for the isolation). Seven clusters were identified and named according to cluster defining genes and expression of selected marker genes. **b** Heat map of normalized marker gene expression of the indicated clusters. **c** UMAP plots showing expression

of MAIT cell-defining genes (upper panels) and MAIT17 cell markers in the identified clusters. **d** Contribution of different MAIT cell clusters to the dataset. Numbers below the bars indicate total number of MAIT cells analyzed for each time point. **e** Volcano plot of differential gene expression in MAIT17 clusters 1 and 2. **f** Gene expression of all interleukins expressed in the data set and other selected cytokines in MAIT17 cluster 1 and 2. **g** Expression of selected cytokine genes in MAIT17 clusters 1 and 2 at the different time points. **h** Expression of an uncured gene signature defining in vivo activated murine MAIT cells (MAIT cell activation score (Hinks et al.<sup>23</sup>)) in MAIT cell clusters 1 and 2 at the different time points. One-way ANOVA was used for statistical analysis followed by a post hoc analysis with Newman-Keuls test for multiple comparisons.

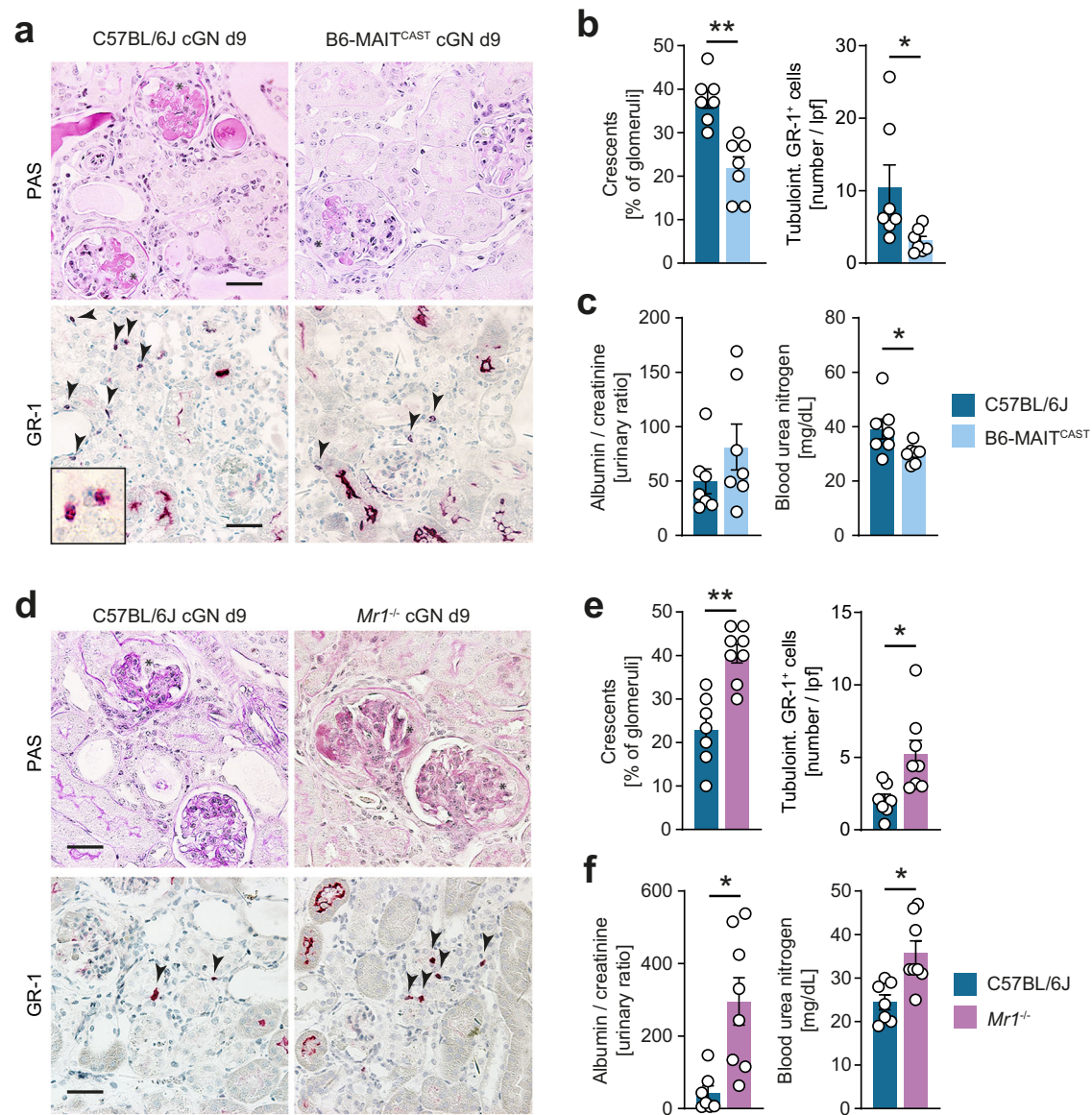
### Blocking MR1-dependent MAIT cell activation does not influence the course of experimental cGN

To determine whether the protective MAIT cell activation requires TCR–MR1 interaction, we performed MR-1 blockade experiments by applying an  $\alpha$ -MR1 antibody<sup>36</sup> to C57BL/6 (Supplementary Fig. 6) and B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice (Supplementary Fig. 7) with cGN. The application of this antibody did not significantly alter the histopathological or clinical outcome of cGN in either strain, as measured by crescent formation, tubulointerstitial inflammation, blood urea nitrogen levels, and

albuminuria. These data suggest that in the cGN model, in which microbe-derived MAIT-TCR ligands are presumably absent, other TCR-independent pathways for MAIT cell activation, such as stimulation via cytokine receptors, might be predominant.

### Immunomodulatory MAIT17 cells interact with proinflammatory mononuclear phagocytes in experimental cGN

To understand the mechanisms that govern MAIT cell responses within the kidney, we studied their intrarenal location in murine cGN in



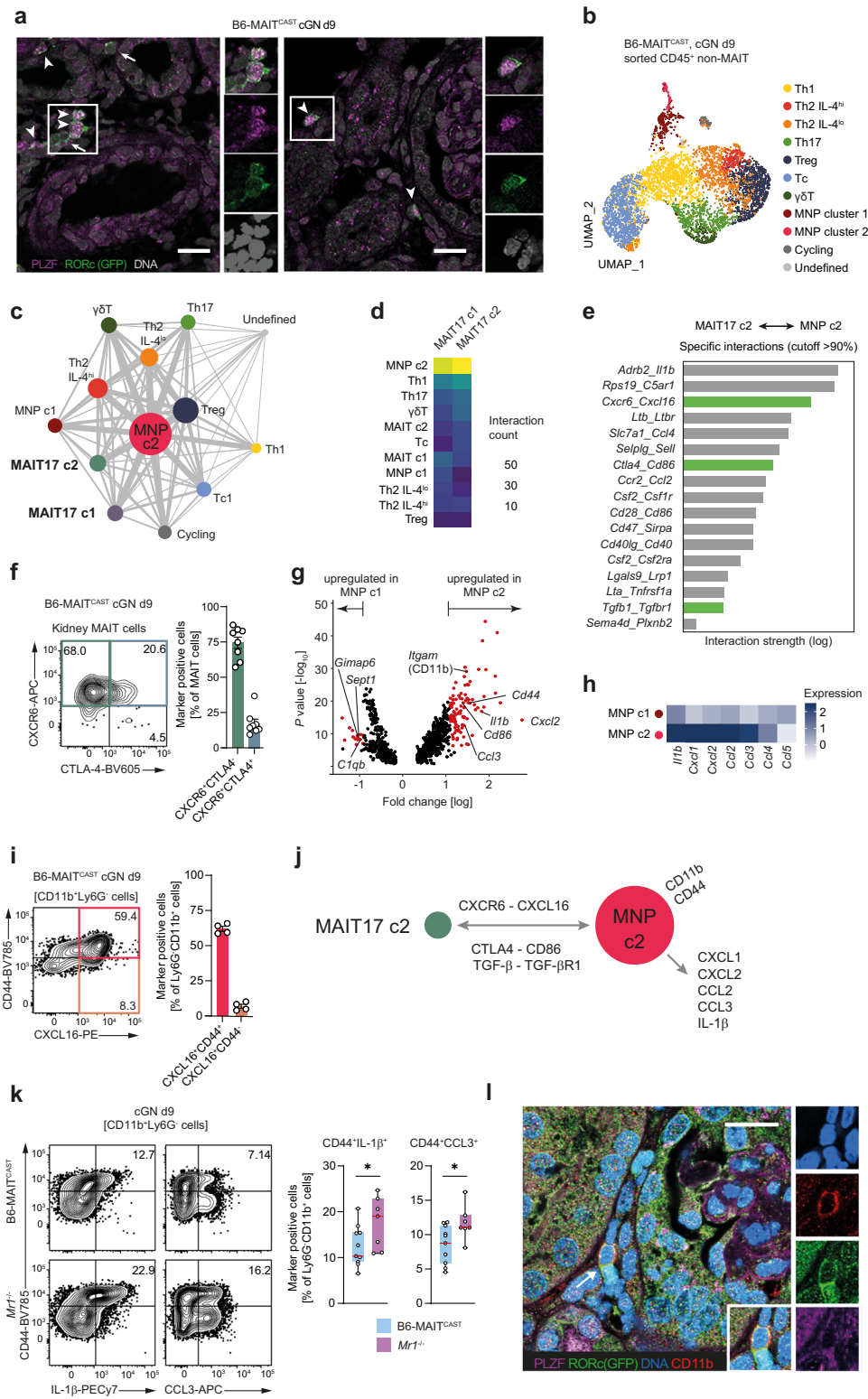
**Fig. 4 | Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells protect from renal tissue damage in experimental crescentic glomerulonephritis (cGN).** **a** Representative photomicrographs of kidney sections from C57BL/6J wild type and B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice on day 9 of cGN stained with periodic acid-Schiff (PAS) (upper panel) and immunohistochemistry for the neutrophil marker GR-1 (lower panel). Asterisks mark glomerular crescents, arrow heads mark neutrophils in the tubulointerstitial area. **b** Quantification of crescent formation and tubulointerstitial neutrophil infiltration (C57BL/6J wild type  $n = 7$ , B6-MAIT<sup>CAST</sup>  $n = 7$ ;  $n$  represents the number of biologically independent animals). **c** Kidney function parameters in C57BL/6J wild type and B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice (groups as in **b**). Data in (**a–c**) are representative for three independent experiments. **d** Representative PAS and

GR-1 stainings of kidney sections from C57BL/6J wild type and Mr1<sup>-/-</sup> mice on day 9 of cGN. Asterisks mark glomerular crescents, arrow heads mark neutrophils in the tubulointerstitial area. **e** Quantification of crescent formation and tubulointerstitial neutrophil infiltration (C57BL/6J wild type  $n = 7$ , Mr1<sup>-/-</sup>  $n = 8$ ;  $n$  represents the number of biologically independent animals). **f** Kidney function parameters in C57BL/6J wild type and Mr1<sup>-/-</sup> mice (C57BL/6J wild type  $n = 7$ , Mr1<sup>-/-</sup>  $n = 8$ ;  $n$  represents the number of biologically independent animals). Data in (**d–f**) are representative for two independent experiments. Scale bar represents 20  $\mu$ m. Symbols represent individual animals. Bars represent mean  $\pm$  SEM. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  in two-sided Student's  $t$  test). Source data are provided as a Source Data file.

B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice. Using immunofluorescence staining for PLZF and RORc-GFP, we could clearly identify PLZF<sup>+</sup>RORc<sup>+</sup> MAIT cells in the kidney that were mainly located in the tubulointerstitial and periglomerular infiltrates (Fig. 5a). These infiltrates are a histopathological hallmark of human and experimental cGN<sup>2</sup>.

To identify the immune cell types within these infiltrates that interact with MAIT cells, we isolated CD45<sup>+</sup> non-MAIT cells from the kidney at day 9 of cGN and performed scRNAseq. Unsupervised UMAP clustering of the data of 5271 cells retrieved from these analyses identified seven T cell subsets and two major myeloid cell subtypes that were labeled according to their expression of cluster-

defining genes and selected leukocyte subset markers (Fig. 5b and Supplementary Fig. 8A, B). Based on these clusters and the two predominant MAIT17 cell clusters in nephritic kidneys identified in Fig. 3, we calculated the interactome of all immune cells found in the kidney in experimental cGN using the CellPhone database<sup>37,38</sup>. The network analyses of transcriptome-based ligand–receptor interactions between cell types showed a node of mononuclear phagocytes (MNP) at the center that was characterized by a high number of potential interactions with different T cell subsets (Fig. 5c). Interestingly, the MAIT17 c2 cell cluster, previously identified to express cell contact-dependent anti-inflammatory



molecules, demonstrated a high number of interactions with this MNP cluster c2, much more than for example with MNP cluster c1 or other T cell subsets (Fig. 5c, d). We therefore decided to investigate the specific interactions of MAIT17 c2 with MNP c2 more closely. After removing unspecific interactions (cut off 90%), 17 interactions with a strength >1 remained, three of which were well-described immunosuppressive pathways that had previously been reported to suppress inflammation in murine models of cGN (Fig. 5e)<sup>35,39,40</sup>. Indeed, the expression of the top two hits in these analyses, CXCR6

and CTLA-4, on murine MAIT cells could be confirmed on protein basis by flow cytometry (Fig. 5f).

Next, we performed differential expression analysis of MNP c2 vs. MNP c1 which indicated that MNP c2 cells express high levels of *Cd11b*, *Cd44*, and *Cd86* (an interaction partner of CTLA-4), as well as the proinflammatory mediators *Cxcl2*, *Ccl3*, and *Il1b* (Fig. 5g, h). Moreover, flow cytometry confirmed that CD11b<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> MNPs expressed high levels of CXCL16 (the ligand for CXCR6) (Fig. 5i). The gating strategy for analysis CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> MNP in mice is depicted in Supplementary

**Fig. 5 | Immunomodulatory mucosal-associated invariant T (MAIT) 17 cells interact with proinflammatory monocytes in experimental crescentic glomerulonephritis (cGN).** **a** Representative immunofluorescence staining for identification of PLZF<sup>+</sup>RORc<sup>+</sup> MAIT17 cells in kidney sections of RORc-GFP B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice on day 9 after cGN induction (representative for  $n = 3$  biologically independent animals). **b** Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) dimensionality reduction (resolution 0.5) of single-cell RNA sequencing data of CD45<sup>+</sup> non-MAIT cells isolated by flow cytometric cell sorting from kidneys of B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice on 9 after induction of cGN. The 11 clusters were named according to cluster defining genes and expression of selected marker genes. **c** Interaction network based on ligand–receptor interactions between all CD45<sup>+</sup> cell clusters identified in kidneys of B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice with cGN (pooled non-MAIT cell and MAIT cell data sets). Dot size represents the number of total significant interactions with other clusters and line thickness represents number of interactions between individual clusters. **d** Heatmap showing the absolute number of significant interactions between the indicated cell clusters. **e** List of top ligand–receptor interactions between MAIT17 cluster 2 and mononuclear phagocyte (MNP) cluster 2 filtered for interaction strength ( $>1$ ) and specificity ( $>90\%$ ). Interaction pathways that have been implicated in amelioration of cGN are marked in green. **f** Representative flow cytometry plot and quantification of CXCR6 and CTLA4 expression in kidney MAIT cells of B6-MAIT<sup>CAST</sup> (cGN day 9,  $n = 8$  biologically independent animals).

**g** Volcano plot of differential gene expression between MNP clusters 1 and 2. Significantly upregulated genes are marked in red. **h** Normalized gene expression heatmap of proinflammatory cytokines and chemokines MNP clusters 1 and 2. **i** Representative flow cytometry plot and quantification of CXCL16 and CD44 expression (after restimulation with PMA/ionomycin) in kidney CD11b<sup>+</sup> MNPs from B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice (cGN day 9,  $n = 4$  biologically independent animals). **j** Hypothetic working model for interaction between MAIT17 cluster 2 and MNP cluster 2 based on the interactome analysis. **k** Representative flow cytometry plots and quantification of IL-1 $\beta$  and CCL3 production (after restimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate/ionomycin) by CD11b<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> MNPs in the kidney of B6-MAIT<sup>CAST</sup> and *Mr1*<sup>-/-</sup> mice with cGN (day 9, B6-MAIT<sup>CAST</sup>  $n = 11$  biologically independent animals, *Mr1*<sup>-/-</sup>  $n = 7$  biologically independent animals). **l** Representative immunofluorescence staining of MAIT17 cells located in close proximity to CD11b<sup>+</sup> mononuclear phagocytes (arrow) in kidney sections of B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice (cGN day 9, representative for  $n = 3$  biologically independent animals). Data in **(f)** and **(k)** are pooled from two independent experiments. Data in **(a, l)** are representative for two independent experiments with  $n = 3$  biologically independent animals with similar results. Scale bar represents 15  $\mu\text{m}$ . Circles in bar graphs represent individual animals and bars represent mean  $\pm$  SEM. ( $*p < 0.05$  in two-sided Student's *t* test). Source data are provided as a Source Data file.

Fig. 3C. These interactome analysis defined a working model, where the CXCR6–CXCL16 axis acts as a co-localization signal of MAIT17 cells toward proinflammatory MNPs in the kidney, resulting in MNP suppression, perhaps through MAIT cell-expressed CTLA-4 and/or TGF- $\beta$  (Fig. 5j).

