Neutralization of IL-6 inhibits formation of autoreactive TH17 cells but does not prevent loss of renal function in experimental autoimmune glomerulonephritis

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Karen-Maria Brede

aus

Niebüll

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Ulf Panzer

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Ulf Panzer

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Oliver Michael Steinmetz

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger

Datum der mündlichen Prüfung: 10.09.2026

Inhaltsverzeichnis

1. Originalarbeit der Publikationspromotion 4

2. Darstellung der Publikation 17

2.1 Einleitung 17

2.2 Material und Methoden 21

2.3 Ergebnisse 23

2.4 Diskussion 25

3. Zusammenfassung 29

3.1 Zusammenfassung 29

3.2 Abstract 30

4. Literaturverzeichnis 31

5. Abkürzungsverzeichnis 36

6. Erklärung des Eigenanteils 38

7. Danksagung 39

8. Eidesstattliche Versicherung 40

1. Originalarbeit der Publikationspromotion

Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/immlet

Neutralization of IL-6 inhibits formation of autoreactive TH17 cells but does not prevent loss of renal function in experimental autoimmune glomerulonephritis

Karen-Maria Brede [a], Joanna Schmid [a], Oliver M. Steinmetz [b], Ulf Panzer [b,c], Stefanie Klinge [a,1], Hans-Willi Mittrücker [a,c,*,1]

[a] Department for Immunology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany
[b] III. Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany
[c] Hamburg Center for Translational Immunology (HCTI), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Kidney
Glomerulonephritis
IL-6
TH17 cells

ABSTRACT

In anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis (anti-GBM GN), antibodies and T cells directed against the Goodpasture antigen, the non-collagenous domain of the α3-chain of type IV collagen (α3(IV)NC1), provoke renal inflammation resulting in rapidly progressing crescentic GN. Interleukin 6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine with both pro- and anti-inflammatory activities, and IL-6 blockade is successfully used for treatment of diseases associated with acute and chronic inflammation. However, the role of IL-6 in anti-GBM GN is unclear. Here, we use the mouse model of experimental autoimmune glomerulonephritis (EAG) to study the role of IL-6 in anti-GBM GN. DBA/1J mice were immunized with α3(IV)NC1 and developed fatal crescentic GN. Treatment of mice with neutralizing anti-IL-6 antibodies impaired the generation of α3(VI)NC1-specific TH1 and TH17 cells. However, despite lasting reduction of the TH17 cell response, antibody treatment did not prevent crescentic GN. Antibody treatment was also ineffective in a therapeutic setting with pre-existing autoantibodies and T cells. In conclusion, our results indicate that although the blockade of IL-6 impairs the development of autoimmunity against α3(VI)NC1, this treatment does not ameliorate crescentic GN both in a preemptive and a therapeutic approach.

1. Introduction

The anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis (anti-GBM GN) belongs to the group of rapidly progressive autoimmune kidney diseases. In anti-GBM GN, autoantibodies are formed against cryptic epitopes within the non-collagenous (NC1) domains of the α3- and α5-chain of type IV collagen. Type IV collagen fibers are end-to-end linked at the C-terminus by their non-collagenous domains which build a barrel-like structure, consisting of each two α3(IV)NC1, α4(IV)NC1 and α5(IV)NC1 domains. The epitopes of anti-α3(IV)NC1 and anti-α5(IV) NC1 autoantibodies are hidden within these NC1 hexamers and are only accessible if the structure has opened, i.e. due to GBM damage or turnover. During disease, autoantibodies likely bind to accessible epitopes. Local activation of the complement system and of innate immune cells cause damage of the GBM resulting in accelerated binding of autoantibodies along the GBM. Injury of the GBM eventually causes glomerular crescent formation and severe tubulointerstitial inflammation. If untreated, disease rapidly progresses to final kidney failure [1-3].

Besides pathogenic autoantibodies, $CD4^+$ T cells also play a crucial role in disease development and progression. Autoantibodies are IgG with high affinity indicating a role of $CD4^+$ T cells in class switch and affinity maturation. Susceptibility to anti-GBM-disease is associated

Abbreviations: α3(IV)NC1, non-collagenous domain of the α3-chain of type IV collagen; ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibody; anti-GBM GN, anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis; BUN, blood urea nitrogen; CFA, complete Freund's adjuvant; EAG, experimental autoimmune glomerulonephritis; GBM, glomerular basement membrane; GN, glomerulonephritis; IFA, incomplete Freund's adjuvant; NTN, nephrotoxic nephritis; PAS, periodic acid-Schiff; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.

* Corresponding author at: Department for Immunology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany.
E-mail address: h.mittruecker@uke.de (H.-W. Mittrücker).

[1] Both the author have equal contribution to this work.

https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.05.002
Received 22 September 2020; Received in revised form 31 January 2021; Accepted 11 May 2021

with the HLA-DRB1*×1501 allele, and α3(IV)NC1-specific CD4$^+$ T cells can be isolated from patients with anti-GBM GN [4-6]. Studies in several animal models further show that TH1 and TH17 cells are essential for the development of crescentic GN [7-11].

Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine with multiple functions within the immune system. It is known to be a potent regulator of immune responses and inflammation, with activity both on leucocytes and non-hematopoietic cells. Depending on the type and conditions of the immune response, IL-6 signaling can be pro- as well as anti-inflammatory [12]. IL-6 plays a central role in the induction of TH17 cells [13-16] which are required for the control of extracellular pathogens but are also considered as main culprit in several autoimmune diseases including different entities of crescentic GN [17]. On the other hand, IL-6 promotes the alternative activation of macrophages to anti-inflammatory and tissue protective type 2 macrophages [18].

IL-6 and its receptor are promising targets for the development of specific biologics, and monoclonal anti-IL-6Rα antibodies are already successfully used to treat patients suffering from rheumatoid arthritis or juvenile idiopathic arthritis [19-21]. Patients with crescentic GN have elevated concentrations of IL-6 in serum and urine suggesting a role of the cytokine in these diseases [22]. Currently, the role of IL-6 in crescentic GN is unclear and might also depend on the underlying disease. In patients with lupus nephritis, anti-IL-6 antibody treatment was ineffective in improving renal function [23,24]. Case reports demonstrate a beneficial effect of anti-IL-6Rα antibodies in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) associated vasculitis [25]. Overall, results are still inconclusive and the topic requires more extensive studies.

The role of IL-6 in anti-GBM GN has been studied in the rodent model of nephrotoxic nephritis (NTN) which is considered a relevant model for the acute phase of the disease. Treatment of rats with IL-6 during NTN induction reduced renal inflammation and preserved renal function [26,27]. More recently, three studies confirmed the protective function of IL-6 in mouse NTN models [22,28,29]. Luig et al. demonstrated that treatment of C57BL/6 mice with anti-IL-6 or anti-IL-6Rα antibodies aggravated NTN. In depth analyses suggested that protection was at least in part due to the induction of anti-inflammatory type 2 macrophages by IL-6 [18,28]. Braun et al. could show that inhibition of IL-6 trans-signaling – the activation of cells by binding of soluble IL-6/IL-6Rα complexes to the ubiquitously expressed gp130 chain of the IL-6R [12] – caused milder disease, and induction of IL-6 trans-signaling with a soluble IL-6/IL-6Rα fusion protein aggravated disease. Augmented renal disease was associated with enhanced IL-17A synthesis and reduced expression of type 2 macrophage markers in the kidney. Interestingly, total blockade of IL-6 with anti-IL-6 antibodies had no effect on disease progression in this study [22]. Finally, by using C57BL/6 mice deficient in IL-6Rα expression in different CD4$^+$ T cell subsets, Hagenstein et al. could demonstrate that IL-6 enhanced the TH17 cell response but was also required for the induction of RORγt$^+$ regulatory T cells (Treg cells), and that these RORγt$^+$ Treg cells provided dominant kidney protection in NTN [29]. Overall, studies in the NTN model support rather a protective function of IL-6 in anti-GBM GN, however, the underlying mechanisms need further investigation.

In the current study, we aim to test the role of IL-6 in the development of anti-GBM GN in the model of experimental autoimmune glomerulonephritis (EAG). In contrast to the transfer of nephrotoxic antibodies in the acute NTN model, EAG is induced by repeated immunization of DBA/1 mice with the autoantigen α3(IV)NC1. Mice develop high serum titers of anti-α3(IV)NC1 IgG and IgG deposits are found along the GBM [30]. In addition, α3(IV)NC1-specific TH1 and TH17 cells can be isolated from spleen and kidney [8]. Within 10–12 weeks, mice develop a fatal glomerulonephritis with profound glomerular crescent formation and severe renal inflammation[7]. In the study, IL-6 was neutralized with anti-IL-6 antibodies during the induction of autoimmunity and in the late stage during development of acute crescentic GN, and mice were analyzed for the development of autoreactive antibodies and T cells as well as for the severity of kidney disease.

2. Material and methods

2.1. Animal experiments

DBA/1J mice were purchased from Charles River (Sulzfeld, Germany). They were housed under SPF conditions at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf and all animal experiments were approved by the local committee for animal experiments of the City of Hamburg (registration numbers: 58/16).

To induce the experimental autoimmune glomerulonephritis (EAG), mice were subcutaneously immunized with 30 μg of recombinant human (h) α3(IV)NC1 in complete Freund's adjuvant (CFA) and boosted three times with 30 μg of antigen in incomplete Freund's adjuvant (IFA). The detailed immunization protocol and the production of recombinant h-α3(IV)NC1 has been described previously [7,30].

To deplete IL-6, mice were injected with 400 μg anti-IL-6 mAb (clone MP5–20F3, BioXCell, Lebanon, USA). Control mice received 400 μg of control IgG (Rat Gamma Globulin, Jackson Immunoresearch, Cambridgeshire, UK). The injection was done intraperitoneal and according to the experimental setup.

In all experiments, mice were controlled daily and scored for body weight, general condition, spontaneous behavior and severe signs of renal failure. Critical endpoints were development of edema and ascites. Mice were sacrificed at indicated time points or due to high disease score, organs were then harvested and further analyzed.

2.2. Functional studies

Urine and blood samples were taken at various time points during the experiments. Mice were housed in metabolic cages for urine collection and albuminuria was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (Mouse Albumin ELISA Quantitation Set; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Blood urea nitrogen (BUN) was measured by standard laboratory methods, cholesterol was measured by either standard laboratory methods or by using the free cholesterol ChOD-PAP method (mti-diagnostics GmbH, Idstein, Germany) and plasma anti-mouse α3(IV)NC1 antibodies were detected by indirect ELISA. Plasma concentrations of IL-6 were measured using the Mouse IL-6 ELISA MAX™ Standard Set (BioLegend, San Diego, CA).

2.3. Histology and immunohistochemistry

Renal tissue was fixed in 4% formalin overnight and embedded in paraffin. After PAS-staining of tissue sections, crescent formation was analyzed as described before [30]. Renal sections were stained with AP-conjugated anti-mouse IgG antibodies (Jackson Immunoresearch). Sections were developed with the Vectastain ABC-AP kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Glomerular mouse IgG deposition was scored from 0 to 3 in 30 glomeruli per mouse. Tissue evaluation was done in a blinded fashion.

2.4. Isolation of cells from spleen and kidney and in vitro stimulation of spleen cells

Cells from spleens were isolated by mashing the organs through a 70 μm cell sieve followed by erythrocyte lysis using lysis buffer (pH 7.2, 155 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 10 μM EDTA). To determine cytokine production, spleen cells were stimulated polyclonally with 50 ng/ ml phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma Aldrich, München, Germany) and 1 μM ionomycin (Sigma Aldrich) or specifically with 54 μg/ ml h-α3(IV)NC1 in the presence of 10 μg/ ml brefeldin A (Sigma Aldrich) for 8 h before staining.