In line with this model, further flow cytometric analyses demonstrated high expression of IL-1 $\beta$  and CCL3 in this CD11b<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> MNP subset and showed that expression of these proinflammatory mediators in CD44<sup>hi</sup> MNPs was increased in the absence of MAIT cells (Fig. 5k). A similar trend of MAIT cell-dependent regulation of these myeloid cell-expressed proinflammatory cytokines identified in Fig. 5g was observed in total mRNA expression in the kidney cortex (Supplementary Fig. 9). Finally, direct interaction of CD11b<sup>+</sup> cells with PLZF<sup>+</sup>RORc-GFP<sup>+</sup> MAIT cells in the periglomerular infiltrates was confirmed by immunofluorescence analyses (Fig. 5l). In summary, these findings supported the interactome-based working model in which MAIT cells may mediate suppression of proinflammatory MNP functions in cGN.

### Attenuation of cGN by MAIT cells depends on the CXCL16–CXCR6 axis

To further validate this working model, we decided to interrupt the CXCR6–CXCL16 axis in mice with cGN by injection of a CXCL16-blocking antibody<sup>41</sup> (experimental scheme in Fig. 6a). As described above (see Fig. 4), isotype-treated B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice were protected from cGN and developed only mild disease, while isotype-treated *Mr1*<sup>-/-</sup> mice showed aggravated disease. CXCL16 blockade increased the percentage of crescents in B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice to a level similar to that observed in *Mr1*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 6b, c), confirming that the CXCL16–CXCR6 interaction is necessary for MAIT cell-mediated protection against cGN. We previously reported that cGN is aggravated in CXCR6<sup>-/-</sup> mice, which we had attributed to a protective effect of CXCR6<sup>+</sup> NKT cells<sup>40</sup>. To clarify to which extent these cells were involved, we antagonized CXCL16 also in MAIT cell-deficient *Mr1*<sup>-/-</sup> mice with cGN. In these experiments, tissue damage was not significantly higher in  $\alpha$ -CXCL16-treated *Mr1*<sup>-/-</sup> mice compared to  $\alpha$ -CXCL16-treated B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice and comparable to the level of *Mr1*<sup>-/-</sup> mice without CXCL16 blockade (Fig. 6b, c), which might indicate that MAIT cells mediated the major part of the protective effect of the CXCR6–CXCL16 axis.

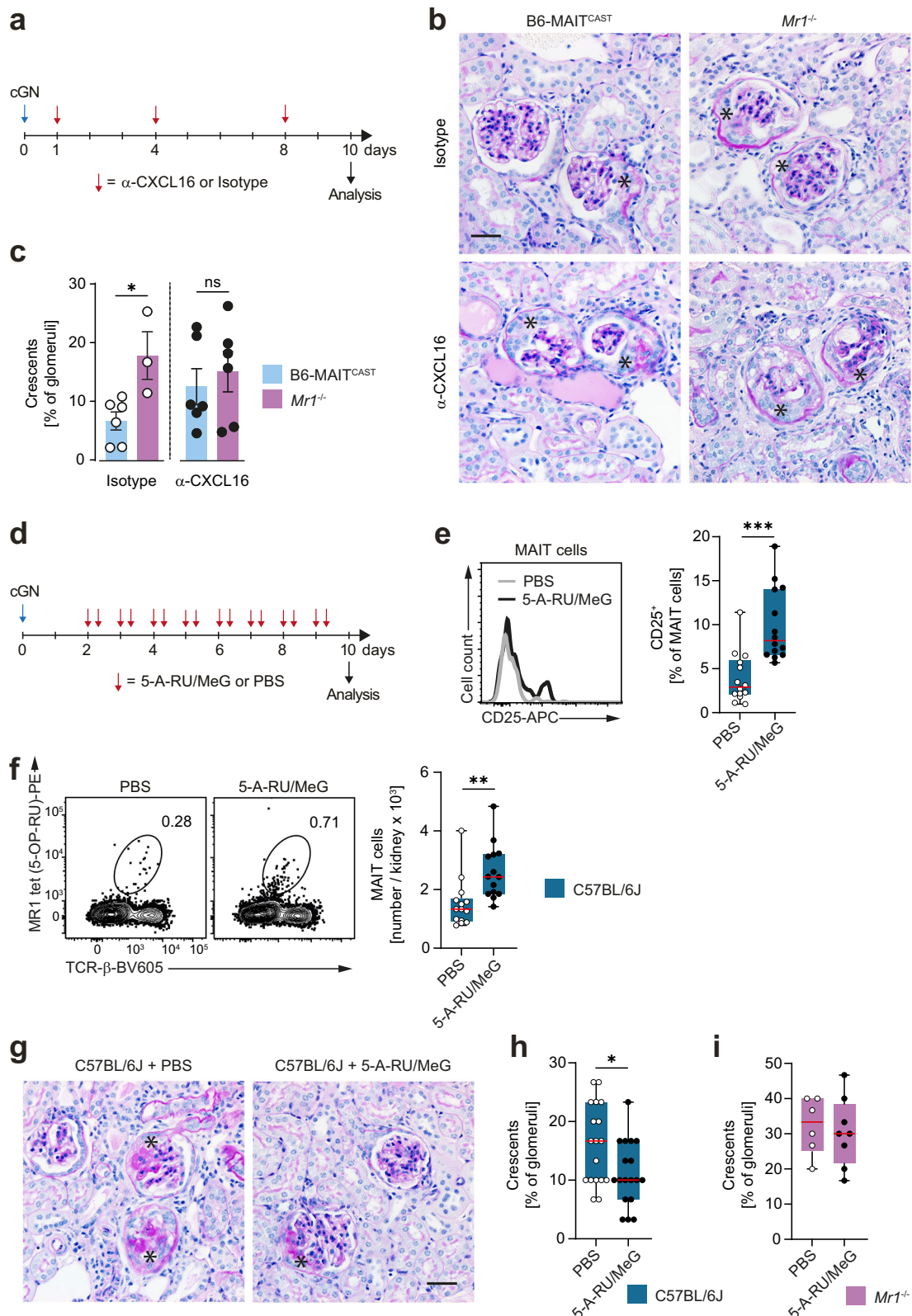
### Pharmacological MAIT cell activation mitigates crescentic glomerulonephritis

Finally, we asked whether our findings allow for therapeutic translation. To this end, we decided to activate and expand MAIT cells in vivo

by treating mice with the synthetic MAIT TCR ligand, 5-amino-6-D-ribitylaminoouraci (5-A-RU)/methylglyoxal<sup>42,43</sup>. We modified and optimized existing protocols for chemical synthesis of this ligand by devising new purification protocols that showed a yield of 5-A-RU in 72% purity over six steps (see Supplementary Methods) and allowed the use of commercially available chemicals. This protocol proved robust and reliable and the obtained yield compared favorably to previous approaches<sup>44–46</sup>. We injected our 5-A-RU/MeG compound at a previously titrated concentration of 100 nmol per day into C57BL/6 mice (Supplementary Fig. 10), starting from day 2 after induction of cGN, to mimic the clinically more relevant situation of treating ongoing disease rather than treating disease initiation (experimental scheme in Fig. 6d). This treatment activated intrarenal MAIT cells, as indicated by their increased expression of the activation marker CD25, and expanded their numbers by 2–3-fold (Fig. 6e, f). We noted a moderate, but significant improvement of histopathological tissue injury in C57BL/6 wild type mice with cGN (Fig. 6g, h), supporting the principal idea that MAIT cell expansion might be protective in experimental cGN and might therefore represent a promising therapeutic strategy in cGN. Of note, the protective effect of 5-A-RU/MeG application (same experimental setup as in Fig. 6d) was not observed in *Mr1*<sup>-/-</sup> mice, arguing against potential off-target effects of 5-A-RU/MeG or its metabolic products (Fig. 6i). However, the protection mediated by application of 5-A-RU/MeG to B6 wild type mice was not as robust as that observed in MAIT cell-enriched B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice when compared to B6 mice (see Fig. 4) which might be explained by a potential 5-A-RU-induced activation of proinflammatory MAIT17 activity<sup>47</sup> that might partially counteract their protective effect in cGN.

## Discussion

MAIT cells have recently gained much attention in inflammatory and infectious diseases of many organs, but their role in kidney disease has not been addressed yet. Here we report the first detailed single cell transcriptomic profiling of MAIT cells in a peripheral organ, the kidney, under noninflamed conditions and during a non-infectious IMID. Previous studies had used flow-cytometry to describe MAIT cells with a tissue-resident phenotype in human kidney tissue<sup>27–29</sup>. We identified intrarenal MAIT cells bearing an activated MAIT17 phenotype in human kidney tissue from healthy individuals and from patients with ANCA-GN<sup>31</sup>. This contrasts the situation in the lung, where both MAIT17 and MAIT1 subsets were detected in the bronchoalveolar lavage fluid of lungs from patients with bacterial and COVID19 pneumonia<sup>32,48</sup>. In most mouse tissues, including secondary lymphoid organs, liver, lung,



colon, and skin, MAIT17 cells are abundant, but MAIT1 cells are also present, and both subsets share a tissue-resident transcriptomic fingerprint with other innate-like T cells, such as NKT1 and NKT17 cells<sup>49</sup>. Also in kidneys of MAIT cell-enriched B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice, we found a population of MAIT cells very similar in size and composition to that of the human kidney, again with a large majority being ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> IL-17A-producing MAIT17 cells bearing a tissue-resident phenotype.

Single cell transcriptomic profiling of intrarenal MAIT cells also provided insights into potential effector functions of these intrarenal MAIT17 cells in experimental murine cGN. We noted that the MAIT17 cell subset was expanded and activated during kidney inflammation. Interestingly, in addition to producing proinflammatory IL-17A, this subset was characterized by high expression of potential anti-inflammatory mediators, such as CTLA4, PD-1, and TGF- $\beta$ . Indeed,

**Fig. 6 | CXCL16 blockade abrogates protective effect of mucosal-associated invariant T (MAIT) cells and pharmacological MAIT cell activation ameliorates experimental crescentic glomerulonephritis (cGN).** **a** Schematic representation of experimental setup for  $\alpha$ -CXCL16 treatment in cGN. **b** Representative photomicrographs of periodic acid-Schiff-stained kidney sections from isotype- and  $\alpha$ -CXCL16-treated B6-MAIT<sup>CAST</sup> and *Mr1*<sup>-/-</sup> mice on day 10 of cGN. **c** Quantification of crescent formation in the respective groups of mice (B6-MAIT<sup>CAST</sup> + Isotype  $n = 6$ , *Mr1*<sup>-/-</sup> + Isotype  $n = 3$ , B6-MAIT<sup>CAST</sup> +  $\alpha$ -CXCL16  $n = 6$ , *Mr1*<sup>-/-</sup> +  $\alpha$ -CXCL16  $n = 6$ ,  $n$  represents biologically independent animals for each group). Data are pooled from two independent experiments. **d** Schematic representation of experimental setup for 5-A-RU/MeG treatment in cGN. **e** Representative histogram and quantification of CD25 expression in PBS- and 5-A-RU/MeG-treated C57BL/6j wild type mice with cGN. (day 10, PBS  $n = 14$ , 5-A-RU/MeG  $n = 14$ ,  $n$  represents biologically independent animals for each group). **f** Representative flow cytometry plots and quantification

of MAIT cells in kidneys of PBS- and 5-A-RU/MeG-treated C57BL/6j wild type mice with cGN (day 10, PBS  $n = 14$ , 5-A-RU/MeG  $n = 14$ ,  $n$  represents biologically independent animals for each group). Data in **(e and f)** are pooled from three independent experiments with similar results. **g** Representative photomicrographs of periodic acid-Schiff-stained kidney sections from PBS- and 5-A-RU/MeG-treated C57BL/6j wild type on day 10 of cGN. Quantification of crescent formation in PBS- and 5-A-RU/MeG-treated C57BL/6j wild type mice **(h)** and *Mr1*<sup>-/-</sup> mice **(i)** with cGN (wild type day 10, PBS  $n = 18$ , 5-A-RU/MeG  $n = 18$ , *Mr1*<sup>-/-</sup> day 10, PBS  $n = 6$ , 5-A-RU/MeG  $n = 8$ ;  $n$  represents biologically independent animals for each group). Data in **(f)** are pooled from four independent experiments and data in **(i)** are pooled from two independent experiments. Asterisks mark glomerular crescents. Scale bar represents 20  $\mu$ m. Circles represent individual animals and bars represent mean  $\pm$  SEM (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  in two-sided Student's *t* test). Source data are provided as a Source Data file.

several gain- and loss-of-function experiments, indicated that MAIT cells might attenuate tubulointerstitial inflammation and crescent formation in experimental cGN and improve the clinical outcome. Previous studies reported that MAIT cells attenuated tissue damage in some IMID models, e.g., experimental autoimmune encephalomyelitis<sup>24</sup> and type 1 diabetes in non-obese diabetic mice<sup>25</sup>. By contrast, MAIT cells aggravated disease in other IMID models, such as collagen-induced arthritis<sup>50</sup> and the *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>*Yaa* lupus model<sup>30</sup>. These variable outcomes highlight the context- and tissue-dependent role of MAIT cells in experimental models and the functional role of MAIT cells in kidney inflammation had not been studied so far.

The mechanisms proposed for these divergent roles included for example regulation of systemic B cell<sup>24,30</sup> or T cell responses<sup>30,50</sup>, or altered gut barrier function<sup>25</sup>. In our study, MAIT cells did not act systemically as in these reports, but locally within the kidney. To identify these local mechanisms, we performed an unsupervised immune cell interactome analysis on our single-cell transcriptome dataset of intrarenal immune cells as recently described<sup>32</sup>. This revealed potential interactions of activated MAIT17 cells with a proinflammatory MNP subset. Three of the top 20 interaction partners were immunosuppressive and have previously been described to ameliorate cGN: CTLA4-CD86, TGF- $\beta$ 1-TGF- $\beta$ R1, and CXCR6-CXCL16<sup>35,39,40</sup>. We hypothesized that CXCR6<sup>+</sup> MAIT cells were attracted to CXCL16-producing inflammatory MNPs and employ CTLA4 and/or TGF- $\beta$ 1, and potentially other mediators, to dampen their activation, a step previously shown to be essential in the progression of experimental cGN<sup>34,51</sup>. This model is consistent with studies in other organs, reporting interaction of MAIT cells with proinflammatory MNPs<sup>26,52</sup>, with a study reporting that the CXCR6-CXCL16 axis affects MAIT cell migration<sup>53</sup>, and with the expression of CTLA4<sup>54</sup> and TGF- $\beta$ <sup>55</sup> by MAIT cell subsets. We provided further support for this model by demonstrating that intrarenal MAIT cells indeed colocalize with CD11b<sup>+</sup> MNP in periglomerular infiltrates and by showing that MNP displayed an activated and proinflammatory phenotype when MAIT cells were absent, as predicted by our interactome analysis.

We next aimed to provide functional evidence for a protective role of the MAIT-MNP interaction. As described above, the interactome predicted multiple candidate suppressive pathways, suggesting that blocking just one of these interaction pairs might not be effective enough for significant changes. Instead, we reasoned that interrupting MAIT-MNP colocalization by blocking the CXCR6-CXCL16 axis might be able to target all downstream candidate suppressive pathways. Indeed, blocking this axis was sufficient to impair renal tissue protection in the presence of increased MAIT cell numbers (B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice), supporting our hypothesis. Other protective cells in cGN, especially NKT cells, might contribute to the protective effect of the CXCR6-CXCL16 pathway<sup>40</sup>, but these were not the major players, as indicated by the lack of an effect of the CXCL16 blockade in MAIT-cell-deficient mice.

In summary, we show in two ways that increasing MAIT cell numbers attenuates disease and in two other ways that decreasing their numbers or function aggravates disease and support it with single cell transcriptomics. A limitation of our study is the infeasibility to support the protective effect of MAIT cells by adoptive transfer experiments. Adoptive transfers of MAIT cells have been successfully performed in immunocompromised hosts, e.g., *Cd3*<sup>-/-56</sup> or *Rag*<sup>-/-</sup>*Il2rg*<sup>-/-57</sup>, in which our cGN model does not develop. In addition, strategies for transfer of MAIT cells into MAIT cell-deficient *Mr1*<sup>-/-</sup> mice have recently been reported for investigating brain homeostasis<sup>58</sup>, cancer<sup>59</sup>, and bacterial infection<sup>60</sup>. However, despite extensive experimental attempts, similar transfer strategies were insufficient to reconstitute kidney MAIT cell populations in *Mr1*<sup>-/-</sup> mice in our hands. Therefore, identifying the mechanism for MAIT cell-mediated renal tissue protection would require developing genetic tools to selectively delete potential suppressive mediators (e.g., CTLA4, TGF- $\beta$ ) from MAIT cells in future studies.

Based on these mechanistic findings, we speculated that pharmacological MAIT cell activation might be a therapeutic approach in cGN. Several synthetic MAIT cell ligands have been described, and 5-A-RU/MeG is the most widely studied and potent of them<sup>43</sup>. To obtain the considerable doses of that ligand for treating mice twice daily over extended periods, we optimized existing methods to improve yield and purity. Treatment with our ligand indeed ameliorated the hallmark histological features of cGN in wild type mice, but not in *Mr1*<sup>-/-</sup> mice, ruling out potential off-target effects of 5-A-RU/MeG or its metabolic products. Despite this proof of concept, clinical parameters for kidney function were less improved than in B6-MAIT<sup>CAST</sup> mice, which may be explained by the very short half-life of the ligand, limiting its protective activity in vivo<sup>61</sup>. Another explanation for the limited protective activity of the ligand in vivo, might be the activation of proinflammatory properties of MAIT17 cells by TCR stimulation, which would be consistent with previous studies showing increased IL-17A production in other organs and in vitro after 5-A-RU/MeG treatment<sup>47,53</sup>. In cGN, IL-17 can aggravate the early phases of disease by recruiting neutrophils to the inflamed kidney<sup>62,63</sup>. Several approaches to enhance TCR ligand-mediated MAIT cell activation in vivo by adding proinflammatory cytokines, e.g., IL-23, or TLR agonists have been reported<sup>64,65</sup>. However, these inflammatory mediators are potent aggravating factors in cGN and other autoimmune models<sup>66,67</sup>, precluding their use to enhance protective MAIT cells functions in this context.