Cells from kidneys were obtained by enzymatic digestion with 250 μg/ ml Collagenase D (Sigma Aldrich) and 10 IE/ ml DNase I (Sigma

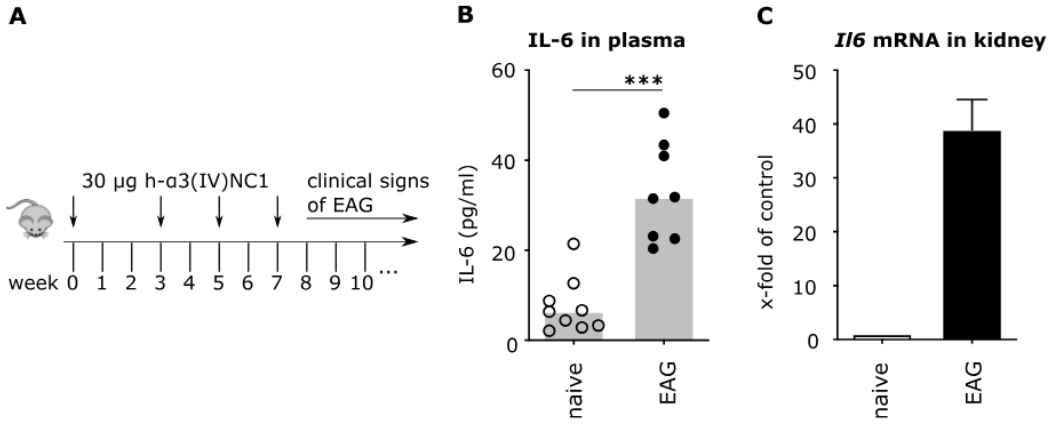


Fig. 1. *IL-6 in Experimental Autoimmune Glomerulonephritis (EAG).*
DBA/1J mice were immunized s.c. with 30 µg of human-α3(IV)NC1 in CFA and boosted three times with 30 µg of human-α3(IV)NC1 in IFA. (**A**) Schematic overview of the EAG model. (**B**) IL-6 was measured by ELISA in the plasma of end-stage disease mice (EAG) and control mice (naïve). Symbols represent individual mice and bars show medians of each group. ***$p<0.001$ (Mann-Whitney test). (**C**) Renal *Il6* mRNA was determined by quantitative PCR in EAG mice and naive controls (n = 5–8 per group). Bar graph shows mean +/- SEM and naïve samples were set to 1.

Aldrich) for 45 min followed by a gradient centrifugation using 37% Easycoll solution (Merck Millipore, Burlington, USA). After erythrocyte lysis, cells were filtered through a 40 µm cell sieve and used for flow cytometry.

2.5. Flow cytometry

Fluorochrome-labeled antibodies against CD4 (clone RM4–5), CD8α (clone 53–6.7), CD11b (clone M1/70), CD45 (clone 30-F11), CD154 (clone MR1), F4/80 (clone BM8), Ly6C (clone HK1.4), Ly6G (clone 1A8), FOXP3 (clone FJK-16S), RORγt (clone Q31–378), IFN-γ (clone XMG1.2), IL-17A (clone eBio17B7) and TNF-α (clone MP6-XT22) were purchased from BioLegend (San Diego, CA), eBiosciences (San Diego, CA), R&D Systems (Minneapolis, MN) and BD Biosciences (Heidelberg, Germany). Samples were blocked with rat serum and anti-CD16/ CD32 antibody (clone 2.4G2, BioXCell, West Lebanon, NH) for unspecific binding prior to surface staining. Intracellular and nuclear staining was done with the FOXP3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBiosciences) according to the manufacturer's guide. Cells were acquired with a FACSCanto II or FACSCelesta (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo (FlowJo, LLC., Ashland, OR).

2.6. Statistical analysis

All statistical analysis was done with GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). For proteinuria, BUN, antibody titers and histological results, medians +/- SEM are shown and groups were compared with Mann and Whitney U test. For comparison of more than two groups, we used the Kruskal-Wallis H test followed by post hoc analysis according to Dunn. For FACS results, IgG deposition and mRNA expression levels, means +/- SEM are shown and groups were compared by t-test, or in case of three groups, one-way ANOVA was used followed by post hoc Bonferroni test. Development of clinical disease was compared with the Log-rank (Mantel-Cox) test. A p value <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Neutralizing IL-6 impairs the development of α3(IV)NC1-specific autoimmunity

To test the role of IL-6 in anti-GBM GN, we applied the mouse model of experimental autoimmune glomerulonephritis (EAG) [30] in which DBA1/J mice are immunized with the non-collagenous domain of the α3-chain of type IV collagen (α3(IV)NC1), one of the autoantigens of human anti-GBM GN. Mice were immunized with α3(IV)NC1 in complete Freund's adjuvant and boosted three times with α3(IV)NC1 in incomplete Freund's adjuvant (Fig. 1A). Using this regiment, DBA1/J mice develop autoantibodies and CD4$^+$ T cells directed against the α3(IV)NC1 peptide. This response results in the deposition of IgG along the GBM and eventually the formation of fatal crescentic glomerulonephritis [7,30]. Using this model, we observed enhanced levels of IL-6 in the circulation and high levels of *Il6* mRNA in kidneys of mice that had developed glomerulonephritis (Fig. 1B, 1C).

EAG is associated with the formation α3(IV)NC1-specific CD4$^+$ TH1 and TH17 cells, and both T cell subsets are required for crescent formation [8]. To test whether IL-6 is required for the formation of these cells, mice were immunized in the presence of neutralizing anti-IL-6 antibodies or control IgG [28]. (Fig. 2A) After 10 days, we observed a strong increase in the frequencies of neutrophil granulocytes, inflammatory monocytes and macrophages in spleens of immunized mice treated with control antibodies when compared to naïve mice. There was also a slight but not significant increase of RORγt$^+$ TH17 cells but not of FOXP3$^+$ Treg cells (Fig. 2B, Suppl. Fig. 1). These changes most likely reflected the immune response towards the highly inflammatory activity of complete Freund's adjuvant. Anti-IL-6 treatment significantly blocked the expansion of all three populations of myeloid cells and prevented the increase in RORγt$^+$ cells, consistent with an essential pro-inflammatory activity of IL-6 in this setting.

Spleen cells were stimulated either polyclonally with PMA and ionomycin, or with α3(IV)NC1 and the expression of TNF-α, IFN-γ and IL-17A was analyzed (Fig. 2C and D, Suppl. Fig. 1). In addition, cells were stained for CD154/CD40L. CD154 is rapidly upregulated in conventional CD4$^+$ T cells in response to TCR stimulation. Determining the CD154 expression in combination with cytokine expression allows reliable identification of low frequencies of responding CD4$^+$ T cells [31]. Polyclonal stimulation caused production of TNF-α by a large fraction of CD4$^+$ T cells in all groups of mice. There were only low frequencies of CD154$^+$ IL-17A$^+$ TH17 cells and CD154$^+$ IFN-γ$^+$ TH1 cells in naïve mice after PMA/ ionomycin stimulation. In T cells from immunized mice treated with control IgG, stimulation resulted in a significant increase in the percentage of CD154$^+$ IL-17A$^+$ CD4$^+$ T cells, consistent with the increase in RORγt$^+$ CD4$^+$ T cells. Treatment of mice with anti-IL-6 mAb completely abrogated this increase. We did not

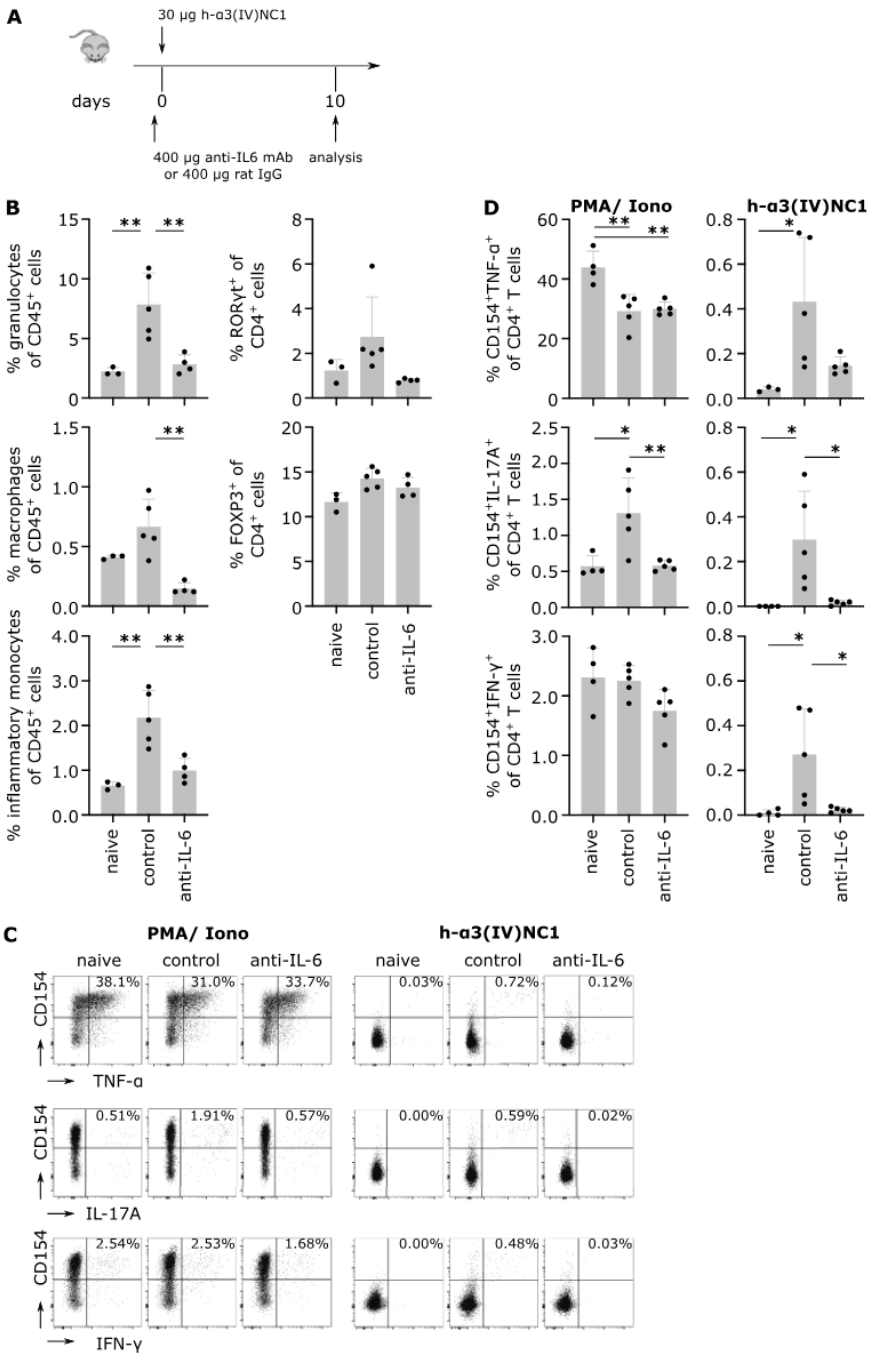


Fig. 2. *Anti-IL-6 mAb treatment impairs the α3(IV)NC1-specific T cell response.*
DBA/1J mice were immunized s.c. with 30 µg of human-α3(IV)NC1 in CFA. Eight hours before immunization, one group of mice was treated i.p. with 400 µg anti-mouse IL-6 mAb (anti-IL-6), another group received 400 µg of rat IgG (control), and a third group remained untreated and was also not immunized (naïve). Ten days after immunization, spleens were harvested and analyzed by flow cytometry. **(A)** Schematic overview of the experimental design. **(B)** Frequencies of neutrophil granulocytes, macrophages, inflammatory monocytes, RORγt$^+$ TH17 cells and FOXP3$^+$ Treg cells. **(C, D)** Spleen cells were stimulated polyclonally with 50 ng/ ml PMA and 1 µM ionomycin, or specifically with 54 µg/ ml of h-α3(IV) NC1 for eight hours in the presence of 10 µg/ ml brefeldin A. Cytokine$^+$ and CD154$^+$ CD4$^+$ *T* cells were determined by intracellular antibody staining and flow cytometry. **(C)** Representative dot plots for CD4$^+$ *T* cells from each experimental group. **(D)** Frequencies of CD154$^+$ cytokine$^+$ CD4$^+$ T cells after stimulation with either PMA/ Iono or h-α3(IV)NC1. The gating strategy for identification of cell populations is shown in Supplement Fig. 1. Symbols represent individual mice and bar graphs show mean +/- SD. *$p<0.05$, **$p<0.01$ (One-way ANOVA test with Bonferroni's multiple comparisons test).

observe a difference in the CD154$^+$ IFN-γ$^+$ CD4$^+$ T cell populations between anti-IL-6 and control IgG treated mice. Frequencies of CD4$^+$ T cells responding with cytokine production to α3(IV)NC1 stimulation were below the detection level of our assay in naïve mice. In contrast, we observed significant populations of CD4$^+$ T cells responding with production of TNF-α, IL-17A and IFN-γ to α3(IV)NC1 stimulation in immunized mice treated with control IgG. Treatment of mice with anti-IL-6 mAb caused reduction of frequencies of CD154$^+$ IL-17A$^+$ and CD154$^+$ IFN-γ$^+$ CD4$^+$ T cells almost to the background level of naïve mice. CD154$^+$ TNF-α$^+$ CD4$^+$ T cells were reduced as well, but reduction did not reach the level of significance.