These considerations argue against 5-A-RU/MeG alone as a therapeutic option, but it might be effective in a combination therapy with established immunosuppressive medications. Moreover, distinct TCR ligands for NKT cells have been produced that selectively induce a Th1- or Th2-polarization bias<sup>68</sup>. The hypothetical development of such functionally biased MAIT cell TCR ligands that do not induce proinflammatory MAIT17 activity, but instead promote their anti-inflammatory properties, warrants further study.

In summary, we demonstrate here that a MAIT17 population with anti-inflammatory properties resides in the murine and human kidney and gets activated during cGN. Transcriptomic profiling, interactome analyses and in vivo functional validation of the predicted pathways suggest interaction of MAIT17 cells with proinflammatory myeloid cell populations in the kidney via the CXCR6–CXCL16 axis, resulting in suppression of myeloid cell tissue destructive capacity. The pharmacological targeting of MAIT cells, described here, might help to develop MAIT-cell-based interventions for the treatment of cGN and perhaps of further IMIDs. Such therapies based on vitamin derivatives might synergize with established immunosuppressive and anti-inflammatory therapies.

## Methods

### Human material

Human studies were approved by the local ethics committee of the chamber of physicians in Hamburg (Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg, approval number PV 5822), and were conducted in accordance with the ethical principles stated by the Declaration of Helsinki. Human kidney cortex specimen and blood samples were obtained from patients that underwent partial nephrectomy because of suspected renal carcinoma after written informed consent. Human samples were provided in an anonymized fashion, precluding the analysis of age- and gender-related effects. Samples of macroscopic healthy, tumor-free kidney cortex were excised from the residual tissue that was not needed for diagnostic purposes. Further blood samples were drawn from healthy volunteers after written informed consent.

### Animals

B6.129P2-Mr1<sup>tm1Gfn</sup> (*Mr1*<sup>-/-</sup>)<sup>6</sup> and B6(Cg)-Mait<sup>hi</sup>Rorc<sup>tm2Litt</sup> (B6-MAIT<sup>CAST</sup>)<sup>33</sup> mice were obtained from Olivier Lantz (Paris, France) and were transferred to and bred in the animal facility of the University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, or in the central animal facility of the University Clinic of Bonn. In all experiments, adult (>8 week-old), sex- and age-matched mice were used. A total of 273 mice (27% female) were used in the experiments presented in Figs. 2–6 and in the Supplementary Information. We preferentially used male mice, as we observe a higher variability with female mice in the cGN model. Although gender-related effects were not formally addressed in this study, the main results were comparable in all experiments, regardless of which sex was used. For detailed information regarding the specific strain, sex, age, and number of all animals in every experiment please refer to the Figure Legends, the Supplementary Information, and the Source Data file provided with this study. All animals were raised under specific pathogen-free conditions in a facility at temperatures of 21–24 °C with 40–70% humidity on a 12 h light/12 h dark cycle. Standard chow and water were provided ad libitum. Experimental mice and controls were bred separately in the same animal facility. Euthanasia was performed by cardiac puncture under deep isoflurane anesthesia. All animal experiments were performed according to national and institutional animal care and ethical guidelines and were approved by the local committees (approval number NO20/2022, Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Freie und Hansestadt Hamburg).

### Induction of experimental crescentic glomerulonephritis and functional analyses

Crescentic glomerulonephritis (cGN) was induced by intraperitoneal injection of nephrotoxic sheep serum (100–200 µl, depending on batch) in adult mice<sup>69</sup>. Of note, severity of the cGN model varies with different batches of nephrotoxic sheep serum. For urine sample collection, mice were housed in metabolic cages for 5 h. Urinary albumin excretion was determined by standard ELISA (Mice-Albumin Kit; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Urinary creatinine levels were measured with the Creatinine Jaffé Fluid (Hengler Analytik, Steinbach,

Germany). Blood urea nitrogen (BUN) was analyzed by standard laboratory procedures.

### Synthesis of 5-A-RU

Benzyl amine was added to a suspension of D-ribose in methanol. After hydrogenation with H<sub>2</sub> over PtO<sub>2</sub>, filtration and concentrating, ethyl acetate was added to crystallize *N*-benzyl-D-ribityl amine. After separation of the crystals, they were again recrystallized using a solution of ethyl acetate/ethanol (3:1) to receive *N*-benzyl-D-ribityl amine. The solution of *N*-benzyl-D-ribityl amine in methanol was hydrogenated with H<sub>2</sub> over 10% Pd/C and dried after filtration to obtain an oil of D-ribityl amine. This was boiled together with 6-chlorouracil in H<sub>2</sub>O under reflux. Ethanol was added to the concentrated solution and the obtained gummy mass was washed and dried. This product was then dissolved in hot water and cooled to 5 °C. NaNO<sub>2</sub> as well as a solution of acetic acid was added. After evaporating the product to dryness, it was dissolved in 0.15 M NH<sub>3</sub> and placed on a Dowex 1-X8 200-400 (Cl-form) column. The column was washed with H<sub>2</sub>O and 0.01 M formic acid. 0.1 M formic acid was placed on the anion exchange resin and the red percolate was collected and concentrated. The residue was crystallized and nitroso-6-D-ribitylaminouracil was obtained. After dissolving nitroso-6-D-ribitylaminouracil in degassed, pure water it was hydrogenated with H<sub>2</sub> over 10% Pd/C, filtered over a flame-dried plug of Celite<sup>®</sup> placed on a flame-dried filter paper and washed with degassed, pure water. The yellow filtrate was lyophilized under reduced pressure obtaining pure yellow solid 5-A-RU. 5-A-RU was then dissolved in DMSO and diluted in PBS for in vivo studies.

### Treatment with 5-A-RU/MeG

For titration of optimal dosing of the MAIT cell-stimulating ligand, increasing concentrations of 5-A-RU/MeG were applied i.p. twice daily from day 2 to day 9 after induction of cGN (total dose per day: 25, 50, 100, 200 nmol). For therapeutic administration, C57BL/6 wild type and *Mr1*<sup>-/-</sup> mice were injected with 50 nmol 5-A-RU/MeG intraperitoneally twice daily (total dose per day: 100 nmol) from day 2 to day 9 after induction of cGN. Prior to injection, 5-A-RU was mixed with methylglyoxal (Sigma-Aldrich) in a 1:1 ratio. Controls were injected with the same volume of PBS.

### Anti-CXCL16 and anti-MRI treatment

For anti-CXCL16 treatment, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 300 µg anti-CXCL16 (R&D Systems, clone 142417) or Rat IgG2A as isotype control (R&D Systems, clone 20102) on day 1. On day 4 and 8 100 µg of anti-CXCL16 or isotype control was injected intraperitoneally. For anti-MRI treatment, α-MRI antibody (Biolegend, clone 8F2.F9) was administered i.p. 1 day before and on days 3 and 7 after induction of the cGN model at a concentration of 200 µg per injection. IgG1k isotype (200 µg per injection, Biolegend, clone MOPC-21) was used as control and injected in the same manner.

### Cell isolation

For isolation of renal leukocytes, mouse kidneys were cut into small pieces and were enzymatically digested in complete medium (RPMI 1640, 10% Fetal Bovine Serum, 1% HEPES, 1% Penicillin/Streptomycin; all Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) supplemented with Collagenase D (0.4 mg/ml, Roche, Basel, Switzerland) and DNase I (100 µg/ml, Roche) for 45 min at 37 °C while rotating on a MACSmix<sup>®</sup> tube rotator (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). After further dispersion with the gentleMACS<sup>®</sup> dissociator (Miltenyi), leukocytes were purified by Percoll gradient centrifugation (37.5%) (GE Healthcare, Chicago, USA) and further enriched by subsequent erythrocyte lysis with ammonium chloride. After filtration through a 50-µm strainer, cell suspension was ready for further analyses. For leukocyte isolation from the lung, tissue was cut into small pieces and digested in complete medium supplemented with Liberase (0.42 mg/ml, Roche) and DNase I (100 µg/ml, Roche) for 45 min at 37 °C on the MACSmix<sup>®</sup> tube rotator. The cell

suspension was further purified by mashing through a 70- $\mu$ m strainer, followed by a Percoll gradient centrifugation (37.5%) and subsequent erythrocyte lysis as described above. Leukocytes from the liver were isolated by mashing the tissue through a 100- $\mu$ m strainer and further purified by Percoll gradient centrifugation (37.5%) and erythrocyte lysis. For the isolation of splenocytes, the spleen was mashed through a 70- $\mu$ m strainer and a subsequent erythrocyte lysis further enriched the splenocyte population. For the isolation of PBMCs from human patients, blood was drawn into BD Vacutainer® CPT tubes and centrifuged according to the manufacturer's instructions. Tissue processing and leukocyte isolation of human kidney samples were performed similar to the mouse protocol. 0.5–1 g of kidney tissue was used for enzymatic digestion with Collagenase D (0.4 mg/ml, Roche) and DNase I (100  $\mu$ g/ml, Roche) as described above.

### Flow cytometry

To characterize leukocyte subsets, cell suspensions were stained with fluorochrome-coupled antibodies against CD45 (1:200, Biolegend, clone 30-F11), CD3 (1:50, BD Bioscience, clone 145-2C11), CD4 (1:200, Biolegend, clone RM4-5), CD8 (1:400, Biolegend, clone 53-6.7), TCR- $\beta$  (1:200, Biolegend, clone H57-597), TCR- $\gamma\delta$  (1:100, Biolegend or BD Bioscience, clone GL3), CD11b (1:1000, Biolegend, clone MI/70), Ly6G (1:200, Biolegend, clone 1A8), B220 (1:400, Biolegend, clone RA3-6B2), CD69 (1:100, Biolegend, clone HL2F3), CD127 (1:100, Biolegend, clone A7R34), CD103 (1:50, Biolegend, clone 2E7) CD44 (1:100, Biolegend, clone IM7), CXCR6 (1:100, Biolegend, clone SA051D1), CD25 (1:100, Biolegend, clone QA19A49), and IL18R (1:25, Miltenyi or Biolegend, clone REA947). Human cell suspensions were stained with fluorochrome-coupled antibodies against CD45 (1:200, Biolegend, clone HI30), CD3e (1:200, Biolegend, clone OKT3),  $\gamma\delta$ TCR (1:25, Biolegend, clone B1), CD161 (1:50, Biolegend, clone HP-3G10), CD127 (1:200, Biolegend, clone A019D5), CD69 (1:100, Biolegend, clone FN50), IL-18R (1:200, Biolegend, clone H44), ROR $\gamma$ t (1:40, BD Biosciences, clone Q21-559). Nonspecific staining was prevented by incubation with 10% normal mouse serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). Dead cells were stained using LIVE/DEAD Fixable Read Dead Stain Kit (Invitrogen) or Zombie Dye (Biolegend, San Diego, USA). For staining of circulating cells, fluorochrome-coupled CD45.2 antibody (2  $\mu$ g per animal) were intravenously injected 5 min prior to euthanasia. For intracellular staining of cytokines, isolated leukocytes were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (50 ng/ml, Sigma-Aldrich) and ionomycin (1  $\mu$ g/ml, Calbiochem) in the presence of brefeldin A (10  $\mu$ g/ml, Sigma) for 2.5 h at 37 °C. After subsequent surface staining, cells were fixed with formalin (3.7%, Sigma-Aldrich), permeabilized with IGEPAL® CA-630 (0.1%, Sigma-Aldrich), and stained with combinations of antibodies against IL-1 $\beta$  (1:100, Invitrogen, clone NJTEN3), CCL3 (1:100, Invitrogen, clone DNT3CC), CD152 (1:100, Biolegend, clone UC10-4B9), CXCL16 (1:200, BD Bioscience, clone 12-18), IL-17A (1:200, BioLegend, clone TC11-18H10.1), IFN- $\gamma$  (1:200, BioLegend, clone XMGL2), and IL-4 (1:200, BioLegend, 11B11). For staining of MAIT cell cytokine production, the above mentioned protocol was optimized. In brief, stimulation was performed with a lower phorbol 12-myristate 13-acetate concentration (10 ng/ml, Sigma) and unchanged concentrations of ionomycin (1  $\mu$ g/ml, Calbiochem) and brefeldin A (10  $\mu$ g/ml, Sigma) for 4 h at 37 °C. After 2 h, the fluorochrome-coupled 5-OP-RU MRI-tetramer was added to the medium. Next, the surface staining was performed as described above. To maintain GFP reporter signal after permeabilization for intracellular and intranuclear staining, cells were fixed with formalin (3.7%, Sigma-Aldrich) for 15 min at room temperature and subsequently washed with Perm/Wash buffer (Transcription Factor Staining Buffer Set, eBiosciences). Intracellular antibodies against IL-17A (1:200, Biolegend, clone TC11-18H10.1), IFN- $\gamma$  (1:200, Biolegend, clone XMGL2), and IL-4 (1:200, Biolegend, clone 11B11) were diluted in Perm/Wash buffer and cells were incubated over night at 4 °C in the dark.

Intranuclear transcription factor staining of MAIT cells was performed according to the same protocol without prior restimulation by using antibodies against GATA-3 (1:100, BD Bioscience, clone L50-823), T-bet (1:100, Biolegend, clone 4B10), and ROR $\gamma$ t (1:200, BD Bioscience, clone Q31-378). MAIT cell-specific human 5-OP-RU-loaded (1:800, lot 39237, 2018), 6-FP-loaded (1:800, lot 39238, 2018), mouse 5-OP-RU-loaded (1:200, lot 50922, 2020), and 6-FP-loaded (1:200, lot 50921, 2020) MRI-tetramers were provided by the NIH Tetramer Core Facility. Absolute CD45<sup>+</sup> cell numbers in cell suspension were determined by staining with fluorochrome-coupled anti-CD45 combined with cell count beads (CountBright®, Invitrogen). All samples were acquired on a LSRII or FACSymphony flow cytometry (both BD Biosciences) and analyzed with the FlowJo Software (Treestar Inc.).

### Flow cytometry-based cell sorting

MAIT cells from naïve murine kidneys, as well as on days 1 and 9 after induction of cGN were defined as CD11b<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>TCR- $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>TCR- $\beta$ <sup>+</sup>Mr1 tet (5-OP-RU)<sup>+</sup> and sorted with a FACSAria™ Fusion Cell Sorter (BD Biosciences). On day 9 of cGN, renal CD45<sup>+</sup> non-MAIT cells were sorted in parallel. The gating strategy for cell sorting is depicted in Supplementary Fig. 3B.

### scRNA sequencing of murine leukocytes

Single-cell libraries of sorted cells were generated with the 10x Genomics Chromium Single Cell 5'v1.1 reagents kit according to the manufacturer's protocol. The libraries were sequenced on Illumina NovaSeq 6000 with 150 base pairs and paired-end configurations. Transcriptomic data from Mr1 tet(5-OP-RU)<sup>+</sup> MAIT cells (day 1 and day 9 after induction of cGN) and CD45<sup>+</sup> non-MAIT cells (day 9 after induction of cGN) were clustered separately using the FindIntegrationAnchors function and IntegrateData function of Seurat. After exclusion of low quality cells (<200 genes expressed), low expressed genes (expressed in less than 3 cells) and cells with upregulated mitochondrial genes (more than 5% of all reads), unsupervised clustering was performed by standard Seurat workflow. Uniform manifold approximation and projection for dimension reduction (UMAP) calculated for the first 30 principal components was used for dimensionality reduction and plotting. Clusters were assigned using Seurat's FindClusters function with a resolution of 0.2 for MAIT cells and 0.5 for non-MAIT cells. Genes for the murine MAIT cell activation score were obtained from the dataset of Hinks et al.<sup>22</sup> by extracting significantly upregulated genes from the differential expression analysis between murine MAIT cells in acute infection and uninfected CD8<sup>+</sup>CD44<sup>lo</sup>CD62<sup>hi</sup> cells and generated by using the AddModuleScore function with default parameters. Differential expression analyses between cell clusters was performed with the FindAllMarkers function of Seurat. Interactome analysis was performed using CellPhoneDB (<https://www.cellphonedb.org/>). The normalized expression matrices of murine MAIT cells and other CD45<sup>+</sup> were merged and analyzed. Since the database works with human genes, mouse genes were translated into their human homologs. Mouse genes without a human homolog were omitted. For analysis, protein-protein interactions with more than two proteins were excluded. We used the layout.fruchterman.reingold function of the R package iGraph in combination with the plot function to plot the number of significant interactions between the clusters.

### Analysis of published scRNAseq dataset

Human MAIT cell-defining genes were determined in a single-cell sequencing dataset from blood of COVID-19 and bacterial pneumonia patients<sup>32</sup> using the FindMarkers function of the R package Seurat (v.4.0.0). The 20 differentially expressed genes with the lowest adjusted *p* value were then used as MAIT cell score in a dataset of sorted kidney CD3<sup>+</sup> T cells of patients with ANCA-GN and healthy controls<sup>31</sup>. For Fig. 1c, cells with a MAIT cell score above 0.45 were highlighted. For the human MAIT cell activation score, significantly

upregulated genes of in vitro 5-OP-RU-activated human MAIT cells compared to naïve MAIT cells were used from a dataset of Hinks et al.<sup>22</sup>. The scores were generated using AddModuleScore function with default parameters of the R package Seurat.

### Real-time RT-PCR

Total RNA of the renal cortex was prepared according to standard laboratory methods. After reverse transcription to cDNA, real-time PCR was performed for 45 cycles (initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, and primer annealing and elongation at 60 °C for 1 min) with 1 µl of cDNA samples in the presence of 0.5 µl of specific murine primers (CXCL2 Mm00436450\_m1; CCL3 Mm00441259\_g1; Il1b Mm00434228\_m1; all Thermo Fisher Scientific). TaqMan® Gene Expression Assays and a StepOnePlus Real-Time PCR system (both Thermo Fisher Scientific) were used for quantification of the housekeeping gene (*Hprt1*) and the genes of interest. All samples were run in duplicates.

### Histopathology and immunohistochemistry

Formalin-fixed, paraffin-embedded kidney sections were stained with Periodic acid-Schiff's (PAS) reagent according to standard laboratory procedures. Crescent formation in the cGN model was assessed in 30 glomeruli per mouse. For quantification of interstitial neutrophil cell numbers, paraffin-embedded sections were stained with an antibody directed against the neutrophil marker GR-1 (Ly6 G/C) (1:10,000, NIMP-R14; Hycult Biotech, The Netherlands) and developed with a polymer-based secondary antibody alkaline phosphatase kit (POLAP; Zytomed, Berlin, Germany). GR-1<sup>+</sup> cells were counted in ten low-power fields (original magnification ×200) per section. All histological quantifications were performed in a blinded fashion.

### Immunofluorescence

For immunofluorescence staining, 2.5-µm thick paraffin sections were heated at 98 °C for 20 min in 0.05% citraconic acid anhydride antigen retrieval buffer (pH 7.4). Unspecific binding was blocked with 5% horse serum (Vector Laboratories, USA) and 0.05% triton-X100 PBS. The sections were then incubated with rabbit-anti-GFP (1:1000, Abcam, United Kingdom) and goat-anti-PLZF (1:500, R&D Systems, USA) in 5% horse serum overnight at 4 °C. The staining was visualized using AF488- (anti-goat) and Cy3- (anti-rabbit) conjugated secondary antibodies (1:100; Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) incubated for 30 min at room temperature. For co-localization studies, rat-anti-CD11b (Clone MI/70, Biolegend) with visualization by Cy5 (1:50) was included. DNA was counterstained with Hoechst (Thermo Fisher Scientific, USA). Images of the stained slides were acquired with an LSM 510 Meta confocal microscope using the LSM software (Zeiss, Jena, Germany).

### Statistics and reproducibility

Selection of sample size for animal experiments in the cGN model was based on long-standing experience with the variability of the model. No statistical method was used to predetermine sample size. Animals were randomly assigned to different treatment groups. All animal experiments were performed at least twice with similar results. No data were excluded from the analyses of animal outcome experiments. The investigators were not blinded to allocation during experiments, but all histology samples for assessment of cGN outcome were analyzed in a blinded fashion. The Student's *t* test was used for comparison between two groups. In case of three or more groups, one-way ANOVA was used followed by a post hoc analysis with Newman-Keuls test for multiple comparisons. A *p* value of <0.05 was considered to be statistically significant.

### Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

### Data availability

The sequencing data generated in this study have been deposited to the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through the GEO Series accession number [GSE245302](https://doi.org/10.1038/s41467-023-43269-0). The sequencing data used in Fig. 1 have been published before<sup>31</sup>. All other data generated in this study are provided in the Supplementary Information and/or Source Data file. All other relevant data are available from the corresponding author on request. Source data are provided with this paper.

### References

- Floege, J. & Amann, K. Primary glomerulonephritides. *Lancet* **387**, 2036–2048 (2016).
- Kurts, C., Panzer, U., Anders, H. J. & Rees, A. J. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 738–753 (2013).
- Krebs, C. F. et al. Autoimmune renal disease is exacerbated by S1P-receptor-1-dependent intestinal Th17 cell migration to the kidney. *Immunity* **45**, 1078–1092 (2016).
- Tipping, P. G. & Holdsworth, S. R. T cells in crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1253–1263 (2006).
- Tilloy, F. et al. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J. Exp. Med.* **189**, 1907–1921 (1999).
- Treiner, E. et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* **422**, 164–169 (2003).
- Kjer-Nielsen, L. et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* **491**, 717–723 (2012).
- Reantragoon, R. et al. Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J. Exp. Med.* **210**, 2305–2320 (2013).
- Rahimpour, A. et al. Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MR1 tetramers. *J. Exp. Med.* **212**, 1095–1108 (2015).
- Legoux, F. et al. Molecular mechanisms of lineage decisions in metabolite-specific T cells. *Nat. Immunol.* **20**, 1244–1255 (2019).
- Kurioka, A. et al. MAIT cells are licensed through granzyme exchange to kill bacterially sensitized targets. *Mucosal Immunol.* **8**, 429–440 (2015).
- Koay, H. F. et al. A divergent transcriptional landscape underpins the development and functional branching of MAIT cells. *Sci. Immunol.* **4**, eaay6039 (2019).
- Dusseaux, M. et al. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* **117**, 1250–1259 (2011).
- van Wilgenburg, B. et al. MAIT cells are activated during human viral infections. *Nat. Commun.* **7**, 11653 (2016).
- Ussher, J. E. et al. CD161<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur. J. Immunol.* **44**, 195–203 (2014).
- Toubal, A., Nel, I., Lotersztajn, S. & Lehuen, A. Mucosal-associated invariant T cells and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 643–657 (2019).
- Godfrey, D. I., Koay, H. F., McCluskey, J. & Gherardin, N. A. The biology and functional importance of MAIT cells. *Nat. Immunol.* **20**, 1110–1128 (2019).
- Fazekas, B. et al. Alterations in circulating lymphoid cell populations in systemic small vessel vasculitis are non-specific manifestations of renal injury. *Clin. Exp. Immunol.* **191**, 180–188 (2018).
- Braudeau, C. et al. Persistent deficiency of circulating mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in ANCA-associated vasculitis. *J. Autoimmun.* **70**, 73–79 (2016).
- Leng, T. et al. TCR and inflammatory signals tune human MAIT cells to exert specific tissue repair and effector functions. *Cell Rep.* **28**, 3077–3091.e5 (2019).

21. Lamichhane, R. et al. TCR- or cytokine-activated CD8(+) mucosal-associated invariant T cells are rapid polyfunctional effectors that can coordinate immune responses. *Cell Rep.* **28**, 3061–3076.e5 (2019).
22. Hinks, T. S. C. et al. Activation and in vivo evolution of the MAIT cell transcriptome in mice and humans reveals tissue repair functionality. *Cell Rep.* **28**, 3249–3262.e5 (2019).
23. Miyazaki, Y., Miyake, S., Chiba, A., Lantz, O. & Yamamura, T. Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int. Immunol.* **23**, 529–535 (2011).
24. Croxford, J. L., Miyake, S., Huang, Y. Y., Shimamura, M. & Yamamura, T. Invariant V(alpha)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.* **7**, 987–994 (2006).
25. Rouxel, O. et al. Cytotoxic and regulatory roles of mucosal-associated invariant T cells in type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* **18**, 1321–1331 (2017).
26. Li, Y. et al. Mucosal-associated invariant T cells improve nonalcoholic fatty liver disease through regulating macrophage polarization. *Front. Immunol.* **9**, 1994 (2018).
27. Dornieden, T. et al. Signatures and specificity of tissue-resident lymphocytes identified in human renal peritumor and tumor tissue. *J. Am. Soc. Nephrol.* **32**, 2223–2241 (2021).
28. Law, B. M. P. et al. Human tissue-resident mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in renal fibrosis and CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **30**, 1322–1335 (2019).
29. Terpstra, M. L. et al. Tissue-resident mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in the human kidney represent a functionally distinct subset. *Eur. J. Immunol.* **50**, 1783–1797 (2020).
30. Murayama, G. et al. A critical role for mucosal-associated invariant T cells as regulators and therapeutic targets in systemic lupus erythematosus. *Front. Immunol.* **10**, 2681 (2019).
31. Krebs, C. F. et al. Pathogen-induced tissue-resident memory TH17 (TRM17) cells amplify autoimmune kidney disease. *Sci. Immunol.* **5**, eaba4163 (2020).
32. Zhao, Y. et al. Clonal expansion and activation of tissue-resident memory-like Th17 cells expressing GM-CSF in the lungs of severe COVID-19 patients. *Sci. Immunol.* **6**, eabf6692 (2021).
33. Cui, Y. et al. Mucosal-associated invariant T cell-rich congenic mouse strain allows functional evaluation. *J. Clin. Invest.* **125**, 4171–4185 (2015).
34. Hochheiser, K. et al. Exclusive CX3CR1 dependence of kidney DCs impacts glomerulonephritis progression. *J. Clin. Invest.* **123**, 4242–4254 (2013).
35. Huang, X. R., Chung, A. C., Zhou, L., Wang, X. J. & Lan, H. Y. Latent TGF-beta1 protects against crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 233–242 (2008).
36. Wang, H. et al. MAIT cells protect against pulmonary Legionella longbeachae infection. *Nat. Commun.* **9**, 3350 (2018).
37. Efremova, M., Vento-Tormo, M., Teichmann, S. A. & Vento-Tormo, R. CellPhoneDB: inferring cell-cell communication from combined expression of multi-subunit ligand-receptor complexes. *Nat. Protoc.* **15**, 1484–1506 (2020).
38. Vento-Tormo, R. et al. Single-cell reconstruction of the early maternal-fetal interface in humans. *Nature* **563**, 347–353 (2018).
39. Li, S., Holdsworth, S. R. & Tipping, P. G. B7.1 and B7.2 co-stimulatory molecules regulate crescentic glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1394–1401 (2000).
40. Riedel, J. H. et al. Immature renal dendritic cells recruit regulatory CXCR6(+) invariant natural killer T cells to attenuate crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1987–2000 (2012).
41. Wu, T. et al. Excreted urinary mediators in an animal model of experimental immune nephritis with potential pathogenic significance. *Arthritis Rheum.* **56**, 949–959 (2007).
42. Corbett, A. J. et al. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature* **509**, 361–365 (2014).
43. Soudais, C. et al. In vitro and in vivo analysis of the gram-negative bacteria-derived riboflavin precursor derivatives activating mouse MAIT cells. *J. Immunol.* **194**, 4641–4649 (2015).
44. Davoll, J. & Evans, D. D. 976. The synthesis of 9-glycetylurines, 3-glycetyl-[1,2,3]-triazolo[d]-pyrimidines, 8-glycetylpteridines, and 10-glycetylbenzo[g]pteridines, including riboflavin and riboflavin 2-imine. *J. Chem. Soc.* 5041–5049 <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1960/JR/jr9600005041> (1960).
45. Maley, G. F. & Plaut, G. W. The isolation, synthesis, and metabolic properties of 6, 7-dimethyl-8-ribityllumazine. *J. Biol. Chem.* **234**, 641–647 (1959).
46. Bown, D. H., Keller, P. J., Floss, H. G., Sedlmaier, H. & Bacher, A. Solution structures of 6,7-dimethyl-8-substituted-lumazines. Carbon-13 NMR evidence for intramolecular ether formation. *J. Org. Chem.* **51**, 2461–2467 (1986).
47. Constantinides, M. G. et al. MAIT cells are imprinted by the microbiota in early life and promote tissue repair. *Science* **366**, eaax6624 (2019).
48. Lu, B. et al. IL-17 production by tissue-resident MAIT cells is locally induced in children with pneumonia. *Mucosal Immunol.* **13**, 824–835 (2020).
49. Salou, M. et al. A common transcriptomic program acquired in the thymus defines tissue residency of MAIT and NKT subsets. *J. Exp. Med.* **216**, 133–151 (2019).
50. Chiba, A. et al. Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 153–161 (2012).
51. Hochheiser, K. et al. Kidney dendritic cells become pathogenic during crescentic glomerulonephritis with proteinuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 306–316 (2011).
52. Meierovics, A. I. & Cowley, S. C. MAIT cells promote inflammatory monocyte differentiation into dendritic cells during pulmonary intracellular infection. *J. Exp. Med.* **213**, 2793–2809 (2016).
53. Yu, H. et al. CXCL16 stimulates antigen-induced MAIT cell accumulation but trafficking during lung infection is CXCR6-independent. *Front. Immunol.* **11**, 1773 (2020).
54. Berkson, J. D. et al. Inflammatory cytokines induce sustained CTLA-4 cell surface expression on human MAIT cells. *Immunohorizons* **4**, 14–22 (2020).
55. Sakai, S. et al. MAIT cell-directed therapy of Mycobacterium tuberculosis infection. *Mucosal Immunol.* **14**, 199–208 (2021).
56. du Halgouet, A. et al. Role of MR1-driven signals and amphiregulin on the recruitment and repair function of MAIT cells during skin wound healing. *Immunity* **56**, 78–92.e76 (2023).
57. Zhao, Z. et al. Francisella tularensis induces Th1 like MAIT cells conferring protection against systemic and local infection. *Nat. Commun.* **12**, 4355 (2021).
58. Zhang, Y. et al. Mucosal-associated invariant T cells restrict reactive oxidative damage and preserve meningeal barrier integrity and cognitive function. *Nat. Immunol.* **23**, 1714–1725 (2022).
59. Yan, J. et al. MAIT cells promote tumor initiation, growth, and metastases via tumor MR1. *Cancer Discov.* **10**, 124–141 (2020).
60. van Wilgenburg, B. et al. MAIT cells contribute to protection against lethal influenza infection in vivo. *Nat. Commun.* **9**, 4706 (2018).
61. Mak, J. Y. et al. Stabilizing short-lived Schiff base derivatives of 5-aminouracils that activate mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Commun.* **8**, 14599 (2017).
62. Disteldorf, E. M. et al. CXCL5 drives neutrophil recruitment in TH17-mediated GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 55–66 (2015).
63. Turner, J. E. et al. IL-17A production by renal gammadelta T cells promotes kidney injury in crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1486–1495 (2012).

64. Wang, H. et al. IL-23 costimulates antigen-specific MAIT cell activation and enables vaccination against bacterial infection. *Sci. Immunol.* **4**, eaaw0402 (2019).
65. Chen, Z. et al. Mucosal-associated invariant T-cell activation and accumulation after in vivo infection depends on microbial riboflavin synthesis and co-stimulatory signals. *Mucosal Immunol.* **10**, 58–68 (2017).
66. Paust et al. The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 969–979 (2009).
67. Karkar, A. M. & Rees, A. J. Influence of endotoxin contamination on anti-GBM antibody induced glomerular injury in rats. *Kidney Int.* **52**, 1579–1583 (1997).
68. Miyamoto, K., Miyake, S. & Yamamura, T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* **413**, 531–534 (2001).
69. Panzer, U. et al. Chemokine receptor CXCR3 mediates T cell recruitment and tissue injury in nephrotoxic nephritis in mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 2071–2084 (2007).

## Acknowledgements

We thank the FACS Sorting Core Unit and the Research Animal Facility of the Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf for excellent technical support. Further, we thank the NIH tetramer facility for providing tetramer reagents. This study was supported by the German Research Foundation Collaborative Research Centre 1192 (grant no. 264599542 to J.E.T., C.K., U.P., C.F.K., T.B.H.), the German Research Foundation Emmy Noether Programme (grant no. 261149925 to J.E.T.), the German Research Foundation Priority Programme 1937 (grant no. 428069668 to J.E.T.), the German Research Foundation Collaborative Research Centre 1154 (grant no. 432325352 to C.K.), the German Research Foundation Transregional Collaborative Research Centre 237 (grant no. 369799452 to C.K.), the German Research Foundation Cluster of Excellence 2151 (grant no. 390873048 to C.K.), the German Research Foundation Gottfried Wilhelm Leibniz Award (to C.K.), and the German Research Foundation International Research Training Group 2168 (grant no. 272482170 to M.S.P.).

## Author contributions

Conceptualization: J.E.T., C.K., and U.P. Methodology: A.C.G., M.S.P., A.Wa., M.Wu., N.S., V.A., L.H., T.K., T.X., D.K., P.T., M.M.A., M.Wa., T.B.H., A.Wi., M.A.F., O.L., D.M., and U.P. Investigation: A.C.G., M.S.P., A.Wa., N.S., V.A., L.H., T.K., T.X., D.K., M.Wu., P.T., M.M.A., U.P., and J.E.T. Visualization: J.E.T., A.C.G., M.S.P., A.Wa., N.S., and T.K. Funding

acquisition: J.E.T., C.K., U.P., C.F.K., and T.B.H. Supervision: J.E.T. and C.K. Writing—original draft: J.E.T., C.K., A.C.G., M.S.P., and A.Wa. Writing—review and editing: J.E.T., C.K., A.C.G., M.S.P., A.Wa., and U.P.

## Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43269-0>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Christian Kurts or Jan-Eric Turner.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

**Reprints and permissions information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

<sup>1</sup>III. Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>2</sup>Hamburg Center for Translational Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>3</sup>Hamburg Center for Kidney Health (HCKH), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>4</sup>Institute of Molecular Medicine and Experimental Immunology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany. <sup>5</sup>Kekulé Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, University of Bonn, Bonn, Germany. <sup>6</sup>Institute of Neuroimmunology and Multiple Sclerosis, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>7</sup>Inserm U932, Laboratoire d'immunologie Clinique and Centre d'investigation Clinique en Biothérapie Gustave-Roussy, Institut Curie, Paris, France. <sup>8</sup>Department of Microbiology and Immunology, Doherty Institute for Infection and Immunity, University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia. <sup>9</sup>Present address: Euroimmun, Lübeck, Germany. <sup>10</sup>Present address: Division of Immunology, Paul-Ehrlich-Institut Langen, Langen, Germany. <sup>11</sup>Present address: Institut für Transfusionsmedizin, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>13</sup>These authors contributed equally: Ann-Christin Gnirck, Marie-Sophie Philipp, Alex Waterhölter. <sup>13</sup>These authors jointly supervised this work: Christian Kurts, Jan-Eric Turner.