Polyclonal and α3(IV)NC1-specific CD4$^+$ T cell responses were also measured one week after the first boost immunization (Suppl. Fig. 2A+B). At this time point, immunized mice treated with anti-IL-6

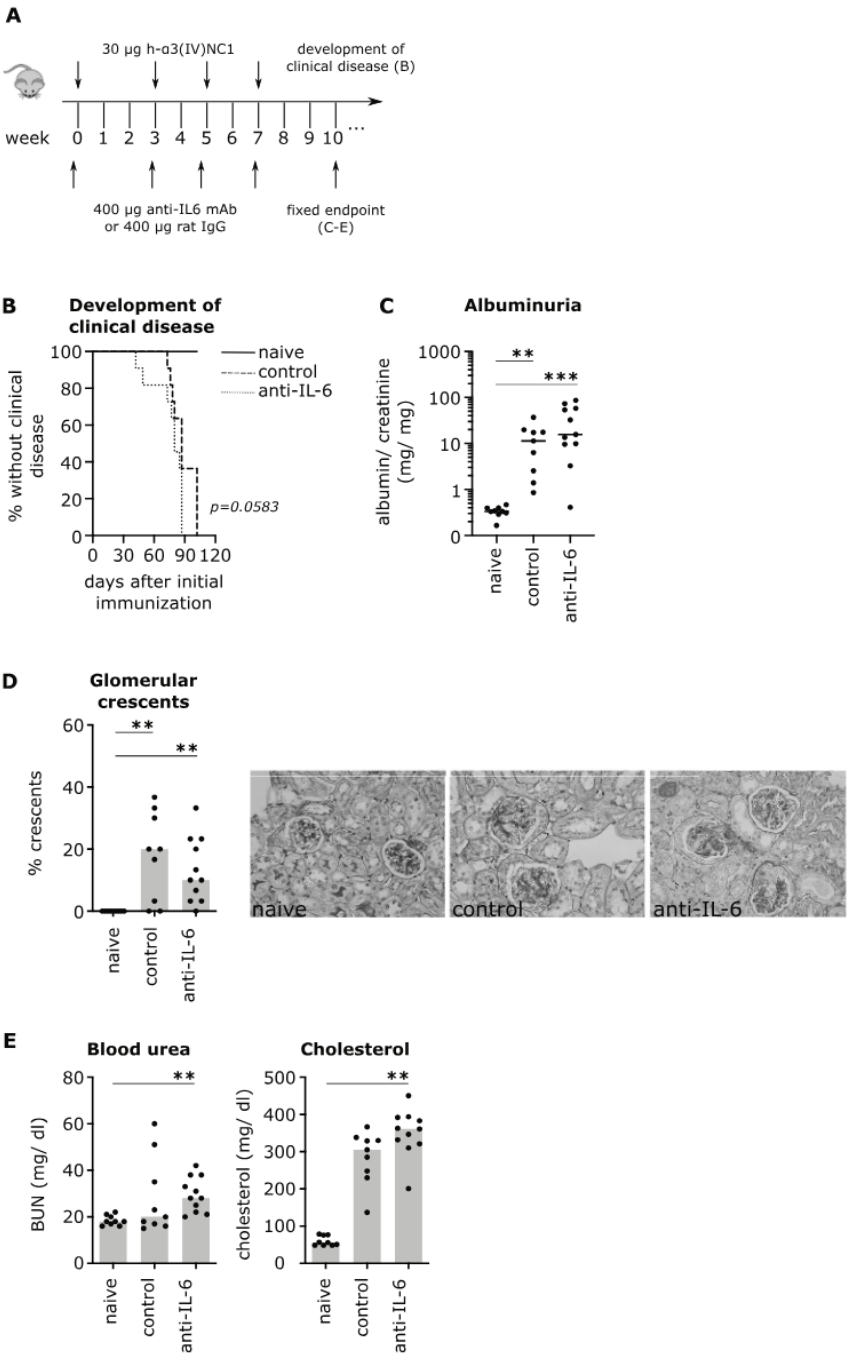


Fig. 3. *Neutralization of IL-6 does not prevent development of renal disease.*
DBA/1J mice were immunized s.c. with 30 µg of human-α3(IV)NC1 in CFA and boosted three times with 30 µg of human-α3(IV)NC1 in IFA. Eight hours before each immunization, one group of mice was treated i.p. with 400 µg of anti-mouse IL-6 mAb (anti-IL-6), another group received 400 µg of rat IgG (control), and a third group stayed untreated and was also not immunized (naïve). **(A)** Schematic overview of the experimental design. In one setup, mice were sacrificed individually after showing signs of severe clinical disease **(B)**. In another setup, mice were sacrificed ten weeks after the initial immunization and organs were harvested **(C-E)**. **(B)** Development of clinical disease (n = 9–11 mice per group; p = 0.0583 control versus anti-IL-6 (Log-rank test)). **(C)** Urinary albumin was determined at week 10 by ELISA. Symbols represent individual mice and horizontal lines show the median value. **(D)** Paraffin-embedded kidney sections were periodic acid-Schiff stained and glomerular crescent formation was analyzed by light microscopy. Symbols represent individual mice and bar graphs show median values. **(E)** Blood samples were analyzed after sacrificing the mice. Blood urea nitrogen (BUN) and cholesterol levels were determined by standard laboratory methods. Symbols represent individual mice and bar graphs show median values. (**C-E**) $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ (Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test).

mAb and with control IgG showed similar frequencies of CD154$^+$ IL-17A$^+$ and CD154$^+$ IFN-γ$^+$ CD4$^+$ T cells after polyclonal stimulation. In contrast, we still observed reduced frequencies of CD154$^+$ IL-17A$^+$ and CD154$^+$ IFN-γ$^+$ CD4$^+$ T cells after stimulation with α3(IV)NC1 in anti-IL-6 mAb treated mice. We also analyzed the plasma levels of mouse α3(IV)NC1-specific autoantibodies (Suppl. Fig. 2C). We detected α3(IV)NC1-specific antibodies in immunized mice, however, there was no difference between groups treated with anti-IL6 mAb and with control IgG. Plasma levels of IL-6 in anti-IL-6-treated mice were similar to those in naïve mice, while we could detect a significant increase in control IgG-treated mice (Suppl. Fig. 2D). In summary, treatment of mice with anti-IL-6 mAb during immunization prevented the formation of α3(IV)NC1-specific TH1 and TH17 cells.

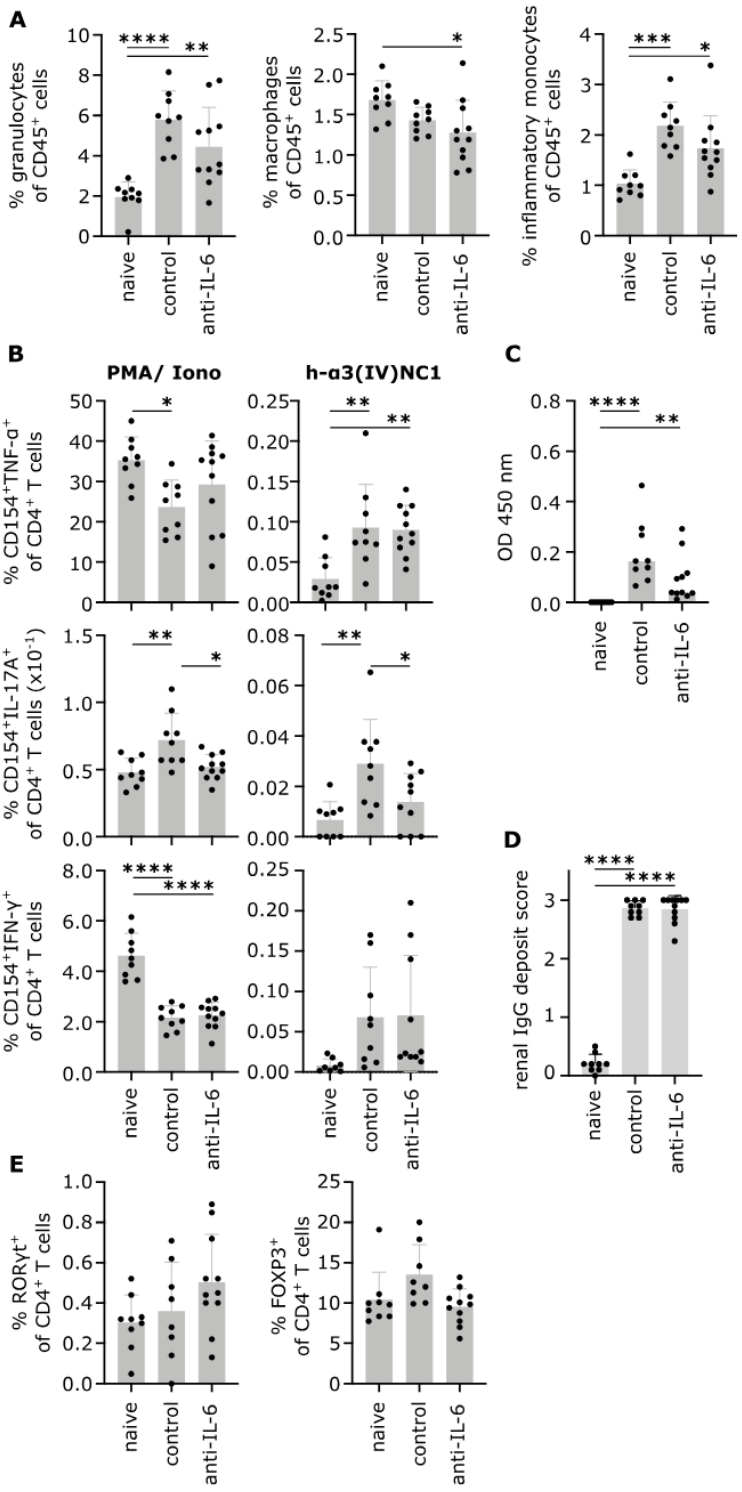


Fig. 4. *Anti-IL-6 mAb treatment reduced α3(IV)NC1-specific TH17 cell responses in end stage EAG but does not prevent development of renal disease.*