✉ e-mail: [ckurts@uni-bonn.de](mailto:ckurts@uni-bonn.de); [j.turner@uke.de](mailto:j.turner@uke.de)

### 3 Darstellung der Publikation

#### 3.1 Einleitung

##### *Adaptive und angeborene Immunität*

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Pathogenen und wird klassischerweise in einen angeborenen und einen adaptiven Arm unterteilt (1). Das angeborene Immunsystem erkennt konservierte, pathogenassoziierte molekulare Muster (2, 3). Dies führt zur raschen Ausschüttung von Botenstoffen, die Immunzellen anlocken und aktivieren, sowie zur unspezifischen Eliminierung der Erreger.

Im Gegensatz dazu setzt die adaptive Immunantwort verzögert ein, ist jedoch hochspezifisch (4). T- und B-Zellen gehören zum zellulären Anteil dieses Immunsystems und bilden durch somatische Rekombination einzigartige Rezeptoren. T-Zellen erkennen Peptidantigene, die auf Major Histocompatibility Complex (MHC)-Molekülen präsentiert werden. Ihre Reifung erfolgt im Thymus, wo sie Selektionsprozesse durchlaufen: Zellen, die MHC-Moleküle nicht binden oder auf körpereigene Proteine reagieren, werden aussortiert. Durch Bindung an MHC-Klasse-I- oder -Klasse-II-Moleküle differenzieren sich konventionelle T-Zellen mithilfe der Korezeptoren CD8 bzw. CD4 zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) oder T-Helfer-Zellen (TH-Zellen). Nach der Emigration aus dem Thymus zirkulieren naive T-Zellen durch den Körper und proliferieren nach Antigenkontakt. Die adaptive Immunantwort führt typischerweise zur vollständigen Eliminierung des Erregers und zur Immunität gegenüber zukünftigen Infektionen mit demselben Pathogen (5).

##### *Unkonventionelle T-Zellen*

Seit der Entdeckung unkonventioneller T-Zellen („*unconventional T cells*“, UTCs) (6, 7) gilt die strikte Dichotomie zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem als überholt. Aufgrund ihrer schnellen Aktivierbarkeit bilden UTCs eine Brücke zwischen beiden Systemen. Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen besitzen sie ein stereotypisches, limitiertes T-Zell-Rezeptor (TCR)-Repertoire und werden daher als semi-invariant bezeichnet. Statt Peptidantigene auf MHC-Klasse-I- oder -Klasse-II-Molekülen zu erkennen, binden sie Nicht-Peptidantigene, die auf konservierten, nicht-polymorphen MHC-Ib-Molekülen präsentiert werden. Ontogenetisch entstehen UTCs vor den adaptiven T-Zellen und migrieren teilweise bereits in der pränatalen Periode in periphere Gewebe (8).

##### *Mukosa-assoziierte invariante T (MAIT)-Zellen*

Mukosa-assoziierte invariante T (MAIT)-Zellen gehören zusammen mit NKT- und  $\gamma\delta$ T-Zellen zur Gruppe der unkonventionellen T-Zellen (UTCs) (9, 10). Sie erkennen Riboflavin-Derivate, die als Produkte des mikrobiellen Vitamin-B2-Stoffwechsels auf dem MHC-Class-I-Related Gene Protein (MR1) präsentiert werden (11). Wie andere T-Zellen, entstehen MAIT-Zellen im Thymus, wobei MR1 für ihre Entwicklung und Selektion essenziell ist (12). Außerhalb des Thymus wird MR1 ubiquitär in niedriger Menge exprimiert, bei Entzündungsprozessen jedoch hochreguliert (13, 14).

Die Spezifität von MAIT-Zellen für eine definierte Antigenklasse könnte darauf hinweisen, dass sie sich evolutionär zur Abwehr bestimmter Pathogene entwickelt haben. Im Gewebe tragen sie zur Homöostase bei, indem sie Barrieren aufrechterhalten, Immunreaktionen gegen eindringende Pathogene steuern und zur Resolution von Entzündungen beitragen (9). Obwohl die einzelnen UTC-Subtypen spezifische Funktionen besitzen, sind sie funktionell eng verwandt und teilweise redundant (10, 15, 16).

Damit MAIT-Zellen eine Immunantwort ausführen, müssen sie aktiviert werden. Konventionelle T-Zellen benötigen hierfür drei aufeinanderfolgende Signale: ein TCR-Signal, Kostimulation und die autokrine Ausschüttung von IL-2 (17). MAIT-Zellen hingegen lassen sich bereits durch ein einzelnes TCR-Signal oder ausschließlich durch Zytokine aktivieren (18). Für die TCR-abhängige Aktivierung muss ein aktivierender Ligand, gebunden an MR1, mit dem T-Zell-Rezeptor der MAIT-Zelle interagieren (19). Die prototypischen MAIT-Zell-Agonisten sind mikrobielle Riboflavin-Derivate wie 5-(2-Oxopropylideneamino)-6-D-Ribitylaminouracil (5-OP-

RU) und 5-(2-Oxoethylideneamino)-6-D-Ribitylaminouracil (5-OE-RU) (11, 20). Für eine optimale TCR-vermittelte Aktivierung sind kostimulatorische Signale über ICOS und IL-23 erforderlich (21). Aufgrund der hohen Expression von Zytokinrezeptoren können MAIT-Zellen auch unabhängig von ihrem T-Zell-Rezeptor direkt durch Zytokine aktiviert werden (22, 23). Dieses Verhalten ähnelt dem angeborenen Immunsystem. Leng et al. konnten zeigen, dass Kombination aus TCR-Signalen mit pro-inflammatorische Zytokinen eine Gewebsreparatur-Programm in MAIT-Zellen induziert (24).

Die Funktion einer Immunzelle wird maßgeblich durch die Expression spezifischer Schlüsseltranskriptionsfaktoren bestimmt. Die Transkriptionsfaktoren T-bet und ROR $\gamma$ t definieren Lymphozyten der Typ-1- bzw. Typ-17-Immunität zugehörig. Während die Typ-1-Immunität intrazelluläre Erreger bekämpft, richtet sich die Typ-17-Immunität gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze. Der Großteil der MAIT-Zellen exprimieren die Transkriptionsfaktoren T-bet oder ROR $\gamma$ t, und werden damit als MAIT1- oder MAIT17-Zellen definiert. Im Menschen exprimieren MAIT-Zellen hingegen teilweise simultan T-bet und ROR $\gamma$ t (10, 25-27). Zusätzlich können MAIT17-Zellen sich in MAIT1-Zellen plastisch umwandeln (28). Alle MAIT-Zellen exprimieren in Mäusen den Transkriptionsfaktor PLZF.

Während der akuten Immunantwort produzieren insbesondere MAIT1-Zellen IFN- $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Eine chronische Stimulation führt jedoch zu einer Verschiebung hin zu einem MAIT17-dominierten Phänotyp (29). Interessanterweise sind MAIT17-Zellen auch unter homöostatischen Bedingungen in Geweben vorhanden. Zhang et al zeigten, dass MAIT17-Zellen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der meningealen Barriere spielen (30). Es scheint jedoch einen Unterschied zwischen der IL-17-Sekretion unter homöostatischen und entzündlichen Bedingungen zu geben (31). Unabhängig vom Phänotyp können MAIT-Zellen zudem zytolytische Proteine wie Granzym und Perforin exprimieren und damit MR1-abhängig Zielzellen lysieren (32, 33). Nach chronischer Stimulation sind sie darüber hinaus in der Lage, klassische Typ-2-Zytokine wie IL-5, IL-13 und IL-4 zu produzieren (34, 35).

#### *Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit*

Während die Rolle von MAIT-Zellen in der Immunabwehr gegen bakterielle und virale Pathogene bereits umfassend untersucht wird, ist ihre Funktion in immunvermittelten entzündlichen Erkrankungen noch weitgehend unklar. Um diese Frage zu beantworten, wurden in der vorliegenden Arbeit bioinformatische Analysen von Einzelzell-Sequenzierungsdaten aus humanen Nierenbiopsien von Patienten mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis durchgeführt, um den Phänotyp von MAIT-Zellen zu charakterisieren. Darüber hinaus wurden in einem murinen Modell der experimentellen Glomerulonephritis vergleichbare Methoden eingesetzt, um die Mechanismen der MAIT-Zell-Funktion aufzuklären.

Im Folgenden werden die wichtigsten Erkenntnisse aus der Analyse humaner und muriner MAIT-Zellen in der Niere dargestellt und anschließend diskutiert.

## **3.2 Ergebnisse**

### **3.2.1 Identifikation von humanen MAIT-Zellen**

MAIT-Zellen lassen sich methodisch nur schwer identifizieren, da sie (mit Ausnahme des MAIT-Zell-TCRs) keine spezifischen Oberflächenmoleküle oder Transkriptionsfaktoren exprimieren, das sie eindeutig kennzeichnet. Stattdessen erfordert ihre Identifikation entweder Informationen über die spezifischen T-Zell-Rezeptorketten oder eine Kombination aus dem Vorhandensein bestimmter Marker und dem Fehlen anderer Marker. Erschwerend kommt hinzu, dass sie nur in geringer Anzahl im Gewebe vorkommen.

Im Rahmen des Hamburger Glomerulonephritis-Registers wird bei teilnehmenden PatientInnen mit Glomerulonephritis eine Biopsie entnommen, die für Forschungszwecke genutzt wird. Die Arbeitsgruppe um Prof. Christian Krebs hat bereits T-Zellen einer Kohorte von PatientInnen mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis einer Einzelzellsequenzierung unterzogen und die Ergebnisse publiziert (36). Da dieser Datensatz jedoch keine detaillierten

Informationen über die TCR-Region enthielt, benötigten wir für die Identifikation der MAIT-Zellen in dem vorhandenen Datensatz eine MAIT-Zell-spezifische mRNA-Expressionssignatur.

Diese Signatur generierten wir unter Zuhilfenahme eines Datensatzes von T-Zellen aus der bronchoalveolären Lavage (BAL) von PatientInnen mit Lungeninflammation (37). Letzterer enthielt, im Gegensatz zu den Nieren-Daten, T-Zell-Rezeptor-Sequenzen sowie einen mit einem Barcode versehenen Antikörper gegen eine T-Zell-Rezeptorkette von MAIT-Zellen (38). Mit diesen Informationen ließen sich MAIT-Zellen eindeutig identifizieren. Wir extrahierten die 20 Gene des MAIT-Clusters mit dem größten positiven Expressionsunterschied zu den anderen Clustern. Innerhalb dieser Gen-Liste befanden sich bereits bekannte MAIT-Marker wie der Transkriptionsfaktor PLZF, die T-Zell-Rezeptor-Kette TRAV1-2 sowie die Rezeptoren IL-18R, KLRB1 (CD161) und IL-7R.

Im nächsten Schritt errechneten wir mit der Gen-Liste einen „MAIT-Score“ für den Nierendatensatz. Auffällig war, dass ein Cluster, welcher von den Autoren als CD8+ KLRB1<sup>Hi</sup> bezeichnet wurde, hohe „MAIT-Score“-Werte zeigte. Wir hypothetisierten daher, dass es sich um MAIT-Zellen handeln könnte. Um jedoch auszuschließen, dass dieser Cluster mit anderen unkonventionellen T-Zellen, wie NKT-Zellen, kontaminiert war, errechneten wir auf ähnliche Weise einen „NKT-Score“ aus Cluster-definierenden Genen des NKT-Clusters des o.g. BAL-Datensatzes. Wir konnten zeigen, dass NKT-Zellen separat von den MAIT-Zellen clustern.

Die nun identifizierten MAIT-Zellen ließen sich anhand ihrer Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t vor allem als MAIT-17-Zellen definieren. In der Durchflusszytometrie konnten wir zudem zeigen, dass Nieren-MAIT-Zellen im Vergleich zu zirkulierenden Blut-MAIT-Zellen vermehrt ROR $\gamma$ t exprimieren.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob MAIT-Zellen in der ANCA-assoziierten Vaskulitis aktiv zur Pathogenese beitragen oder lediglich anwesend sind. Mithilfe eines Datensatzes zu differentiell exprimierten Genen von MAIT-Zellen nach *in-vitro*-Stimulation mit einem Liganden (36) generierten wir einen MAIT-Aktivierungsscore. In der ANCA-assoziierten Vaskulitis ergaben sich signifikant höhere Werte für die MAIT-Zellaktivierung.

Zusammenfassend sind MAIT-Zellen in der humanen Niere überwiegend MAIT-17-Zellen und zeigen in der ANCA-assoziierten Vaskulitis eine mit Aktivierung assoziierte mRNA-Signatur auf.

### **3.2.2 Identifikation und Charakterisierung von MAIT-Zellen in der murinen Niere**

Aus offensichtlichen ethischen Bedenklichkeiten lassen sich funktionelle Experimente zu MAIT-Zellen kaum im Menschen durchführen. Um jedoch der Funktion von MAIT-Zellen näher zu kommen, wurden in Voruntersuchungen die MAIT-Zellen muriner Nieren analysiert. Dabei zeigte sich, dass murine MAIT-Zellen ebenfalls hauptsächlich einen MAIT-17-Phänotyp aufweisen. MAIT-Zellen machen etwa 0,1% der Lymphozytenpopulation muriner Nieren von B6-Mäusen aus. Bei B6<sup>CAST</sup>-Mäusen, die für ihr höheres Vorkommen von MAIT-Zellen bekannt sind, waren es 0,4%. In *Mr1*<sup>-/-</sup>-Mäusen, welche das für die Entwicklung von MAIT-Zellen notwendige MR-1 nicht besitzen, ließen sich keine MAIT-Zellen nachweisen. Durch eine intravaskuläre CD45-Färbung ließ sich zeigen, dass fast alle MAIT-Zellen der murinen Niere extravasal lokalisiert sind. Wir postulieren daher, dass MAIT-Zellen in der murinen Niere Gewebe-resident sind.

### **3.2.3 MAIT-Zellen haben einen protektiven Effekt in der experimentellen Glomerulonephritis**

Um den Effekt von MAIT-Zellen in der Glomerulonephritis untersuchen zu können, wurde in Voruntersuchungen das Mausmodell der experimentellen Glomerulonephritis genutzt. Bei diesem entwickeln Mäuse nach Injektion eines Serums von Schafen, welche gegen glomeruläre Bestandteile der Maus immunisiert wurden, eine Halbmond-bildende, rapid progrediente Glomerulonephritis. Es ließ sich zeigen, dass MAIT-Zellen einen protektiven

Effekt auf den Verlauf der experimentellen Glomerulonephritis hatten. Als klinische Parameter wurden der Prozentsatz der histologischen Halbmonde („Crescents“) in den Glomeruli, die Albumin-Kreatinin-Ratio, der Blut-Harnstoff sowie die Anzahl der tubulointerstitiellen GR-1 positiven Zellen genutzt. Während die B6<sup>Cast</sup>-Mäuse gegenüber den B6-Mäusen einen leichteren Krankheitsverlauf aufwiesen, hatten die *Mr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse einen fulminanteren Verlauf gegenüber den B6-Mäusen.

### 3.2.4 Expressionsprofile von MAIT-Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis

Wir waren nun an der Frage interessiert, wie MAIT-Zellen diesen Effekt vermitteln. Daher isolierten wir MAIT-Zellen aus der murinen Niere von naiven B6<sup>CAST</sup>-Mäusen sowie einen und neun Tage nach der Injektion des Schafserums und führten eine Einzelzell-mRNA-Sequenzierung durch. Durch eine Integration der Datensätze mit darauffolgendem nicht-supervisierten Clustering erhielten wir zwei reine MAIT-Zell-Cluster. Wie auch schon in der Durchflusszytometrie gezeigt, konnten wir erneut bestätigen, dass MAIT-Zellen vornehmlich einen MAIT-17-Phänotyp entsprechen sowie CD4- und CD8-negativ sind. Das MAIT-Zell-Cluster 1 war prozentual stärker in der naiven Niere sowie am Tag 1 nach Serum-Injektion vorhanden und hat im Vergleich mit dem Cluster 2 deutlich weniger Gene differentiell exprimiert. Das MAIT-Zell-Cluster 2 war am Tag 9 deutlich stärker vertreten und exprimiert immunregulatorische Gene, wie z.B. die Immuncheckpoints *Ctla4* und *Pdcd1*. Analog zu dem humanen MAIT-Aktivierungs-Score konnten wir zeigen, dass am Tag 9 beide MAIT-Zell-Cluster ein signifikant höheres Aktivierungsniveau aufwiesen.

### 3.2.5 Bioinformatischer Ansatz zur Aufklärung des Mechanismus von MAIT-Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis

In konfokal-mikroskopischen Voruntersuchungen konnten wir zeigen, dass sich MAIT-Zellen vornehmlich im Tubulointerstitium des Nierengewebes befinden, wo sich auch zahlreiche andere Immunzellen in der Glomerulonephritis aufhalten. Dies führte zur Frage nach möglichen Interaktionen zwischen MAIT-Zellen und anderen Immunzellen.

Um diese zu untersuchen, generierten wir am Tag 9 nach Injektion des Serums einen Einzelzell-mRNA-Sequenzierungsdatensatz von nicht-MAIT-Immunzellen der Niere und analysierten mögliche Zellinteraktionen mittels einer Interaktom-Datenbank. Dabei zeigte sich, dass MAIT-Zellen des Clusters 2 zahlreiche Interaktionen mit einem mononukleären Phagozyten-Cluster aufwiesen. Nach Reduktion der Analyse auf spezifische, nicht in anderen Clustern verbreitete Interaktionen fielen insbesondere die Paarungen CXCR6–CXCL16, CTLA-4–CD86 sowie TGFβ1–TGFβR1 auf.

In der Durchflusszytometrie konnten wir bestätigen, dass am Tag 9 nach Injektion nahezu alle MAIT-Zellen CXCR6-positiv und etwa 25 % CTLA-4-positiv waren. Der mononukleäre Phagozyten-(MNP)-Cluster unterschied sich von einem anderen MNP-Cluster durch eine verstärkte Expression von Aktivierungsmarkern (z. B. CD44) sowie proinflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-1β, CCL3). Zudem konnten wir zeigen, dass *Mr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu B6<sup>Cast</sup>-Mäusen am Tag 9 nach Induktion eine erhöhte Anzahl an Makrophagen aufwiesen, die CD44, IL-1β und CCL3 koexprimierten.

Daraus formulierten wir die Hypothese, dass MAIT-Zellen durch ihren Chemokinrezeptor CXCR6 in die Nähe aktivierter, CXCL16-produzierender Makrophagen geleitet werden und dort über immunmodulatorische Mechanismen zur Abschwächung der Makrophagenaktivierung beitragen. Eine Kolo-kalisation von MAIT-Zellen und Makrophagen konnte in der konfokalen Mikroskopie bestätigt werden.

### 3.2.6 Protektiver Effekt von MAIT-Zellen ist abhängig von CXCR6-CXCL16-Achse

Um diese Hypothese zu überprüfen, injizierten wir B6<sup>Cast</sup>- und *Mr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse einen Antikörper gegen CXCL16 am Tag 1, 4 und 8 nach Induktion der experimentellen Glomerulonephritis. Gegenüber einer Isotypen-Kontrolle konnte der klinische Unterschied zwischen B6<sup>Cast</sup>- und *Mr1*<sup>-/-</sup>-Mäusen nivelliert werden. Die CXCR6-CXCL16-Achse scheint daher für den protektiven Effekt von MAIT-Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis von Bedeutung zu sein.

### 3.2.7 Pharmakologische Aktivierung von MAIT-Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis

Um das mögliche therapeutische Potential von MAIT-Zellen in der Glomerulonephritis ausnutzen zu können, stellte sich die Frage, ob eine 5-A-RU-vermittelte MAIT-Zell-Aktivierung eine vorteilhafte Wirkung haben kann. In nachfolgenden Analysen zeigte sich, dass eine zweimal tägliche Injektion des Liganden zu einer signifikanten Reduktion der Crescents in der Niere führte. Dieser Effekt wurde in MAIT-Zell-defizienten *Mr1*<sup>-/-</sup>-Mäusen aufgehoben. Verglichen mit den Kontrollen waren nach Stimulation mehr MAIT-Zellen in der Niere vorhanden und wiesen in der Durchflusszytometrie eine höhere Expression von Aktivierungsmarkern auf.

## 3.3 Diskussion

### 3.3.1 Zusammenfassung

Diese Studie präsentiert erstmals Daten zu renalen MAIT-Zellen in akuten, entzündlichen Nierenerkrankungen. Zusammenfassend konnten wir nachweisen, dass MAIT-Zellen sowohl in der humanen ANCA-assoziierten Vaskulitis als auch in der murinen experimentellen Glomerulonephritis in der Niere vorkommen und überwiegend einen MAIT-17-Phänotyp aufweisen. Funktionell zeigen MAIT-Zellen einen protektiven Effekt gegenüber der Entwicklung der experimentellen Glomerulonephritis. MAIT-17-Zellen befinden sich in unmittelbarer Nähe zu mononukleären Phagozyten und exprimieren immunmodulierende Moleküle wie PD-1, CTLA-4 und TGF- $\beta$ . Eine mögliche mechanistische Grundlage für diese Kolo-kalisation stellt die CXCR6-CXCL16-Achse dar, die wesentlich zur protektiven Wirkung der MAIT-Zellen beiträgt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der MAIT-Zellen mit dem Liganden 5-OP-RU eine therapeutische Wirksamkeit gegen die experimentelle Glomerulonephritis aufweist.

### 3.3.2 Protektiver Effekt von MAIT-Zellen: ein *off-Target* Effekt?

Die Annahme, dass MAIT-Zellen einen protektiven Effekt auf die experimentelle Glomerulonephritis haben, basiert auf zwei *Gain-of-Function*- und zwei *Loss-of-Function*-Experimenten. B6-MAIT<sup>CAST</sup>-Mäuse zeigten im Vergleich zu konventionellen B6-Mäusen einen milderen Krankheitsverlauf. Diese Mäuse tragen einen genetisch eingebrachten CAST-EiJ-Lokus in der TCR $\alpha$ -Region, wodurch sie vermehrt MAIT-Zellen ausbilden. Zudem war der Krankheitsverlauf in *Mr1*<sup>-/-</sup>-Mäusen gegenüber B6-Mäusen signifikant aggraviert. Theoretisch könnten diese Ergebnisse durch *off-Target*-Effekte beeinflusst sein.

Ein direkter Nachweis eines MAIT-Zell-intrinsischen Effekts wäre durch den Transfer von MAIT-Zellen in MAIT-defiziente Mäuse möglich gewesen. Dieses Experiment konnte jedoch aus zwei Gründen nicht erfolgreich durchgeführt werden. Erstens zeigte es sich nahezu unmöglich, eine ausreichende Anzahl an MAIT-Zellen für einen Transfer in *Mr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zu isolieren. Im Gegensatz zu Zhang et al., die einen Transfer meningealer MAIT-Zellen beschrieben (30), konnten wir in aufwendigen Transferexperimenten mit aus der Niere isolierten MAIT-Zellen keinen Anstieg der MAIT-Zellen in der Niere von *Mr1*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Transfer nachweisen (Daten nicht publiziert). Zweitens gelang es nicht, aus Milz und Lymphknoten isolierte MAIT-Zellen direkt oder nach Expansion in Kultur erfolgreich zu

transferieren. Es konnte weder eine Migration der MAIT-Zellen in der Niere noch ein dauerhaftes Überleben in den MAIT-Zell-Empfängermäusen beobachtet werden (Daten nicht publiziert). Eine mögliche Erklärung für das fehlende Überleben ist eine bereits vollständig durch andere unkonventionelle T-Zellen besetzte zelluläre Nische in den *Mr1<sup>-/-</sup>*-Mäusen, die eine Einnistung möglicherweise verhindert. Auch in anderen Organen konnten keine transferierten MAIT-Zellen nachgewiesen werden. Ein Transfer in immundefiziente Mäuse (z.B. *Rag2 Il2rg<sup>-/-</sup>*, wie zuvor publiziert (39)) war aufgrund der Notwendigkeit eines intakten Immunsystems für die Induktion einer experimentellen Glomerulonephritis, nicht durchführbar.

Gegen potenzielle Off-Target-Effekte spricht jedoch, dass der protektive Effekt der MAIT-Zellen durch eine Liganden-spezifische Stimulation verstärkt wurde und die Blockade der CXCR6-CXCL16-Achse eine Wirkung in CAST-Mäusen, nicht jedoch in *Mr1<sup>-/-</sup>*-Mäusen, zeigte.

### 3.3.3 MAIT-Zellen in immunvermittelten Erkrankungen: ein *Common-Theme*?

Derzeit liegen keine weiteren Daten zur Rolle von MAIT-Zellen in anderen akuten Nierenerkrankungen vor. Studien zur chronischen Nierenerkrankung zeigen, dass MAIT-Zellen im fibrotischen Stadium im Tubulointerstitium akkumulieren (40). In in-vitro-Experimenten wurde eine zytolytische Aktivität von MAIT-Zellen gegen proximale Tubulusepithelzellen (PTECs) unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen. Inwiefern diese in-vitro-Ergebnisse auf in-vivo-Bedingungen übertragbar sind, bleibt jedoch unklar.

In Erkrankungsmodellen außerhalb der Niere haben MAIT-Zellen eine kontextabhängige Rolle. In der experimentellen autoimmunen Enzephalitis beschrieben Willing et al. einen protektiven Effekt von MAIT1/17-Zellen (41). Ähnliche Effekte wurden von Croxford et al. nach dem Transfer von V( $\alpha$ )19i-T-Zellen nachgewiesen, die strukturelle Ähnlichkeiten zu MAIT-Zellen aufweisen und ebenfalls MR1-restringiert sind (42). Ob diese Befunde direkt auf MAIT-Zellen übertragbar sind, ist jedoch nicht geklärt.

In Modellen zur entzündlichen Darmerkrankungen weisen MAIT-Zellen divergierende Effekte auf. Während mukosale MAIT-Zellen in der TNBS-induzierten Kolitis reduziert sind und ihre Rekonstitution einen protektiven Effekt zeigt (43), deutet eine andere Studie auf eine pathogene Rolle von MAIT-Zellen in der Oxazolone-induzierten Kolitis hin (44). Eine aggravierende Rolle zeigt sich in der Kollagen-induzierten Arthritis (45) und dem Fc $\gamma$ R11b-KO-Yaa-Mausmodell für systemischen Lupus erythematodes (46).

In einem Mausmodell für den Typ-1-Diabetes mellitus zeigt sich eine funktionelle Ambiguität zwischen Geweben. Während pankreatische MAIT-Zellen eine zytotoxische Signatur aufweisen, sind intestinale MAIT-Zellen an der Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere beteiligt. Interessanterweise entwickeln MAIT-Zell-defiziente Mäuse schneller einen Typ-1-Diabetes mellitus, was auf eine immunregulatorische Funktion dieser Zellen hindeutet (14).

Die vorliegenden Befunde zeigen eine starke Kontextabhängigkeit der MAIT-Zell-Funktion in unterschiedlichen Krankheitsmodellen. Die Ergebnisse sind nicht nur zwischen den verschiedenen Erkrankungsmodellen, sondern auch innerhalb einzelner Gewebe heterogen. Diese Variabilität wirft die Frage auf, inwieweit Erkenntnisse aus der experimentellen Glomerulonephritis auf die ANCA-assoziierte Vaskulitis übertragbar sind.

### 3.3.4 Übertragbarkeit der Experimente

Die experimentelle Glomerulonephritis und die ANCA-assoziierte Vaskulitis unterscheiden sich grundlegend in ihrer Pathophysiologie. Während bei der experimentellen Glomerulonephritis präformierte Antikörper gegen glomeruläre Strukturen injiziert werden, resultiert die ANCA-assoziierte Vaskulitis aus einem Toleranzverlust gegenüber körpereigenen Antigenen und einer autoimmunvermittelten Entzündung der Gefäße (47).

Obwohl die rapid-progressive Glomerulonephritis eine zentrale Komplikation der ANCA-assoziierten Vaskulitis darstellt, macht sie nur einen Teil des gesamten Krankheitsbildes aus.

Die systemische Natur der Erkrankung führt zu weiteren Organmanifestationen, was die Übertragbarkeit experimenteller Ergebnisse aus der isolierten Glomerulonephritis auf die Vaskulitis einschränkt.

Unsere Daten zeigen, dass eine Stimulation von MAIT-Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis mit einem milderem Krankheitsverlauf assoziiert ist. Die Übertragung dieser Erkenntnisse auf den Menschen erfordert jedoch eine differenzierte Betrachtung. Zwar weisen MAIT-Zellen in der Niere von Maus und Mensch ähnliche phänotypische Merkmale auf, ihre Verteilung im Organismus unterscheidet sich jedoch erheblich. Während in der Maus der Großteil der MAIT-Zellen im Gewebe lokalisiert ist, finden sich beim Menschen deutlich höhere Anteile im peripheren Blut (48). Dies legt potenzielle funktionelle Unterschiede nahe und könnte bedeuten, dass eine therapeutische Stimulation von MAIT-Zellen im Menschen neben protektiven auch unerwartete negative Effekte hervorrufen kann.

### 3.3.5 Was vermittelt die Aktivierung von MAIT-Zellen?

Die vorgelegte Studie konnte nachweisen, dass MAIT-Zellen sowohl in der ANCA-assoziierten Vaskulitis als auch in der experimentellen Glomerulonephritis eine aktivierungsassoziierte Transkriptionssignatur aufweisen. Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Aktivierung bleiben jedoch unklar. Bislang wurden keine spezifischen MAIT-Zell-Liganden in der ANCA-assoziierten Vaskulitis identifiziert, sodass eine Zytokin- oder nicht-TCR-anhängige Aktivierung derzeit die wahrscheinlichste Erklärung darstellt.

Lamichane et al. zeigten, dass TCR-Liganden-aktivierte humane MAIT-Zellen einen Tc-17-Phänotyp ausbilden, während eine Zytokin-vermittelte Aktivierung zur Differenzierung in einen Tc-1-Phänotyp führt (49). Hinks et al. beobachteten in *in-vitro*-Experimenten mit murinen MAIT-Zellen ebenfalls unterschiedliche Transkriptionsprofile nach Liganden- oder Zytokin-vermittelter Aktivierung (50). In unseren eigenen Analysen ließ sich jedoch kein eindeutiges Aktivierungsprofil mit klarem Bezug zu einer spezifischen Aktivierungsweise feststellen (Daten nicht publiziert). Damit bleibt letztendlich der genaue Mechanismus der Aktivierung unklar.

### 3.3.6 Limitationen der Interaktom-Analyse

Die Interaktom-Analyse zeigte, dass MAIT-Zellen die meisten Interaktionen mit mononukleären Phagozyten aufweisen. Es müssen jedoch auf verschiedenen Ebenen diverse Limitationen festgestellt werden.

Auf der Ebene des Experimentendesigns wurden nur Immunzellen aus der Niere sequenziert. Ausgeschlossen wurden damit Immunzellen in anderen Organen, welche möglicherweise einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung haben. Wir konnten jedoch keine veränderte Aktivität von MAIT-Zellen außerhalb der Niere feststellen (Daten nicht in Publikation enthalten), weswegen wir uns auf die lokalen Mechanismen in der Niere konzentrierten. Zudem wurden in dem Experimentdesign nicht-immunologischen Zelltypen der Niere, welche wichtige Interaktionen mit Immunzellen haben, exkludiert.

Auf der Ebene des Experimentes zeigte sich, dass nicht alle renalen Immunzellpopulationen in dem Datensatz enthalten waren, obwohl CD45-positive Zellen sortiert wurden. Es fehlten beispielsweise B-Zellen, Neutrophile, Eosinophile und NK-Zellen. Auch myeloide Zellen waren im Vergleich zum tatsächlichen Vorkommen unterrepräsentiert. Unsere Methodik schien bestimmte Zellpopulationen bevorzugt anzureichern bzw. deren Überleben zu begünstigen. Dies könnte unter anderem durch die Organaufarbeitung und die Geräteeinstellung während der durchflusszytometriebasierten Zellsortierung beeinflusst worden sein.

Auf der Ebene der gewählten Interaktom-Datenbank wurden die Ergebnisse dahingehend limitiert, dass die Datenbank menschliche, experimentell nachgewiesene Protein-Protein-Interaktionen enthält (51). Die murinen Gene mussten vor der Analyse in menschliche homologe Gene bzw. Proteine umgewandelt werden. Dies schließt Gene der Maus aus, welche keine menschlichen homologen Gene besitzen. Da keine posttranskriptionellen

Modifikationen der mRNA im Datensatz enthalten sind, kann es sein, dass bestimmte mRNAs nicht in Proteine translatiert werden und daher falsch-positive Interaktionen zeigen. Posttranslationale Modifikationen, die eventuell ebenfalls einen Einfluss auf Zellinteraktionen haben, werden nicht in der Datenbank oder unserem Sequenzierungsdatensatz mitberücksichtigt. Zuletzt fehlen in der Datenbank Interaktionen, welche noch nicht experimentell nachgewiesen wurden.

Es ist somit wichtig zu betonen, dass komplexe bioinformatische Analysen von mRNA-Expressionsdaten, wie sie hier angewandt wurden, im Wesentlichen zur Generierung von Hypothesen über Effektormechanismen und Interaktions-Pathways genutzt werden können. Aufgrund der o.g. inherenten Limitationen dieser Methoden ist es jedoch essenziell die generierten Hypothesen in funktionellen Experimenten zu validieren, wie es hier durch in-vivo-Blockade der identifizierten Interaktionen geschehen ist.

Zusammenfassend handelt es sich bei unserem hypothetisierten Modell, wie MAIT-Zellen auf mononukleäre Zellen wirken, um eine Vereinfachung gegenüber der Realität. Es wurde jedoch gezeigt, dass bestimmte, ausgewählte Proteine wie CTLA4 und CXCR6 auf MAIT-Zellen exprimiert werden. Zudem wurde demonstriert, dass in Abwesenheit von MAIT-Zellen die Menge pro-inflammatorische Makrophagen in der experimentellen Glomerulonephritis zunimmt. Dies ist konsistent mit Ergebnissen der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung, wo aktivierte CXCR6-positive MAIT-Zellen pro-inflammatorische Makrophagen zu anti-inflammatorischen Makrophagen umprogrammieren konnten (52).

### **3.3.7 Die CXCR6-CXCL16-Achse: eine neue Entdeckung?**

Unsere Untersuchungen identifizierten die CXCR6-CXCL16-Achse als einen Mediator der Interaktion zwischen MAIT-Zellen und mononukleären Phagozyten. CXCR6 ist ein G-Proteingekoppelter Chemokinrezeptor, der zusammen mit seinem Liganden CXCL16 die gerichtete Chemotaxis von T-Zellen während entzündlicher Prozesse steuert (53). Interessanterweise ist CXCR6 auch ein Marker für gewebsresidente Gedächtnis-T-Zellen (54), welche ähnlich wie MAIT-Zellen wichtige Funktionen im Gewebe erfüllen (55). Unsere Daten zeigen, dass nahezu alle renalen MAIT-Zellen CXCR6 exprimieren und proinflammatorische mononukleäre Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis CXCL16 produzieren.