DBA/1J mice were immunized s.c. with 30 μg of human-α3(IV)NC1 in CFA and boosted three times with 30 μg of human-α3(IV)NC1 in IFA. Eight hours before each immunization, one group of mice was treated i.p. with 400 μg of anti-mouse IL-6 mAb (anti-IL-6), another group received 400 μg of rat IgG (control), and a third group stayed untreated and was also not immunized (naïve). Ten weeks after the initial immunization, mice were sacrificed and organs were harvested. **(A)** Spleen cells were stained extracellularly for identification of neutrophil granulocytes, macrophages and inflammatory monocytes by flow cytometry. **(B)** Spleen cells were stimulated polyclonally with 50 ng/ ml PMA and 1 μM ionomycin, or specifically with 54 μg/ ml of h-α3(IV)NC1 for eight hours in the presence of 10 μg/ ml brefeldin A. Cytokine$^+$ and CD154$^+$ CD4$^+$ T cells were determined by intracellular antibody staining and flow cytometry. Frequencies of CD154$^+$cytokine$^+$ CD4$^+$ T cells after stimulation with either PMA/ Iono or h-α3(IV) NC1 are shown. The gating strategy for identification of cell populations is shown in Supplement Fig. 1. **(C)** Specific antibodies against mouse (m)-α3(IV)NC1 were measured in plasma samples (1:5000 diluted) by indirect ELISA. **(D)** Kidney sections were stained for mouse IgG and glomerular deposition was semiquantitatively scored (score 0–3). **(E)** Leukocytes purified from kidneys were stained extracellularly for identification of CD4$^+$ T cells and intracellularly for RORγt$^+$ TH17 cells and FOXP3$^+$ Treg cells by flow cytometry. Symbols represent individual mice and bar graphs show mean +/- SD (**A, B, D, E**) or the median (**C**). $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$, $^{****}p<0.0001$ (**A, B, D, E** One-way ANOVA test with Bonferroni's multiple comparisons test; **C** Mann and Whitney U test).

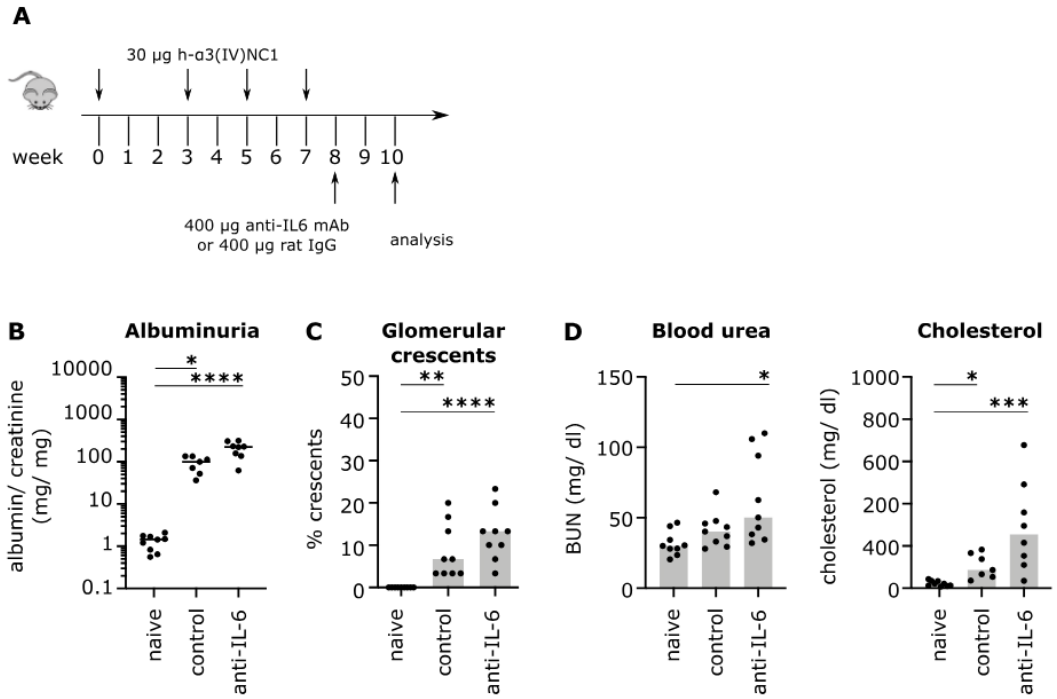


Fig. 5. *Neutralizing of IL-6 during acute renal disease does not alter disease severity.*
DBA/1J mice were immunized s.c. with 30 µg of human-α3(IV)NC1 in CFA and boosted three times with 30 µg of human-α3(IV)NC1 in IFA. After eight weeks, mice were treated with 400 µg of rat IgG (control) or of anti-IL-6 mAb. A third group of mice was not immunized or treated with antibodies (naïve). Ten weeks after the initial immunization, mice were sacrificed and organs were harvested. **(A)** Schematic overview of the experimental design. **(B)** Albuminuria was determined in week 10 by ELISA. Symbols represent individual mice and horizontal lines show the median values. **(C)** Paraffin-embedded kidney sections were periodic acid-Schiff stained and glomerular crescent formation was analyzed by light microscopy. Symbols represent individual mice and bar graphs show median values. **(D)** Blood urea nitrogen (BUN) and cholesterol were determined by standard laboratory methods. Symbols represent individual mice and bar graphs show median values. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$, $^{****}p<0.0001$ (Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test).

3.2. Effect of anti-IL6 mAb treatment on the development of EAG

To test whether the neutralization of IL-6 alters the formation and progression of autoimmune disease, DBA/1 mice were immunized as shown in Fig. 3A. Prior to immunization and each boost, mice were treated with either anti-IL-6 mAb or control IgG. Mice were evaluated daily during the whole experiment and animals with severe signs of GN were killed (Fig. 3B). Compared to control treated mice, mice receiving anti-IL-6 mAb developed earlier severe renal disease. To investigate if mice treated with anti-IL-6 during EAG progression also show differences in kidney pathology and immune cell responses, mice were treated as described before but this time, we analyzed all mice 10 weeks after the initial immunization. All immunized mice developed high albuminuria, glomerular crescents formation and elevated levels of cholesterol. However, there was no differences between mice that had received anti-IL-6 mAb and control IgG (Fig. 3C-E). Immunized mice showed slightly increased blood urea concentrations (Fig. 3E). Of note, in the EAG model markedly enhanced blood urea concentrations are usually only observed in animals with extensive crescent formation.

Immune cells in spleen and kidney were also analyzed at the stage of developing clinical disease. Direct *ex vivo* staining of spleen cells for inflammatory monocytes, macrophages and neutrophil granulocytes revealed still slightly lower frequencies in anti-IL-6 mAb treated mice when compared to control IgG treated mice, however, differences were not significant anymore (Fig. 4A). Spleen cells were stimulated polyclonally with PMA/ ionomycin or specifically with α3(IV)NC1 to analyze the cytokine production by $CD4^+$ T cells. We did not detect any differences in the frequencies of $CD154^+$ TNF-α^+ or $CD154^+$ IFN-γ^+ $CD4^+$ T cells between mice treated with anti-IL-6 mAb or control IgG (Fig. 4B). But similar to our observation after 10 days and four weeks, anti-IL-6 mAb treated mice had still significant lower frequencies of $CD154^+$ IL-17A$^+$ $CD4^+$ T cells (Fig. 4B). Interestingly, neutralization of IL-6 had an effect on the levels of autoantibodies against m-α3(IV)NC1. Compared to the control IgG group, these mice had lower titers of autoantibodies in peripheral blood (Fig. 4C). However, despite reduction in circulating m-α3(IV)NC1-specific antibodies, glomerular IgG deposition in anti-IL-6 mAb treated mice was similar to that observed in control IgG treated mice (Fig. 4D, Suppl. Fig. 3). Analysis of renal $CD4^+$ T cells revealed only minor differences in the frequencies of RORγt$^+$ TH17 cells and of $FOXP3^+$ Treg cells within the $CD4^+$ T cell population (Fig. 4E).

3.3. IL-6 neutralization during active disease does not alter severity of EAG

In a therapeutic setting, we tested if neutralization of IL-6 in the late phase of EAG can attenuate disease severity. Mice were immunized as shown in Fig. 5A and treatment was started eight weeks after the initial immunization. At this time point, immunized mice in the EAG model show anti-α3(IV)NC1-specific antibodies, glomerular IgG deposition and proteinuria, but no glomerular crescent formation and only marginal renal infiltration and tubulointerstitial damage [7]. One group of mice received 400 µg of the neutralizing anti-IL-6 antibody once a week and another group received 400 µg of control IgG. After ten weeks, all mice were sacrificed and organs were further analyzed. Compared to a third

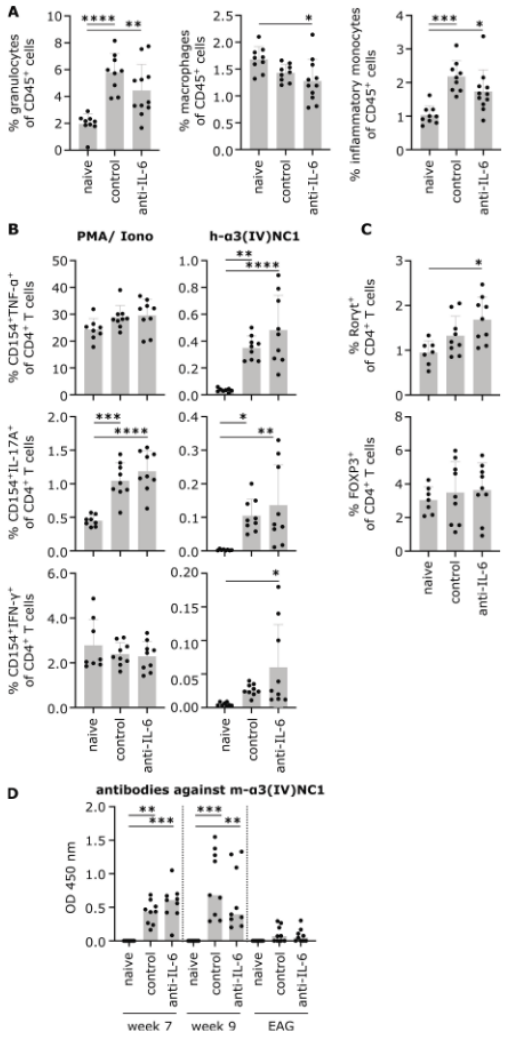


Fig. 6. *Neutralizing IL-6 during acute renal disease has no impact on splenic myeloid cells, kidney CD4 T cells or α3(IV)NC1-specific immune responses.*
DBA/1J mice were immunized s.c. with 30 μg of human-α3(IV)NC1 in CFA and boosted three times with 30 μg of human-α3(IV)NC1 in IFA. After eight weeks, mice were treated with 400 μg of rat IgG (control) or of anti-IL-6 mAb. A third group of mice was not immunized or treated with antibodies (naïve). Ten weeks after the initial immunization, mice were sacrificed and organs were harvested. **(A)** Spleen cells were stained extracellularly for determination of myeloid cell populations by flow cytometry. **(B)** Spleen cells were stimulated polyclonally with 50 ng/ ml PMA and 1 μM ionomycin, or specifically with 54 μg/ ml of h-α3 (IV)NC1 for eight hours in the presence of 10 μg/ ml brefeldin A. Cytokine$^+$ and CD154$^+$ CD4$^+$ T cells were determined by intracellular antibody staining and flow cytometry. Frequencies of CD154$^+$ cytokine$^+$ CD4$^+$ T cells are shown. The gating strategy for identification of cell populations is shown in Supplement Fig. 1. **(C)** Kidney cells were stained extracellularly for CD4 T cells and intracellularly for identification of RORγt$^+$ TH17 cells and FOXP3$^+$ Treg cells by flow cytometry. **(D)**Specific antibodies against mouse (m)-α3(IV)NC1 were measured in plasma samples at indicated time points by indirect ELISA. Samples were diluted 1:10,000 (week 7 and EAG) or 1:5000 (week 9). Symbols represent individual mice and bar graphs show mean +/- SD **(A-D)** or median values **(D)**. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 (**A-C** One-way ANOVA test with Bonferroni's multiple comparisons test; **D** Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test).

group of mice that stayed untreated and were also not immunized, both experimental groups developed severe signs of kidney failure (Fig. 5B-D). However, we did not detect significant differences between the anti-IL-6 mAb group and the control IgG group concerning albuminuria, BUN, cholesterol and in kidney pathology. There was rather a trend to a slightly aggravated disease in the anti-IL-6 mAb treated group.