Die Expression von CXCR6 auf MAIT-Zellen ist durch mehrere Studien belegt. So wurde gezeigt, dass CXCL16 in Kombination mit dem MAIT-Zell-Antigen 5-OP-RU die Akkumulation von MAIT-Zellen in der Lunge fördert (56). Allerdings sind MAIT-Zellen nicht die einzige Zellpopulation in der Niere, die über CXCR6 einen protektiven Effekt vermittelt. Riedel et al. zeigten, dass dendritische Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis durch die Sekretion von CXCL16 invariante natürliche Killer-T-Zellen rekrutieren, die ebenfalls einen protektiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben (57). Konsistent mit unseren Ergebnissen führte eine genetische Deletion von CXCR6 zu einem aggravierten Phänotyp.

In der vorliegenden Studie wurde demonstriert, dass eine Blockade von CXCL16 den Verlauf von B6<sup>Cast</sup>-Mäusen verschlechtert, jedoch kein Effekt auf *Mr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse hat. Die Achse scheint daher ein wichtiger Bestandteil des Effektes von MAIT-Zellen zu sein. Ein direkter experimenteller Nachweis, dass diese Interaktion für die Kolokalisation von MAIT-Zellen und mononukleären Phagozyten verantwortlich ist, steht jedoch noch aus. Um dies zu bestätigen, wäre es erforderlich, die Distanz zwischen diesen Zelltypen vor und nach einer Blockade von CXCL16 zu quantifizieren.

### **3.3.8 T-Zell-Erschöpfung und CTLA-4**

Die Einzelzell-mRNA-Sequenzierung identifizierte zwei unterschiedliche MAIT-17-Zell-Cluster in der experimentellen Glomerulonephritis. Dies wirft die Frage nach der Entstehung und Funktion der unterschiedlichen MAIT-Zell-Populationen auf. Eine mögliche Erklärung ist eine unterschiedliche anatomische Lokalisation der Zellpopulationen. Alternativ könnte es sich um

verschiedene zeitliche Stadien der Immunantwort handeln. Die zweite Hypothese wird durch den zeitlichen Verlauf der Expansion des MAIT-Zell-Clusters 2 gestützt, welches zudem eine verstärkte Expression von CTLA-4 aufweist. Unsere Ergebnisse zeigen zudem, dass die Interaktion von CTLA-4 auf MAIT-Zellen mit CD80/CD86 auf mononukleären Phagozyten ein potenzieller Mechanismus für den protektiven Effekt von MAIT-Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis sein könnte.

Das Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) ist ein Immuncheckpoint und gehört zur CD28-Familie. Zum einen vermindert es die Aktivierung von T-Zellen, indem es kompetitiv die auf antigenpräsentierenden Zellen exprimierten Korezeptoren CD80/CD86 hemmt (58). Zum anderen wurde gezeigt, dass CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen zu einer Transcytose und anschließenden Degradation von CD80/86 führen kann (59). Dadurch können antigenpräsentierende Zellen weniger kostimulatorische Signale für T-Zellen geben.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Expansion des immunmodulatorischen MAIT-Zell-Clusters ist die T-Zell-Erschöpfung (engl. *exhaustion*). Dies ist ein Zustand funktioneller Dysfunktion, der in konventionellen T-Zellen durch anhaltende Antigenstimulation ausgelöst wird (60). Charakteristisch ist eine Verminderung der Effektorfunktion, begleitet von einer Hochregulation inhibitorischer Rezeptoren. Während früh erschöpfte T-Zellen noch eine gewisse Restfunktion aufweisen, sind spät erschöpfte Zellen meist irreversibel dysfunktional. Die Rolle von MAIT-Zellen in diesem Prozess ist bislang wenig untersucht. Ex-vivo-Experimente zeigen, dass MAIT-Zellen, ohne direkte T-Zell-Rezeptor-Stimulation, nach kurzem Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen eine prolongierte Hochregulation von CTLA-4 erfahren (61). Zudem beobachtet man in diversen entzündlichen Systemerkrankung wie auch der ANCA-assoziierten Vaskulitis eine prominente Reduktion der zirkulierenden MAIT-Zellen, welche auch durch eine erschöpfungsbedingte Apoptose erklärbar wäre (62). Die verstärkte CTLA-4-Expression im MAIT-Zell-Cluster 2 könnte auf eine frühe Erschöpfung hinweisen. Demnach wäre der protektive Effekt von MAIT-Zellen auf eine besonders sensitive Induktion von Erschöpfungsmechanismen zurückzuführen. Am neunten Tag der experimentellen Glomerulonephritis exprimieren jedoch nur etwa 20 % der MAIT-Zellen sowohl CTLA-4 als auch CXCR6. CTLA-4 ist dementsprechend wahrscheinlich nur ein Mechanismus, wie MAIT-Zellen ihren protektiven Effekt vermitteln.

### 3.3.9 TGFβ1: ein zweischneidiges Schwert?

Ein weiterer Faktor scheint TGFβ1 zu sein. Die Sequenzierungsdaten zeigen, dass MAIT-Zellen, unabhängig von ihrem Cluster, neun Tage nach Induktion der experimentellen Glomerulonephritis TGFβ1 hochregulieren. In der Interaktom-Analyse wurde vorhergesagt, dass dieses auf TGFβ-R2 von mononukleären Phagozyten wirken könnte. Die Expression von TGFβ1 in CXCR6<sup>+</sup> MAIT-Zellen wurde auch in anderen Studien bestätigt (63).

TGFβ besitzt ein breites Funktionsspektrum. Es vermittelt Immunsuppression, kann aber bei langfristiger Wirkung auch Fibrose und Angiogenese fördern. Nach der Sekretion wird TGFβ1 durch Bindung an das TGFβ-Bindungsprotein inaktiviert und in der extrazellulären Matrix gespeichert. Erst die Freisetzung durch Proteasen, insbesondere Matrixmetalloproteasen, ermöglicht die Dissoziation des TGFβ1-Homodimers vom Bindungsprotein und dessen Interaktion mit dem TGFβ-Rezeptor 2 (64).

Huang et al. zeigten im Mausmodell, dass ein erhöhter TGFβ1-Serumspiegel vor Glomerulonephritiden schützt und das Fortschreiten zur chronischen Nierenerkrankung (CKD) reduziert (65). Zudem konnte in anderen Krankheitsmodellen nachgewiesen werden, dass TGFβ1 pro-inflammatorische Makrophagen in einen anti-inflammatorischen Phänotyp umprogrammieren kann (66), was mit den Annahmen unseres Interaktom-Modells übereinstimmt.

Während TGFβ1 in der akuten Phasen der Immunantwort eine protektive Rolle spielen kann, ist seine chronische Aktivierung mit pathogenen Prozessen in der CKD assoziiert. Studien zeigen, dass PatientInnen mit CKD erhöhte Serum-TGFβ1-Spiegel aufweisen (67). Eine

anhaltende TGF $\beta$ 1-Stimulation führt zur Aktivierung profibrotischer Signalwege, die über eine verstärkte Extrazellulärmatrix-Ablagerung und Myofibroblasten-Differenzierung zur Nierenfibrose beitragen (68).

Zusammenfassend scheint eine akute TGF $\beta$ 1-Ausschüttung in der experimentellen Glomerulonephritis protektiv zu wirken, unter anderem durch die Modulation pro-inflammatorischer Makrophagen. Eine chronische Stimulation, wie sie möglicherweise durch eine langfristige Aktivierung von MAIT-Zellen induziert wird, könnte hingegen nachteilige Folgen für PatientInnen haben.

### **3.3.10 Abschließende Worte**

Unsere Studie identifiziert MAIT-Zellen als potenzielle therapeutische Zielstrukturen zur Behandlung von Glomerulonephritiden. MAIT-Zell-Liganden haben den Vorteil eines geringen toxischen Potenzials. Weitere Studien, die eine mögliche Kombination mit Immunsuppressiva untersuchen, könnten den Weg zur therapeutischen Anwendung ebnen.

#### 4 Abkürzungsverzeichnis

ANCA	Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCR	B-Zell-Rezeptor
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD8	Cluster of Differentiation 8
CKD	Chronische Nierenerkrankung (Chronic Kidney Disease)
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte (zytotoxische T-Zelle)
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
CXCR6	C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor 6
CXCL16	C-X-C-Motiv-Chemokinligand 16
IFN- $\gamma$	Interferon-Gamma
IL	Interleukin
LCMV	Lymphozytische Choriomeningitis-Virus
MAIT	Mukosa-assoziierte invariante T-Zelle
MHC	Major Histocompatibility Complex
MR1	MHC Class I-Related Gene Protein
MNP	Mononukleäre Phagozyten
NK	Natürliche Killerzelle
NKT	Natürliche Killer-T-Zelle
PTEC	Proximale Tubulusepithelzelle
ROR $\gamma$ t	RAR-Related Orphan Receptor Gamma t
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor Alpha
UTC	Unkonventionelle T-Zelle

5-OP-RU      5-(2-Oxopropylideneamino)-6-D-Ribitylaminouracil

5-OE-RU      5-(2-Oxoethylideneamino)-6-D-Ribitylaminouracil

## 5 Literaturverzeichnis

1. Flajnik MF, Du Pasquier L. 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in Immunology* 25: 640-4
2. Janeway CA, Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13
3. Carpenter S, O'Neill LAJ. 2024. From periphery to center stage: 50 years of advancements in innate immunity. *Cell* 187: 2030-51
4. Chi H, Pepper M, Thomas PG. 2024. Principles and therapeutic applications of adaptive immunity. *Cell* 187: 2052-78
5. Lam N, Lee Y, Farber DL. 2024. A guide to adaptive immune memory. *Nature Reviews Immunology* 24: 810-29
6. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. 1984. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 309: 757-62
7. Tilloy F, Treiner E, Park SH, Garcia C, Lemonnier F, de la Salle H, Bendelac A, Bonneville M, Lantz O. 1999. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med* 189: 1907-21
8. Gray JI, Caron DP, Wells SB, Guyer R, Szabo P, Rainbow D, Ergen C, Rybkina K, Bradley MC, Matsumoto R, Pethe K, Kubota M, Teichmann S, Jones J, Yosef N, Atkinson M, Brusko M, Brusko TM, Connors TJ, Sims PA, Farber DL. 2024. Human  $\gamma\delta$  T cells in diverse tissues exhibit site-specific maturation dynamics across the life span. *Sci Immunol* 9: eadn3954
9. Harly C, Robert J, Legoux F, Lantz O. 2022.  $\gamma\delta$  T, NKT, and MAIT Cells During Evolution: Redundancy or Specialized Functions? *J Immunol* 209: 217-25
10. Salou M, Legoux F, Gilet J, Darbois A, du Halgouet A, Alonso R, Richer W, Goubet AG, Daviaud C, Menger L, Procopio E, Premel V, Lantz O. 2019. A common transcriptomic program acquired in the thymus defines tissue residency of MAIT and NKT subsets. *J Exp Med* 216: 133-51
11. Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, Bhati M, Chen Z, Kostenko L, Reantragoon R, Williamson NA, Purcell AW, Dudek NL, McConville MJ, O'Hair RA, Khairallah GN, Godfrey DI, Fairlie DP, Rossjohn J, McCluskey J. 2012. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* 491: 717-23
12. Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, Affaticati P, Gilfillan S, Lantz O. 2003. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 422: 164-9
13. Chua WJ, Kim S, Myers N, Huang S, Yu L, Fremont DH, Diamond MS, Hansen TH. 2011. Endogenous MHC-related protein 1 is transiently expressed on the plasma membrane in a conformation that activates mucosal-associated invariant T cells. *J Immunol* 186: 4744-50
14. Rouxel O, Da Silva J, Beaudoin L, Nel I, Tard C, Cagninacci L, Kief B, Oshima M, Diedisheim M, Salou M, Corbett A, Rossjohn J, McCluskey J, Scharfmann R, Battaglia M, Polak M, Lantz O, Bertrand J, Lehuen A. 2017. Cytotoxic and regulatory roles of mucosal-associated invariant T cells in type 1 diabetes. *Nat Immunol* 18: 1321-31
15. Ataide MA, Knöpper K, Cruz de Casas P, Ugur M, Eickhoff S, Zou M, Shaikh H, Trivedi A, Grafen A, Yang T, Prinz I, Ohlsen K, Gomez de Agüero M, Beilhack A, Huehn J, Gaya M, Saliba AE, Gasteiger G, Kastenmüller W. 2022. Lymphatic migration of unconventional T cells promotes site-specific immunity in distinct lymph nodes. *Immunity* 55: 1813-28.e9
16. Xu C, Li S, Fulford TS, Christo SN, Mackay LK, Gray DH, Uldrich AP, Pellicci DG, D IG, Koay HF. 2023. Expansion of MAIT cells in the combined absence of NKT and  $\gamma\delta$ -T cells. *Mucosal Immunol*
17. Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. 2023. T cells in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8: 235

18. Hagel JP, Garner LC, Bilton M, Mehta H, Leng T, Hackstein CP, Phalora P, Amini A, Akther HD, Provine NM, Edmans M, Willberg CB, Klenerman P. 2020. Human MAIT Cell Activation In Vitro. *Methods Mol Biol* 2098: 97-124
19. Chen Z, Wang H, D'Souza C, Sun S, Kostenko L, Eckle SB, Meehan BS, Jackson DC, Strugnelli RA, Cao H, Wang N, Fairlie DP, Liu L, Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J, Corbett AJ. 2017. Mucosal-associated invariant T-cell activation and accumulation after in vivo infection depends on microbial riboflavin synthesis and co-stimulatory signals. *Mucosal Immunol* 10: 58-68
20. Corbett AJ, Eckle SB, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, Chen Z, Reantragoon R, Meehan B, Cao H, Williamson NA, Strugnelli RA, Van Sinderen D, Mak JY, Fairlie DP, Kjer-Nielsen L, Rossjohn J, McCluskey J. 2014. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature* 509: 361-5
21. Wang H, Kjer-Nielsen L, Shi M, D'Souza C, Pediongco TJ, Cao H, Kostenko L, Lim XY, Eckle SBG, Meehan BS, Zhu T, Wang B, Zhao Z, Mak JYW, Fairlie DP, Teng MWL, Rossjohn J, Yu D, de St Groth BF, Lovrecz G, Lu L, McCluskey J, Strugnelli RA, Corbett AJ, Chen Z. 2019. IL-23 costimulates antigen-specific MAIT cell activation and enables vaccination against bacterial infection. *Sci Immunol* 4
22. Ussher JE, Bilton M, Attwod E, Shadwell J, Richardson R, de Lara C, Mettke E, Kurioka A, Hansen TH, Klenerman P, Willberg CB. 2014. CD161<sup>++</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur J Immunol* 44: 195-203
23. Sattler A, Dang-Heine C, Reinke P, Babel N. 2015. IL-15 dependent induction of IL-18 secretion as a feedback mechanism controlling human MAIT-cell effector functions. *Eur J Immunol* 45: 2286-98
24. Leng T, Akther HD, Hackstein CP, Powell K, King T, Friedrich M, Christoforidou Z, McCuaig S, Neyazi M, Arancibia-Carcamo CV, Hagel J, Powrie F, Oxford IBDI, Peres RS, Millar V, Ebner D, Lamichhane R, Ussher J, Hinks TSC, Marchi E, Willberg C, Klenerman P. 2019. TCR and Inflammatory Signals Tune Human MAIT Cells to Exert Specific Tissue Repair and Effector Functions. *Cell Rep* 28: 3077-91 e5
25. Reantragoon R, Corbett AJ, Sakala IG, Gherardin NA, Furness JB, Chen Z, Eckle SB, Uldrich AP, Birkinshaw RW, Patel O, Kostenko L, Meehan B, Kedzierska K, Liu L, Fairlie DP, Hansen TH, Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J, Kjer-Nielsen L. 2013. Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J Exp Med* 210: 2305-20
26. Rahimpour A, Koay HF, Enders A, Clanchy R, Eckle SB, Meehan B, Chen Z, Whittle B, Liu L, Fairlie DP, Goodnow CC, McCluskey J, Rossjohn J, Uldrich AP, Pellicci DG, Godfrey DI. 2015. Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MR1 tetramers. *J Exp Med* 212: 1095-108
27. Legoux F, Gilet J, Procopio E, Echasserieau K, Bernardeau K, Lantz O. 2019. Molecular mechanisms of lineage decisions in metabolite-specific T cells. *Nat Immunol* 20: 1244-55
28. Wang H, Souter MNT, de Lima Moreira M, Li S, Zhou Y, Nelson AG, Yu J, Meehan LJ, Meehan BS, Eckle SBG, Lee HJ, Schröder J, Haque A, Mak JYW, Fairlie DP, McCluskey J, Wang Z, Chen Z, Corbett AJ. 2024. MAIT cell plasticity enables functional adaptation that drives antibacterial immune protection. *Sci Immunol* 9: eadp9841
29. Bottcher K, Rombouts K, Saffioti F, Roccarina D, Rosselli M, Hall A, Luong T, Tsochatzis EA, Thorburn D, Pinzani M. 2018. MAIT cells are chronically activated in patients with autoimmune liver disease and promote profibrogenic hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 68: 172-86
30. Zhang Y, Bailey JT, Xu E, Singh K, Lavaert M, Link VM, D'Souza S, Hafiz A, Cao J, Cao G, Sant'Angelo DB, Sun W, Belkaid Y, Bhandoola A, McGavern DB, Yang Q. 2022. Mucosal-associated invariant T cells restrict reactive oxidative damage and preserve meningeal barrier integrity and cognitive function. *Nat Immunol* 23: 1714-25
31. Mills KHG. 2023. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. *Nature Reviews Immunology* 23: 38-54
32. Hengst J, Strunz B, Deterding K, Ljunggren HG, Leeansyah E, Manns MP, Cornberg M, Sandberg JK, Wedemeyer H, Bjorkstrom NK. 2016. Nonreversible MAIT cell-dysfunction in