Spleen cells were extracellularly stained for myeloid immune cell subsets and analyzed by flow cytometry (Fig. 6A and Suppl. Fig. 1A). We did not detect any differences between mice treated with anti-IL-6 mAb or control IgG. We also stimulated spleen cells either polyclonally with PMA/ ionomycin or specifically with h-α3(IV)NC1 and analyzed the cytokine production by CD4$^+$ T cells (Fig. 6C). Again, we did not observe any differences between both groups neither after polyclonal nor after specific stimulation. In the kidneys, there was no difference in the frequencies of FOXP3$^+$ Treg cells. Frequencies of RORγt$^+$ TH17 cells were higher in immunized mice but only in the anti-IL-6 mAb treated group the difference to naïve mice reached a significant level (Fig. 6C).

Analysis of autoantibody titers before and during the treatment revealed a drop in circulating antibodies at 10 weeks after primary immunization, most likely due to the severe proteinuria at this stage of disease (Fig. 6D). However, there was no difference between anti-IL-6 mAb and control IgG treated mice. Taken together, neutralizing IL-6 in the late phase of EAG had no effect on cellular and humoral immune responses.

4. Discussion

In contrast to other anti-GBM models, the EAG model encompasses two phases: the induction of autoimmunity against the GBM and after several weeks, the development of crescentic GN with fatal loss of kidney function [8,30,32,33]. Immunization of mice with α3(IV)NC1 caused splenic accumulation of neutrophil granulocytes, inflammatory monocytes and macrophages, which was probably largely due to the complete Freund's adjuvant. Anti-IL-6 mAb treatment significantly reduced this inflammatory response, indicating a pro-inflammatory function of IL-6 in this context. Consistent with the fundamental role of IL-6 in TH17 cell development [13-17], mAb treatment also reduced the frequency of total TH17 cells, as indicated by RORγt staining and IL-17A staining after polyclonal stimulation, and prevented the generation of α3(IV)NC1-specific TH17 cells. The impaired TH17 cell response against α3(IV)NC1 was long-lasting with still reduced frequencies 4 and 10 weeks after the first immunization. We also observed diminished formation of IFN-γ$^+$ α3(IV)NC1-specific TH1 cells. However, this impairment was only transient and after 10 weeks, control treated and anti-IL-6 mAb treated mice showed similar frequencies of specific TH1 cells. A role of IL-6 in the induction of TH1 cells has been described before. However, results on the function of IL-6 in TH1 cell differentiation are inconsistent and appear to strongly depend on the experimental models and the means of IL-6 blockade [34-37]. In contrast to its profound effect on the T cell response, anti-IL-6 mAb treatment only marginally affected the production of α3(IV)NC1-specific antibodies. Overall, our results indicate that IL-6 is involved in inflammation associated with immunization and in the induction of autoreactive TH17 cells but is not required for the formation of autoantibodies in EAG.

Despite the impaired specific TH17 cell response, anti-IL-6 mAb treatment did not prevent crescentic GN. On the contrary, compared to control treated mice, anti-IL-6 mAb treated mice showed somewhat accelerated development of renal disease with slightly more pronounced proteinuria and higher serum concentrations of urea and cholesterol, although changes did not reach the level of significance. In the therapeutic approach – the mAb treatment from week 8 to week 10, the period where disease progresses to crescentic GN in the EAG model [7] – we also observed no protection but rather a slightly increase in several disease parameters.

Therapeutic application of anti-IL-6 mAb, did not cause a reduction of α3(IV)NC1-specific TH1 and TH17 cells or a change in frequencies of

renal RORγt$^+$ TH17 cell and FOXP3$^+$ Treg cells. Although IL-6 is required for the development of TH17 cells, these cells are probably less dependent on IL-6 once their differentiation status is established. However, we can also not exclude that other cytokines can compensate for the absence of IL-6 in fully differentiated TH17 cells. In the therapeutic setting, anti-IL-6 mAb treatment did also not change the levels of autoantibodies. Of note, at the time point of treatment, mice already show pronounced IgG deposition along the GBM [7]. Thus, the main drivers of renal injury are most likely not affected by the treatment and could override anti-inflammatory activities of IL-6 in the kidney. Results from the mouse and rat NTN models suggest that IL-6 has anti-inflammatory properties during acute renal disease in part due to the induction of tissue protective type II macrophages and RORγt$^+$ FOXP3$^+$ biTreg cells [22,26-29]. Our results in the EAG model are consistent with these observations in that IL-6 neutralization did not cause amelioration of renal disease. However, our study so far does not allow to comment on potential pro- or anti-inflammatory processes affected by the treatment.

Anti-IL-6 mAb treatment during immunization did not affect progression and severity of disease, despite and impaired TH17 cell formation and reduced levels of circulating autoantibody. Anti-IL-6 mAb treated mice show slightly higher proteinuria, which over time also might cause reduction of circulating antibodies. However, levels of circulating α3(IV)NC1-specific antibodies were still sufficient to cause extensive glomerular deposition. Studies in the NTN and EAG model of anti-GBM GN indicate an important role of TH17 cells in crescentic GN [8,10,11,38]. However, in the NTN model, IL-6Rα-deficiency in CD4$^+$ T cells causes a reduced TH17 cell response but also an impaired Treg cell function that outweighs the reduction of TH17 cells and prevents amelioration of disease [29]. In EAG, an impaired Treg cell function but also suppression of other protective functions of IL-6 could balance this TH17 cell deficit. Together with the less affected TH1 cell response, this might be sufficient to allow progression of disease to crescentic GN in the context of an impaired TH17 cell response.

To our knowledge, there are currently no published reports on the treatment of anti-GBM GN patients with IL-6 neutralizing strategies. Studies in other diseases associated with GN, e.g. ANCA-associated vasculitis or Lupus nephritis, were inconclusive. Although improvement of some disease parameters was observed, blockade of IL-6 caused either no or only inconsistent recovery of renal functions [23-25]. Anti-GBM GN is typically diagnosed in the acute stage with rapidly deteriorating renal function. Based on our results on therapeutic treatment of EAG and the results from acute rodent NTN models, treatment of anti-GBM GN with IL-6 blocking approaches need to be considered with great care. Due to the anti-inflammatory functions of IL-6, it cannot be excluded that blockade of the cytokine even accelerates disease progression.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant CRC1192 to U.P, O.M.S. and H.-W.M.). We thank Anett Peters for technical assistance.

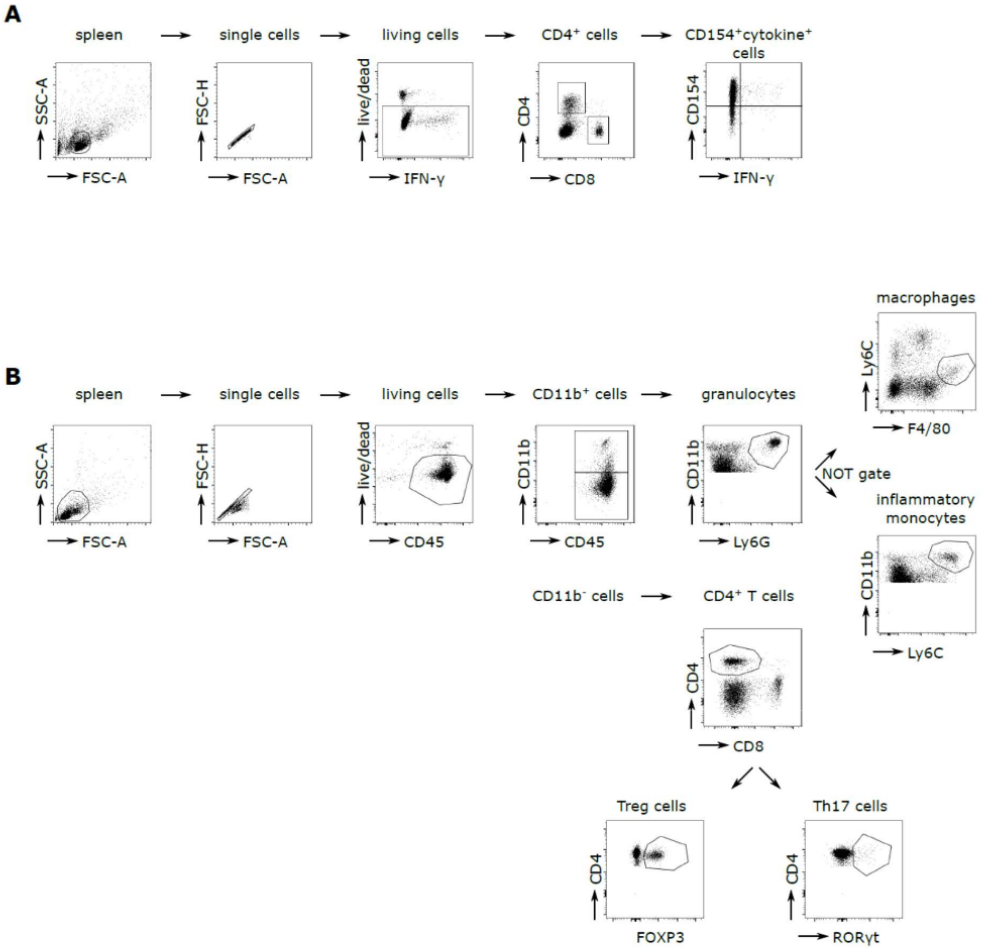
Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.imlet.2021.05.002.