- chronic hepatitis C virus infection despite successful interferon-free therapy. *Eur J Immunol* 46: 2204-10
33. Gibbs A, Leeansyah E, Introini A, Paquin-Proulx D, Hasselrot K, Andersson E, Broliden K, Sandberg JK, Tjernlund A. 2017. MAIT cells reside in the female genital mucosa and are biased towards IL-17 and IL-22 production in response to bacterial stimulation. *Mucosal Immunol* 10: 35-45
  34. Kelly J, Minoda Y, Meredith T, Cameron G, Philipp MS, Pellicci DG, Corbett AJ, Kurts C, Gray DH, Godfrey DI, Kannourakis G, Berzins SP. 2019. Chronically stimulated human MAIT cells are unexpectedly potent IL-13 producers. *Immunol Cell Biol* 97: 689-99
  35. Gherardin NA, Souter MN, Koay HF, Mangas KM, Seemann T, Stinear TP, Eckle SB, Berzins SP, d'Udekem Y, Konstantinov IE, Fairlie DP, Ritchie DS, Neeson PJ, Pellicci DG, Uldrich AP, McCluskey J, Godfrey DI. 2018. Human blood MAIT cell subsets defined using MR1 tetramers. *Immunol Cell Biol* 96: 507-25
  36. Krebs CF, Reimers D, Zhao Y, Paust HJ, Bartsch P, Nuñez S, Roseblatt MV, Hellmig M, Kilian C, Borchers A, Enk LUB, Zinke M, Becker M, Schmid J, Klinge S, Wong MN, Puelles VG, Schmidt C, Bertram T, Stumpf N, Hoxha E, Meyer-Schwesinger C, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Rink M, Kurts C, Franzenburg S, Koch-Nolte F, Turner JE, Riedel JH, Huber S, Gagliani N, Huber TB, Wiech T, Rohde H, Bono MR, Bonn S, Panzer U, Mittrücker HW. 2020. Pathogen-induced tissue-resident memory T(H)17 (T(RM)17) cells amplify autoimmune kidney disease. *Sci Immunol* 5
  37. Zhao Y, Kilian C, Turner JE, Bosurgi L, Roedl K, Bartsch P, Gnirck AC, Cortesi F, Schultheiß C, Hellmig M, Enk LUB, Hausmann F, Borchers A, Wong MN, Paust HJ, Siracusa F, Scheibel N, Herrmann M, Rosati E, Bacher P, Kyllies D, Jarczack D, Lütgehetmann M, Pfefferle S, Steuerer S, Zur-Wiesch JS, Puelles VG, Spermhake JP, Addo MM, Lohse AW, Binder M, Huber S, Huber TB, Kluge S, Bonn S, Panzer U, Gagliani N, Krebs CF. 2021. Clonal expansion and activation of tissue-resident memory-like Th17 cells expressing GM-CSF in the lungs of severe COVID-19 patients. *Sci Immunol* 6
  38. Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, Houck-Loomis B, Chattopadhyay PK, Swerdlow H, Satija R, Smibert P. 2017. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat Methods* 14: 865-8
  39. Jeffery HC, van Wilgenburg B, Kurioka A, Parekh K, Stirling K, Roberts S, Dutton EE, Hunter S, Geh D, Braitch MK, Rajanayagam J, Iqbal T, Pinkney T, Brown R, Withers DR, Adams DH, Klenerman P, Oo YH. 2016. Biliary epithelium and liver B cells exposed to bacteria activate intrahepatic MAIT cells through MR1. *J Hepatol* 64: 1118-27
  40. Law BMP, Wilkinson R, Wang X, Kilday K, Giuliani K, Beagley KW, Ungerer J, Healy H, Kassianos AJ. 2019. Human Tissue-Resident Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) Cells in Renal Fibrosis and CKD. *J Am Soc Nephrol* 30: 1322-35
  41. Walkenhorst M, Sonner JK, Meurs N, Engler JB, Bauer S, Winschel I, Woo MS, Raich L, Winkler I, Vieira V, Unger L, Salinas G, Lantz O, Friese MA, Willing A. 2024. Protective effect of TCR-mediated MAIT cell activation during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Commun* 15: 9287
  42. Croxford JL, Miyake S, Huang YY, Shimamura M, Yamamura T. 2006. Invariant V(alpha)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol* 7: 987-94
  43. Ruijing X, Mengjun W, Xiaoling Z, Shu P, Mei W, Yingcheng Z, Yuling H, Jinqun T. 2012. Jα33+ MAIT cells play a protective role in TNBS induced intestinal inflammation. *Hepatology* 59: 762-7
  44. Yasutomi Y, Chiba A, Haga K, Murayama G, Makiyama A, Kuga T, Watanabe M, Okamoto R, Nagahara A, Nagaishi T, Miyake S. 2022. Activated Mucosal-associated Invariant T Cells Have a Pathogenic Role in a Murine Model of Inflammatory Bowel Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 13: 81-93
  45. Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S. 2012. Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum* 64: 153-61

46. Murayama G, Chiba A, Suzuki H, Nomura A, Mizuno T, Kuga T, Nakamura S, Amano H, Hirose S, Yamaji K, Suzuki Y, Tamura N, Miyake S. 2019. A Critical Role for Mucosal-Associated Invariant T Cells as Regulators and Therapeutic Targets in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* 10: 2681
47. Kitching AR, Anders HJ, Basu N, Brouwer E, Gordon J, Jayne DR, Kullman J, Lyons PA, Merkel PA, Savage COS, Specks U, Kain R. 2020. ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Dis Primers* 6: 71
48. Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. 1993. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med* 178: 1-16
49. Lamichhane R, Schneider M, de la Harpe SM, Harrop TWR, Hannaway RF, Dearden PK, Kirman JR, Tyndall JDA, Vernall AJ, Ussher JE. 2019. TCR- or Cytokine-Activated CD8(+) Mucosal-Associated Invariant T Cells Are Rapid Polyfunctional Effectors That Can Coordinate Immune Responses. *Cell Rep* 28: 3061-76.e5
50. Hinks TSC, Marchi E, Jabeen M, Olshansky M, Kurioka A, Pediongco TJ, Meehan BS, Kostenko L, Turner SJ, Corbett AJ, Chen Z, Klenerman P, McCluskey J. 2019. Activation and In Vivo Evolution of the MAIT Cell Transcriptome in Mice and Humans Reveals Tissue Repair Functionality. *Cell Rep* 28: 3249-62 e5
51. Efremova M, Vento-Tormo M, Teichmann SA, Vento-Tormo R. 2020. CellPhoneDB: inferring cell-cell communication from combined expression of multi-subunit ligand-receptor complexes. *Nat Protoc* 15: 1484-506
52. Li Y, Huang B, Jiang X, Chen W, Zhang J, Wei Y, Chen Y, Lian M, Bian Z, Miao Q, Peng Y, Fang J, Wang Q, Tang R, Gershwin ME, Ma X. 2018. Mucosal-Associated Invariant T Cells Improve Nonalcoholic Fatty Liver Disease Through Regulating Macrophage Polarization. *Front Immunol* 9: 1994
53. Bao N, Fu B, Zhong X, Jia S, Ren Z, Wang H, Wang W, Shi H, Li J, Ge F, Chang Q, Gong Y, Liu W, Qiu F, Xu S, Li T. 2023. Role of the CXCR6/CXCL16 axis in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* 121: 110530
54. Morgan AJ, Guillen C, Symon FA, Birring SS, Campbell JJ, Wardlaw AJ. 2008. CXCR6 identifies a putative population of retained human lung T cells characterised by co-expression of activation markers. *Immunobiology* 213: 599-608
55. Zheng MZM, Wakim LM. 2022. Tissue resident memory T cells in the respiratory tract. *Mucosal Immunology* 15: 379-88
56. Yu H, Yang A, Liu L, Mak JYW, Fairlie DP, Cowley S. 2020. CXCL16 Stimulates Antigen-Induced MAIT Cell Accumulation but Trafficking During Lung Infection Is CXCR6-Independent. *Front Immunol* 11: 1773
57. Riedel JH, Paust HJ, Turner JE, Tittel AP, Krebs C, Disteldorf E, Wegscheid C, Tiegs G, Velden J, Mittrücker HW, Garbi N, Stahl RA, Steinmetz OM, Kurts C, Panzer U. 2012. Immature renal dendritic cells recruit regulatory CXCR6(+) invariant natural killer T cells to attenuate crescentic GN. *J Am Soc Nephrol* 23: 1987-2000
58. Walker LSK, Sansom DM. 2011. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nature Reviews Immunology* 11: 852-63
59. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, Hou TZ, Futter CE, Anderson G, Walker LS, Sansom DM. 2011. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332: 600-3
60. Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, Lynn RC, Philip M, Rao A, Restifo NP, Schietinger A, Schumacher TN, Schwartzberg PL, Sharpe AH, Speiser DE, Wherry EJ, Youngblood BA, Zehn D. 2019. Defining 'T cell exhaustion'. *Nature Reviews Immunology* 19: 665-74
61. Berkson JD, Slichter CK, DeBerg HA, Delaney MA, Woodward-Davis AS, Maurice NJ, Lwo Y, Ko A, Hsu J, Chiu YW, Linsley PS, Dixon D, Prlic M. 2020. Inflammatory Cytokines Induce Sustained CTLA-4 Cell Surface Expression on Human MAIT Cells. *Immunohorizons* 4: 14-22

62. Fazekas B, Moreno-Olivera A, Kelly Y, O'Hara P, Murray S, Kennedy A, Conlon N, Scott J, Melo AM, Hickey FB, Dooley D, O'Brien EC, Moran S, Doherty DG, Little MA. 2018. Alterations in circulating lymphoid cell populations in systemic small vessel vasculitis are non-specific manifestations of renal injury. *Clin Exp Immunol* 191: 180-8
63. Sakai S, Kauffman KD, Oh S, Nelson CE, Barry CE, Barber DL. 2021. MAIT cell-directed therapy of Mycobacterium tuberculosis infection. *Mucosal Immunology* 14: 199-208
64. Deng Z, Fan T, Xiao C, Tian H, Zheng Y, Li C, He J. 2024. TGF- $\beta$  signaling in health, disease and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9: 61
65. Huang XR, Chung AC, Zhou L, Wang XJ, Lan HY. 2008. Latent TGF-beta1 protects against crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 19: 233-42
66. Zhang F, Wang H, Wang X, Jiang G, Liu H, Zhang G, Wang H, Fang R, Bu X, Cai S, Du J. 2016. TGF- $\beta$  induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget* 7: 52294-306
67. Mehta T, Buzkova P, Kizer JR, Djousse L, Chonchol M, Mukamal KJ, Shlipak M, Ix JH, Jalal D. 2017. Higher plasma transforming growth factor (TGF)- $\beta$  is associated with kidney disease in older community dwelling adults. *BMC Nephrology* 18: 98
68. Li J, Zou Y, Kantapan J, Su H, Wang L, Dechsupa N. 2024. TGF- $\beta$ /Smad signaling in chronic kidney disease: Exploring post-translational regulatory perspectives (Review). *Mol Med Rep* 30

## 6 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten wir in unseren Sequenzierungsdaten zeigen, dass verschiedene Typen von intrarenalen MAIT-Zellen in der experimentellen Glomerulonephritis aktiviert werden und zum Großteil einen MAIT-17-Phänotyp aufweisen. In Nierenbiopsien aus PatientInnen mit humaner ANCA-assoziierten Vaskulitis lässt sich ein entsprechendes Korrelat von MAIT-17-Zellen finden. Während MAIT-Zell-defiziente *Mr1<sup>-/-</sup>*-Mäuse eine schwerere Verlaufsform der experimentellen Glomerulonephritis im Vergleich zu B6-Mäusen aufweisen, haben B6<sup>CAST</sup>-Mäuse einen leichteren Verlauf. Wir schlussfolgern daher einen protektiven Effekt von MAIT-Zellen. MAIT-17-Zellen befinden sich in anatomischer Nähe zu mononukleären Phagozyten und exprimieren immunmodulierende Moleküle wie PD-1, CTLA-4 und TGF- $\beta$ . In unserer Interaktom-Analyse konnten wir zudem eine CXCR6-CXCL16-vermittelte Interaktion ermitteln. Experimentell konnten wir zeigen, dass eine Blockade dieser Achse einen Teil des protektiven Effekts annihiliert. Zuletzt konnten wir demonstrieren, dass eine Stimulation der MAIT-Zellen durch den MAIT-TCR-Liganden 5-OP-RU therapeutisch gegen die experimentellen Glomerulonephritis wirksam ist.

### Summary

In summary, we were able to show in our sequencing data that different types of intrarenal MAIT cells are activated in experimental glomerulonephritis and the majority exhibits a MAIT-17 phenotype. In renal biopsies from patients with human ANCA-associated vasculitis, a corresponding population of MAIT-17 cells can be found. While MAIT cell-deficient *Mr1<sup>-/-</sup>*-mice show a more severe course of experimental glomerulonephritis compared to B6 mice, B6<sup>CAST</sup> mice have a milder course. We therefore conclude a protective effect of MAIT cells. MAIT-17 cells are located in anatomical proximity to mononuclear phagocytes and express immunomodulatory molecules such as PD-1, CTLA-4 and TGF- $\beta$ . In our interactome analysis, we also identified a CXCR6-CXCL16-mediated interaction. Experimentally, we were able to show that blockade of this axis annihilates part of the protective effect. We were further able to show that stimulation of MAIT cells by the MAIT-TCR ligand 5-OP-RU is therapeutically effective against experimental glomerulonephritis.

## 7 Erklärung des Eigenanteils

Im Folgenden erläutere ich meinen Eigenanteil an der vorliegenden Publikation. Das Projekt basiert auf den Ergebnissen von Dr. med. Malte Wunderlich und Dr. rer. nat. Ann-Christin Gnirck, die mittels Durchflusszytometrie MAIT-Zellen in der Maus charakterisierten (siehe Figur 2 der Publikation). Zudem führten sie experimentelle Glomerulonephritis-Modelle an B6-, B6<sup>Cast</sup>- und Mr-KO-Mäusen durch (siehe Figur 4 der Publikation).

Ich führte eigenständig die scRNA-Sequenzierungsanalysen zu den humanen Datensätzen durch (siehe Figur 1 der Publikation). Dazu gehörte die Erstellung des MAIT-Scores/NKT-Scores aus dem bereits publizierten COVID/Pneumonie-scRNA-Sequenzierungsdatensatz und dessen Anwendung auf den bereits publizierten ANCA-Vaskulitis-Datensatz, die transkriptionelle Charakterisierung der humanen MAIT-Zellen sowie die Erstellung eines humanen Aktivierungsscores aus einem bereits publizierten Datensatz zu differentiell exprimierten Genen von *in vitro* aktivierten MAIT-Zellen.

Ein weiterer Teil meiner Arbeit bezog sich auf den Sequenzierungsdatensatz muriner, renaler MAIT-Zellen aus naiven Mäusen sowie nach Induktion der experimentellen Glomerulonephritis (siehe Figur 3 der Publikation). Diesen Datensatz erstellte ich in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Ann-Christin Gnirck und Virginia Adamiak. Die darauffolgenden Analysen führte ich eigenständig durch, einschließlich des Alignments der Sequenzierungsdaten auf ein murines Referenzgenom, des Clusterings und der Annotation des Datensatzes, der Charakterisierung der MAIT-Zellen sowie der Erstellung eines murinen Aktivierungsscores aus einem bereits publizierten Datensatz.

Zudem führte ich eigenständig die Analysen zu den Interaktionen zwischen den beiden MAIT-Clustern und anderen Immunzellen durch (siehe Figur 5 der Publikation). Der Datensatz der Immunzellen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Ann-Christin Gnirck und Virginia Adamiak erstellt. Die konfokalen Aufnahmen der renalen MAIT-Zellen stammen von Dr. Nikhat Shaikh. Mein Anteil umfasste die Berechnung und Analyse potenzieller Interaktionen mithilfe der Datenbank *CellPhoneDB* sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen aus Figur 5 sowie die CXCL16-Blockade-Experimente aus Figur 6 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Ann-Christin Gnirck durchgeführt. Die Stimulation der MAIT-Zellen mit 5-OP-RU erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Marie-Sophie Phillip am Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie (IMMEI) in Bonn. Ich führte zudem eine Reihe von Transfer- und *in vitro*-Expansionsexperimenten durch, die jedoch nicht im Manuskript enthalten sind.

Die statistische Datenanalyse, das Erstellen der Abbildungen und das Schreiben des Manuskripts erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Jan-Eric Turner, Prof. Dr. med. Christian Kurts, Dr. rer. nat. Ann-Christin Gnirck und Dr. rer. nat. Marie-Sophie Phillip

## **8 Danksagungen**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jan-Eric Turner für die hervorragende Betreuung, die mich sowohl fachlich als auch persönlich in den letzten Jahren geprägt hat. Vielen Dank für die stets offene Tür, die wertvollen wissenschaftlichen Impulse und die Begeisterung für die Forschung, die Du mir vermittelt hast.

Ebenso danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für die fachliche Unterstützung und die zahlreichen bereichernden Momente. Besonders erwähnen möchte ich Dr. rer. nat. Ann-Christin Gnirck, PhD Nikhat Shaikh und Virginia Adamiak für ihre wertvollen Beiträge, die konstruktiven Diskussionen und die enge Zusammenarbeit. Mein Dank gilt zudem Dr. rer. nat. Marie-Sophie Phillip für ihre Unterstützung bei den Experimenten sowie allen weiteren Ko-Autoren dieser Publikation für ihre wissenschaftlichen Beiträge und ihr Engagement.

Für die finanzielle Förderung und die exzellenten Forschungsmöglichkeiten danke ich dem SFB1192. Mein Dank gilt hierbei Prof. Dr. Tobias Huber und Prof. Dr. Ulf Panzer für ihr außerordentliches Engagement und die Schaffung einer herausragenden wissenschaftlichen Umgebung, die diese Arbeit ermöglicht hat.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, 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. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

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

Datum

Unterschrift