References

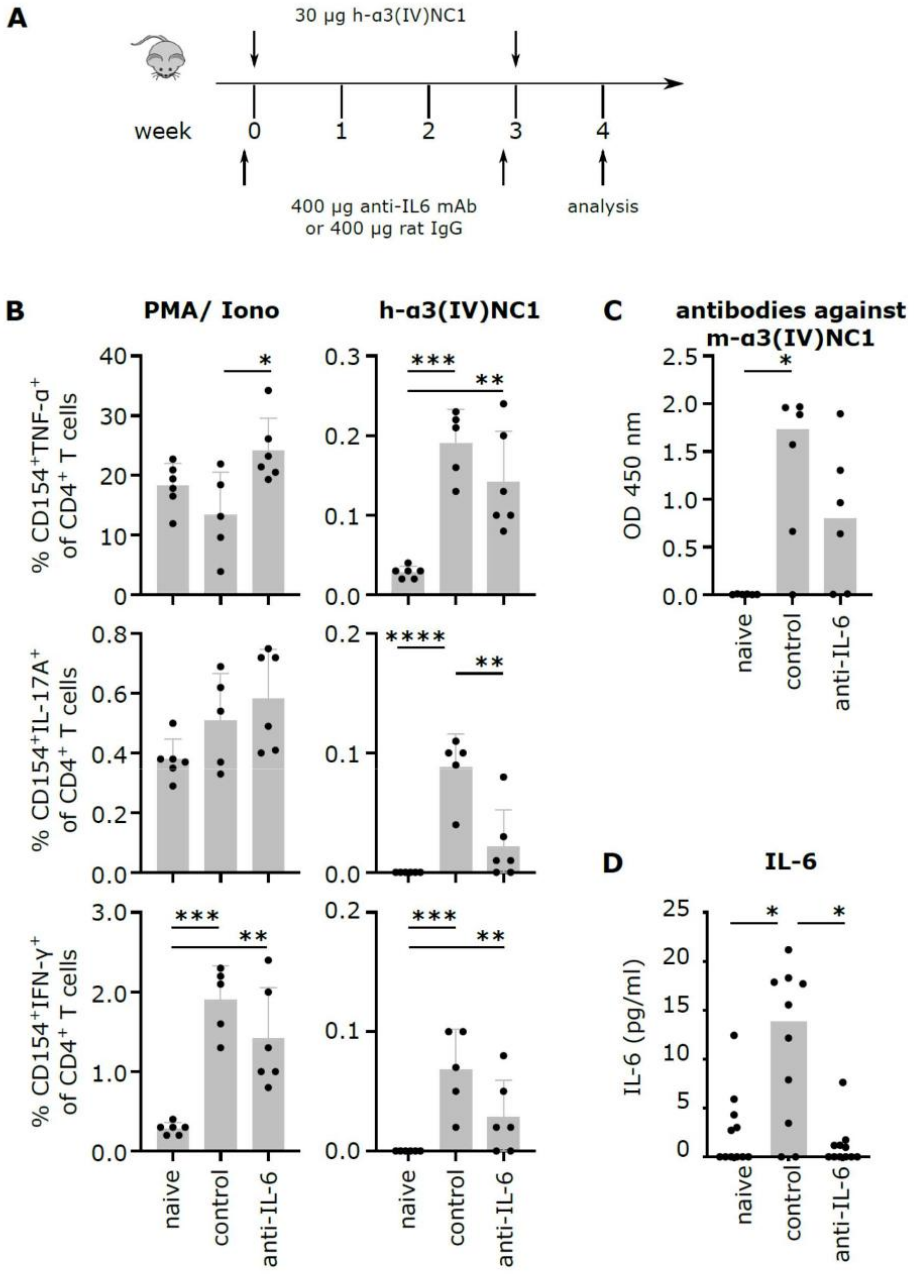
[1] B.G. Hudson, K. Tryggvason, M. Sundaramoorthy, E.G. Neilson, Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen, N. Engl. J. Med. 348 (25) (2003) 2543–2556.
[2] V. Pedchenko, O. Bondar, A.B. Fogo, R. Vanacore, P. Voziyan, A.R. Kitching AR, J. Wieslander, C. Kashtan, D.B. Borza, E.G. Neilson, C.B. Wilson, B.G. Hudson, Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis, N. Engl. J. Med. 363 (4) (2010) 343–354.
[3] S.P. McAdoo, C.D. Pusey, Anti-glomerular basement membrane disease, Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 12 (2017) 1162–1172.
[4] J.D. Ooi, J. Petersen, Y.H. Tan, M. Huynh, Z.J. Willett, S.H. Ramarathinam, P. J. Eggenhuizen, K.L. Loh, K.A. Watson, P.Y. Gan, M.A. Alikhan, N.L. Dudek, A. Handel, B.G. Hudson, L. Fugger, D.A. Power, S.G. Holt, P.T. Coates, J. W. Gregersen, A.W. Purcell, S.R. Holdsworth, N.L. La Gruta, H.H. Reid, J. Rossjohn, A.R. Kitching, Dominant protection from HLA-linked autoimmunity by antigen-specific regulatory T cells, Nature 545 (7653) (2017) 243–247.
[5] R.G. Phelps, A.J. Rees, The HLA complex in Goodpasture's disease: a model for analyzing susceptibility to autoimmunity, Kidney Int. 56 (5) (1999) 1638–1653.
[6] A.D. Salama, A.N. Chaudhry, J.J. Ryan, E. Eren, J.B. Levy, C.D. Pusey, L. Lightstone, R.I. Lechler, In Goodpasture's disease, CD4(+) T cells escape thymic deletion and are reactive with the autoantigen alpha3(IV)NC1, J. Am. Soc. Nephrol. 12 (9) (2001) 1908–1915.
[7] H. Hopfer, J. Holzer, S. Hünemörder, H.J. Paust, M. Sachs, C. Meyer-Schwesinger, J.E. Turner, U. Panzer, H.W. Mittrücker, Characterization of the renal CD4+ T-cell response in experimental autoimmune glomerulonephritis, Kidney Int. 82 (1) (2012) 60–71.
[8] S. Hünemörder, J. Treder, S. Ahrens, V. Schumacher, H.J. Paust, T. Menter, P. Matthys, T. Kamradt, C. Meyer-Schwesinger, U. Panzer, H. Hopfer, H. W. Mittrücker, TH1 and TH17 cells promote crescent formation in experimental autoimmune glomerulonephritis, J. Pathol. 237 (1) (2015) 62–71.
[9] H.J. Paust, J.E. Turner, J.H. Riedel, E. Disteldorf, A. Peters, T. Schmidt, C. Krebs, J. Velden, H.W. Mittrücker, O.M. Steinmetz, R.A.K. Stahl, U. Panzer, Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis, Kidney Int. 82 (1) (2012) 72–83.
[10] J.E. Turner, H.J. Paust, O.M. Steinmetz, U. Panzer, The Th17 immune response in renal inflammation, Kidney Int. 77 (12) (2010) 1070–1075.
[11] A.R. Kitching, S.R. Holdsworth SR, The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury, J. Am. Soc. Nephrol. 22 (2) (2011) 235–238.
[12] F. Schaper, S. Rose-John, Interleukin-6: biology, signaling and strategies of blockade, Cytokine Growth Factor Rev. 26 (5) (2015) 475–487.
[13] L. Zhou, I.I. Ivanov, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D.E. Levy, W. J. Leonard, D.R. Littman, IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways, Nat. Immunol. 8 (9) (2007) 967–974.
[14] P.R. Mangan, L.E. Harrington, D.B. O'Quinn, W.S. Helms, D.C. Bullard, C.O. Elson, R.D. Hatton, S.M. Wahl, T.R. Schoeb, C.T. Weaver, Transforming growth factor-β induces development of the TH17 lineage, Nature 441 (7090) (2006) 231–234.
[15] M. Veldhoen, R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, B. Stockinger, TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells, Immunity 24 (2) (2006) 179–189.
[16] S.N. Harbour, D.F. DiToro, S.J. Witte, C.L. Zindl, M. Gao, T.R. Schoeb, G.W. Jones, S.A. Jones, R.D. Hatton, C.T. Weaver, TH17 cells require ongoing classic IL-6 receptor signaling to retain transcriptional and functional identity, Sci. Immunol. 5 (49) (2020) eaaw2262.
[17] C.F. Krebs, T. Schmidt, J.H. Riedel, U. Panzer, T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease, Nat. Rev. Nephrol. 13 (10) (2017) 647–659.
[18] J. Mauer, B. Chaurasia, J. Goldau, M.C. Vogt, J. Ruud, K.D. Nguyen, S. Theurich, A. C. Hausen, J. Schmitz, H.S. Brönneke, E. Estevez, T.L. Allen, A. Mesaros, L. Partridge, M.A. Febbraio, A. Chawla, F.T. Wunderlich, J.C. Brüning, Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin, Nat. Immunol. 15 (5) (2014) 423–430.
[19] S.R. Holdsworth, P.Y. Gan, A.R. Kitching, Biologics for the treatment of autoimmune renal diseases, Nat. Rev. Nephrol. 12 (4) (2016) 217–231.
[20] N.L. Mallalieu, S. Wimalasundera, J.C. Hsu, W. Douglass, C. Wells, I. Calvo Penades, R. Cuttica, H.I. Huppertz, R. Joos, Y. Kimura, D. Milojevic, M. Rosenkranz, K. Schikler, T. Constantin, C. Wouters, Intravenous dosing of tocilizumab in patients younger than two years of age with systemic juvenile idiopathic arthritis: results from an open-label phase 1 clinical trial, Pediatr. Rheumatol. Online J. 17 (1) (2019) 57.
[21] C. Garbers, S. Heink, T. Korn, S. Rose-John, Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine, Nat. Rev. Drug Discov. 17 (6) (2018) 395–412.
[22] G.S. Braun, Y. Nagayama, Y. Maruta, F. Heymann, C.R. van Roeyen, B. M. Klinkhammer, P. Boor, L. Villa, D.J. Salant, U. Raffetseder, S. Rose-John, T. Ostendorf, J. Floege, IL-6 trans-signaling drives murine crescentic GN, J. Am. Soc. Nephrol. 27 (1) (2016) 132–142.
[23] B.H. Rovin, R.F. van Vollenhoven, C. Aranow, C. Wagner, R. Gordon, Y. Zhuang, S. Belkowski, B. Hsu, A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of treatment with Sirukumab (CNTO 136) in patients with active lupus nephritis, Arthritis Rheumatol. 68 (9) (2016) 2174–2183.
[24] C. Adamichou, S. Georgakis, G. Bertsias, Cytokine targets in lupus nephritis: current and future prospects, Clin. Immunol. 206 (2019) 42–52.
[25] R. Sakai, T. Kondo, T. Kurasawa, E. Nishi, A. Okuyama, K. Chino, A. Shibata, Y. Okada, H. Takei, H. Nagasawa, K. Amano, Current clinical evidence of

tocilizumab for the treatment of ANCA-associated vasculitis: a prospective case series for microscopic polyangiitis in a combination with corticosteroids and literature review, Clin. Rheumatol. 36 (10) (2017) 2383–2392.
[26] A.M. Karkar, F.W.K. Tam, A.E.I. Proudfoot, A. Meager, A.J. Rees, Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by interleukin-6, Kidney Int. 44 (5) (1993) 967–973.
[27] A.M. Karkar, J. Smith, F.W.K. Tam, C.D. Pusey, A.J. Rees, Abrogation of glomerular injury in nephrotoxic nephritis by continuous infusion of interleukin-6, Kidney Int. 52 (5) (1997) 1313–1320.
[28] M. Luig, M.A. Kluger, B. Goerke, M. Meyer, A. Nosko, I. Yan, J. Scheller, H. W. Mittrücker, S. Rose-John, R.A.K. Stahl, U. Panzer, O.M. Steinmetz, Inflammation-induced IL-6 functions as a natural brake on macrophages and limits GN, J. Am. Soc. Nephrol. 26 (7) (2015) 1597–1607.
[29] J. Hagenstein, S. Melderis, A. Nosko, M.T. Warkotsch, J.V. Richter, T. Ramcke, G. R. Herrnstadt, J. Scheller, I. Yan, H.W. Mittrücker, M.A. Kluger, O.M. Steinmetz, A novel role for IL-6 receptor classic signaling: induction of RORγt+Foxp3+ Tregs with enhanced suppressive capacity, J. Am. Soc. Nephrol. 30 (8) (2019) 1439–1453.
[30] H. Hopfer, R. Maron, U. Butzmann, U. Helmchen, H.L. Weiner, R. Kalluri, R., The importance of cell-mediated immunity in the course and severity of autoimmune anti-glomerular basement membrane disease in mice, FASEB J. 17 (8) (2003) 860–868.
[31] M. Frentsch, O. Arbach, D. Kirchhoff, B. Moewes, M. Worm, M. Rothe, A. Scheffold, S. Thiel, Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression, Nat. Med. 11 (10) (2005) 1118–1124.
[32] H. Hopfer, S. Hünemörder, J. Treder, J.E. Turner, H.J. Paust, C. Meyer-Schwesinger, U. Hopfer, M. Sachs, A. Peters, B. Bucher-Kocaoglu, S. Ahrens, U. Panzer, H.W. Mittrücker, Glomerulopathy induced by immunization with a peptide derived from the Goodpasture antigen α3IV-NC1, J. Immunol. 194 (8) (2015) 3646–3655.
[33] S. Klinge, K. Yan, D. Reimers, K.-.M. Brede, J. Schmid, H.J. Paust, C.F. Krebs, U. Panzer, H. Hopfer, H.W. Mittrücker, Role of regulatory T cells in experimental autoimmune glomerulonephritis, Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 316 (3) (2019) F572–F581.
[34] K. Lücke, I. Yan, S. Krohn, A. Volmari, S. Klinge, J. Schmid, V. Schumacher, O. M. Steinmetz, S. Rose-John, H.W. Mittrücker, Control of Listeria monocytogenes infection requires classical IL-6 signaling in myeloid cells, PLoS ONE 13 (8) (2018), e0203395.
[35] T. Tanaka, Y. Katada, S. Higa, H. Fujiwara, W. Wang, Y. Saeki, S. Ohshima, Y. Okuda, M. Suemura, T. Kishimoto, Enhancement of T helper2 response in the absence of interleukin (IL-)6; an inhibition of IL-4-mediated T helper2 cell differentiation by IL-6, Cytokine 13 (4) (2001) 193–201.
[36] S.N. Lauder, E. Jones, K. Smart, A. Bloom, A.S. Williams, J.P. Hindley, B. Ondondo, P.R. Taylor, M. Clement, C. Fielding, A.J. Godkin, S.A. Jones, A.M. Gallimore, Interleukin-6 limits influenza-induced inflammation and protects against fatal lung pathology, Eur. J. Immunol. 43 (10) (2013) 2613–2625.
[37] C.H. Ladel, C. Blum, A. Dreher, K. Reifenberg, M. Kopf, S.H.E. Kaufmann, Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice, Infect. Immun. 65 (11) (1997) 4843–4849.
[38] J.D. Ooi, A.R. Kitching, S.R. Holdsworth, Review: t helper 17 cells: their role in glomerulonephritis, Nephrology (Carlton) 15 (5) (2010) 513–521.



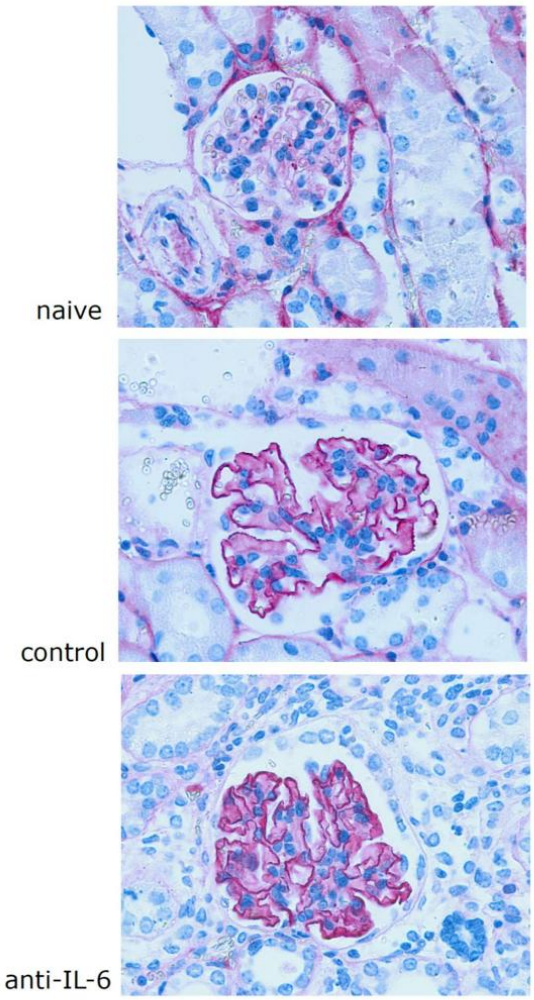
Supplement Figure 1 *Gating strategies for flow cytometry analysis.*

(A) Spleen cells were stimulated polyclonally with PMA and ionomycin or specifically with h-α3(IV)NC1 *in vitro* for eight hours. Cells were then extracellularly stained for living cells and for $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. After fixing and permeabilizing the cells, they were stained for CD154 and cytokines. **(B)** Spleen cells were directly stained for living $CD45^+$ cells and further extracellular markers to identify T cells, granulocytes, macrophages and inflammatory monocytes. Cells where then fixed, permeabilized and stained for transcription factors FOXP3 and RORγt.



Supplement Figure 2. *Anti-IL-6 mAb treatment impairs the α3(IV)NC1-specific T cell response.*

DBA/1J mice were immunized s.c. with 30 µg of human-α3(IV)NC1 in CFA and boosted after three weeks with 30 µg of human-α3(IV)NC1 in IFA. Eight hours before each immunization, one group of mice was treated i.p. with 400 µg of anti-mouse IL-6 mAb (anti-IL-6), another



Supplement Figure 3. *IgG deposition in anti-IL-6 mAb and control IgG treated mice.*
DBA/1J mice were immunized and treated as described in Fig. 4. After 10 weeks, kidney sections were analyzed for glomerular IgG deposition. Representative sections from naïve mice and mice treated with control IgG or with anti-IL-6 mAb are shown.

2. Darstellung der Publikation

2.1 Einleitung

Interleukin-6 (IL-6) gehört zu den wichtigsten Schlüsselproteinen des Immunsystems. Es erfüllt komplexe, pleiotrope physiologische Aufgaben, indem es Immunreaktionen auf vielfältige Weise fördert und steuert, jedoch kontextabhängig auch inhibierend oder regenerativ wirkt. Aufgrund seiner zentralen Rolle als potentes proinflammatorisches Zytokin ist IL-6 an einer Vielzahl akuter und chronischer Entzündungsreaktionen beteiligt. In pathophysiologischen Kontexten bietet sich daher die Möglichkeit überschießende Immunreaktionen durch die spezifische Blockade mittels neutralisierender Antikörper gegen IL-6 oder dessen Rezeptor zu modulieren. Aufgrund der komplexen und noch nicht vollständig verstandenen Physiologie des IL-6 ist der therapeutische Einsatz dieser Antikörper bislang allerdings mit häufigen und teilweise gravierenden Nebenwirkungen assoziiert (Kastrati et al. 2022). Ein tieferes Verständnis für die Wirkung und Wechselbeziehungen von IL-6 ist daher unerlässlich, sowohl für ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge der einzelnen Erkrankungen als auch für eine sichere und gezielte Anwendung von therapeutischen Antikörpern.

Wichtige pro- und antiinflammatorische Effekte von Interleukin-6

IL-6 wurde historisch gesehen zunächst als „B-Zell-stimulierender Faktor“ identifiziert, der die Reifung und Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper produzierenden Plasmazellen fördert (Kishimoto 1985, Muraguchi et al. 1988), ihr Überleben verlängert (Minges Wols et al. 2002) und die Produktion von Immunglobulinen stimuliert (Yang et al. 2016). Diese Effekte sind zum Teil auf Interaktionen mit T-Zellen zurückzuführen, auf die IL-6 in vielfältiger Weise wirkt. Als besonders wichtiger Effekt ist in diesem Kontext die Stimulation von naiven $CD4^+$ T-Zellen zur Differenzierung zu Effektor-T-Zellen zu nennen. IL-6 fördert hierbei im Zusammenspiel mit TGF-β (transforming growth factor β) die Differenzierung zu TH17-Zellen (Zhou et al. 2007, Veldhoen et al. 2006, Harbour et al. 2020). Demgegenüber reguliert IL-6 die Differenzierung zu TH1- und TH2-Zellen indirekt, durch eine gestörte Autoamplikationsschleife der jeweiligen Leitzytokine (Garbers et al. 2018, Tanaka et al. 2001, Diehl et al. 2000) und hemmt die Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen (Treg) (Mangan et al. 2006, Kimura und Kishimoto 2010). Einschränkend muss hier erwähnt werden, dass inzwischen mehrere Subgruppen der regulatorischen T-Zellen charakterisiert werden konnten, die unter IL-6 Einfluss differenzieren und proliferieren können (Garbers et al. 2018, Kluger et al. 2016, Jin et al. 2013, Krebs et al. 2017, Hagenstein et al. 2019). Darüber hinaus sind weitere wichtige proinflammatorische Eigenschaften zu nennen, die das angeborene Immunsystem betreffen. Hierzu zählt die Induktion der Akuten-Phase-Reaktion der Leber (Schaper und Rose-John 2015) sowie die indirekte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zum Ort der Schädigung (Romano et al. 1997). Im

zeitlichen Verlauf verändert sich die Wirkung von IL-6 auf die Phagozyten zu regulatorischen Effekten, indem neutrophile Granulozyten in die Apoptose geleitet werden und T-Zellen rekrutiert werden (Kaplanski et al 2003, Scheller et al. 2011). Als weitere wichtige antiinflammatorische und gewebsregenerierende Effekte des IL-6 sollen hier die Förderung der Differenzierung von Makrophagen zu geweberegenerierenden und entzündungshemmenden M2-Makrophagen (Fernando et al. 2014) und die Inhibition der Fas-vermittelten Apoptose von Parenchym- und Stromazellen genannt werden (Scheller et al. 2011, Jin et al. 2006).

In der Literatur sind verschiedene Signalwege beschrieben über die IL-6 seine Wirkung vermittelt. Der sogenannte klassische Signalweg wird durch die Bindung von IL-6 an den membranständigen IL-6-Rezeptor (IL-6R) vermittelt, der daraufhin mit dem Transmembran-Glykoprotein gp130 heterotrimerisiert und die weitere Signaltransduktion bewirkt. Der IL-6R wird nur von wenigen Zellen exprimiert, darunter Leukozyten. Ein alternativer Signalweg, der Trans-Signalweg, führt über die Bindung von IL-6 an den löslichen IL-6R (sIL-6R). Dieser Komplex aus IL-6/sIL-6R bindet wiederum an membranständiges gp130 und löst so die Signalkaskade aus (Abb. 1). Da gp130 auch Teil von weiteren Zytokinrezeptoren ist, wird das Protein von fast allen Zellen exprimiert, sodass über den Trans-Signalweg verschiedenste Zellen, auch solche die keinen IL-6R tragen, erreicht werden (Schaper und Rose-John 2015).

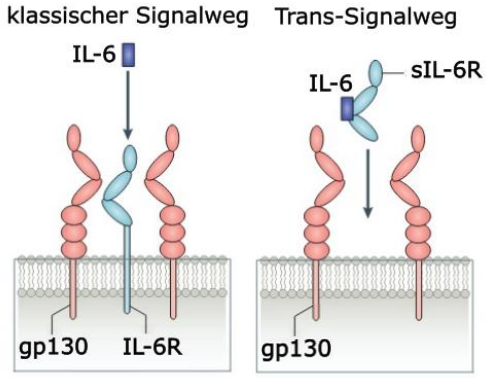


Abbildung 1: Schematische Darstellung der IL-6 Signalwege
Der klassische Signalweg wird durch die Bindung von IL-6 an den membranständigen IL-6-Rezeptor (IL-6R) in Kombination mit dem Transmembran-Glykoprotein gp130 vermittelt.
Der Trans-Signalweg wird über die Bindung von IL-6 an den löslichen IL-6R (sIL-6R) vermittelt. Als Komplex können IL-6/IL-6R an gp130 binden.
Modifiziert nach Garbers und Rose-John 2018.

Aufgrund der Expression des IL-6R auf verschiedenen Leukozytenpopulationen und auf Hepatozyten ist der klassische Signalweg vor allem bei der Regulation von Immunantworten bei akuten Infektionen wichtig. Im Gegensatz dazu wirkt der Trans-Signalweg auch auf nicht-hämatopoetische Zellen und kann insbesondere bei chronischen Entzündungsreaktionen zu Gewebeschäden beitragen (Garbers und Rose-John 2018).

Die Anti-Basalmembran-Glomerulonephritis

Die Anti-Basalmembran-Glomerulonephritis (anti-GBM-GN) ist eine seltene Autoimmunerkrankung, bei der die Basalmembran der Nierenglomeruli und häufig auch die Lungenalveolen durch autoimmune Prozesse geschädigt werden. Bei Beteiligung der Lunge wird die Erkrankung auch als

Goodpasture-Syndrom bezeichnet. Charakteristisch für die Erkrankung ist ihr fulminantes Fortschreiten bis zur häufig irreversiblen terminalen Niereninsuffizienz. Sie wird daher zu den rasch progredienten Glomerulonephritiden (RPGN) gezählt und geht mit einer vergleichsweise schlechten Prognose einher (McAdoo und Pusey 2017). Sie gehört zu den Autoimmunerkrankungen, bei denen ein konserviertes auslösendes Antigen identifiziert und detailliert charakterisiert werden konnte. Es handelt sich um Bestandteile des Typ-IV-Kollagens, genauer um die nicht-kollagene Domäne (NC1) der Alpha-3-Kette (α3) des Typ IV-Kollagens, welches ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran der Nierenglomeruli und der Lungenalveolen ist. Unter physiologischen Bedingungen liegt das Antigen α3(IV)NC1 bedingt durch die Quartärstruktur innerhalb des Moleküls verborgen (Abb. 2).

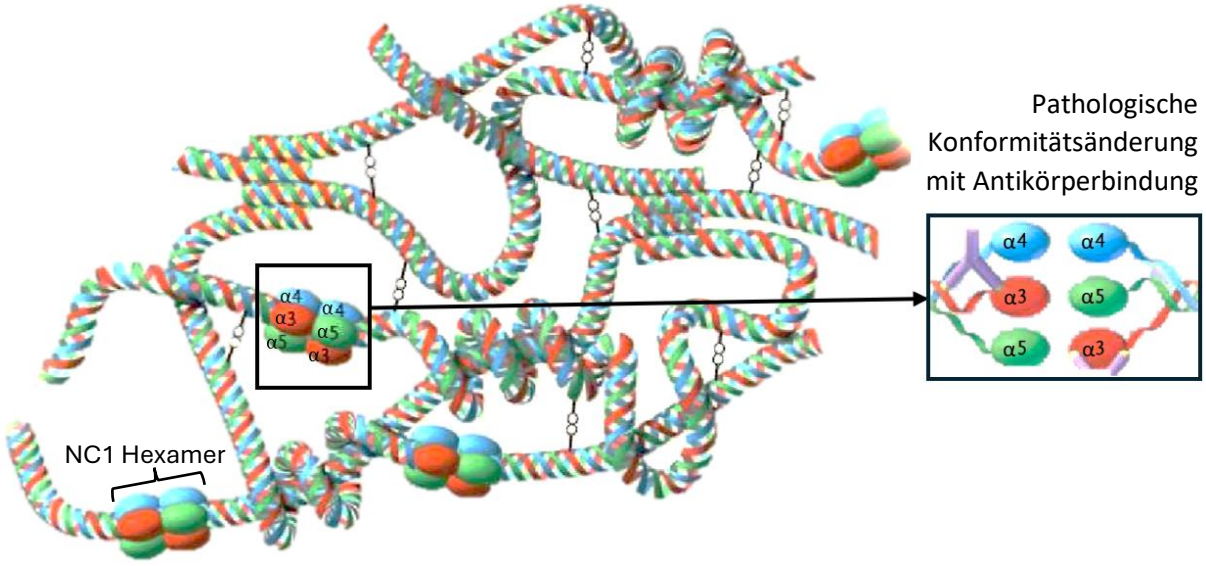


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur des Typ IV Kollagens
Das Typ IV-Kollagen besteht aus drei verschiedenen α-Helices, die jeweils eine Nicht-Kollagen-Domäne (NC1) am C-terminalen Ende aufweisen. Typ IV-Kollagene lagern sich mit ihren C-terminalen Enden zusammen, wobei die drei NC1 Domänen der beiden Kollagene ein Hexamer bilden. Die Zugänglichkeit des Epitops der Autoantikörper wird erst durch eine pathologische Konformationsänderung dieses Hexamers ermöglicht. Modifiziert nach Hudson et al. 2003.

Genetische Prädispositionen und umweltbedingte oder endogene Schädigungen der Quartärstruktur werden als Voraussetzungen für den Verlust der Selbsttoleranz und somit für den Ausbruch der Erkrankung angenommen (Phelbs und Rees 1999, Hudson et al. 2003, Pedchenko et al. 2010). Die pathophysiologisch relevante autoimmunologische Schädigung wird im Weiteren sowohl durch spezifische Autoantikörper als auch durch autoreaktive T-Zellen verursacht (Salama et al. 2001, Dean et al. 2005). Somit entsteht ein Circulus vitiosus aus weiterer Schädigung und neuer Freilegung des Antigens, der den fulminanten Verlauf der Erkrankung verursacht. Die Antibasalmembranerkrankung präsentiert sich klinisch zumeist mit deutlicher Allgemeinsymptomatik wie Fieber, Abgeschlagenheit und Appetitlosigkeit, gefolgt von Zeichen der Nierenschädigung mit Hypertonie, Hämaturie und Ödemen mit meistens hochakutem bis seltener subakutem Verlauf (McAdoo und Pusey 2017).

Die experimentelle autoimmune Glomerulonephritis

Zur Untersuchung der Anti-GBM-GN konnte durch die Identifizierung des auslösenden Antigens ein Mausmodell etabliert werden: die experimentelle autoimmune Glomerulonephritis (EAG). Diese Erkrankung spiegelt die anti-GBM-GN in wesentlichen Charakteristika wider. Die EAG wird in autoimmun suszeptiblen Mausstämmen durch viermalige Immunisierung mit dem auslösenden Antigen, dem α3(IV)NC1 Peptid, innerhalb mehrerer Wochen induziert (Hopfer et al. 2003). Die erkrankten Tiere leiden zunächst an einer zunehmenden Proteinurie ohne relevante Klinik. Nach acht bis zwölf Wochen entwickelt sich eine klinisch manifeste Erkrankung mit einzelnen oder mehreren Symptomen wie massiven Ödemen, Gewichtsverlust von über zehn Prozent des Ausgangsgewichts, Appetitlosigkeit, Selbstisolation und Apathie (Hopfer et al. 2015). In erkrankten Mäusen kann histologisch das Vollbild einer rasch progredienten Glomerulonephritis festgestellt werden, die der humanen anti-GBM-GN ähnelt. Dabei treten Nekrosen und halbmondförmige Zellproliferationen in den Glomeruli (sogenannte Crescents), und Ablagerungen von Immunglobulin G (IgG) entlang der Basalmembran auf. Weiter zeigen sich eine massive Immunzellinfiltration und eine deutliche Schädigung im Tubulointerstitium (Hopfer et al. 2003, Hopfer et al. 2015). Analog zur humanen anti-GBM-GN lassen sich α3(IV)NC1-spezifische Antikörper vornehmlich vom Typ IgG1 (Hopfer et al. 2015) und α3(IV)NC1-spezifische TH1- und TH17-Zellen (Hünemörder et al. 2015) nachweisen.

Für verschiedene experimentelle Nierenerkrankungsmodelle konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass IL-6 einen Einfluss auf die Entstehung und Schwere der Nierenschädigung hat. So sind für die durch ein nephrotoxisches Serum induzierte Nephritis krankheitsaggravierende Effekte in IL-6-defizienten Mäusen (Luig et al. 2015) und krankheitsmildernde Effekte unter Behandlung mit rekombinantem IL-6 in Ratten beschrieben (Karkar et al. 1993, Karkar et al. 1997). Andererseits wurden in zwei verschiedenen Modellen der Lupus-Nephritis wiederum krankheitsabmildernde Effekte unter IL-6-Defizienz beschrieben (Cash et al. 2010, Tsantikos et al. 2010). Insgesamt ergibt die aktuelle Literatur hinsichtlich der Rolle von IL-6 in Glomerulonephritiden ein inkonklusives Bild.

Die vorliegende Studie untersucht, ob die anti-GBM-GN im EAG-Modell durch die Blockierung von IL-6 mittels eines neutralisierenden anti-IL-6-Antikörpers modulierbar ist. Als Forschungsansatz wurden die beiden folgenden Hypothesen aufgestellt: IL-6 fördert die Entstehung der anti-GBM-GN und IL-6 unterstützt die renale Entzündungsreaktion.

2.2 Material und Methoden

Eine detailliertere Darlegung der verwendeten Methoden und Materialien, einschließlich der Herstellerangaben findet sich in der publizierten Originalausgabe (siehe Seite 4 ff) in dieser Dissertation. Verweise mit der Bezeichnung Figure beziehen sich ebenfalls auf die Abbildungen der publizierten Originalausgabe in dieser Dissertation.

Zur Prüfung der aufgestellten Hypothesen wurde das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis in DBA/1J-Mäusen gemäß dem Immunisierungsschema nach Hopfer et al. (Hopfer et al. 2003) angewendet (Figure 1A). Die Produktion des Antigens α3(IV)NC1 erfolgte rekombinant, in Zellkultur unter Verwendung von transfizierten HEK235-Zellen. Die gesammelten Zellüberstände wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) hinsichtlich einer erfolgreichen Antigenproduktion kontrolliert und anschließend mittels ANTI-FLAG® M2-Affinitätsgel aufgereinigt (Hopfer et al. 2003). Aufgrund der in der Literatur beschriebenen früher auftretenden und schwereren Erkrankungsausprägung gegenüber murinem a3(IV)NC1 wurde humanes α3(IV)NC1 (h-α3(IV)NC1) verwendet (Hopfer et al. 2015).

Die erste Immunisierung erfolgte zur verbesserten Immuninduktion in komplettem Freund-Adjuvans (CFA), die drei folgenden Immunisierungen jeweils in inkomplettem Freund-Adjuvans (IFA). Acht Stunden vor jeder Immunisierung wurden die Tiere der Interventionsgruppe mit einem neutralisierenden monoklonalen anti-IL-6-Antikörper (anti-IL-6 mAb) behandelt (Figure 3A). Neben einer Kontrollgruppe, die mit irrelevantem IgG behandelt wurde, wurde eine weitere Gruppe mit vollständig naiven Mäusen mitgeführt. In einem zusätzlichen Versuchsaufbau erfolgte die Intervention analog zu einem therapeutischen Setting mit zunächst unbeeinflusster Immunisierung der Mäuse und anschließender Verabreichung von anti-IL-6 mAb beziehungsweise irrelevantem IgG ab Woche acht (Figure 5A). Die klinische Beurteilung des Gesundheitszustandes der Mäuse erfolgte in allen Versuchen täglich. Die Endanalysen wurden in den Versuchen mit paralleler Antikörperbehandlung zur Immunisierung nach 10, 28 und 70 Tagen, sowie individuell nach klinischem Verlauf durchgeführt. Im therapeutischen Setting erfolgte die Endanalyse nach 70 Tagen (Abb. 3).

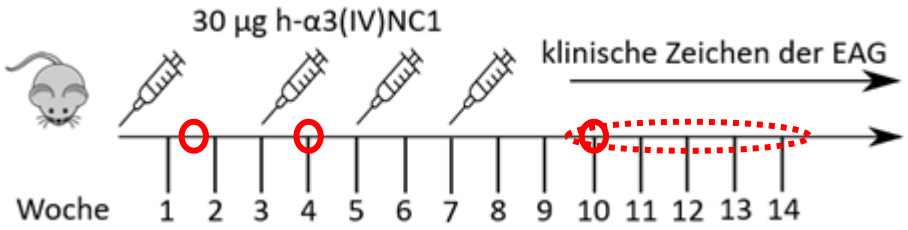


Abbildung 3: Immunisierungsschema und Analysezeitpunkte
Die Immunisierungen erfolgten zu den Zeitpunkten Woche 0, 3, 5 und 7, symbolisch dargestellt durch Spritzen. Die Endanalysen wurden nach 10, 28 und 70 Tagen, sowie nach klinischem Verlauf zwischen Tag 70 und 98 durchgeführt, dargestellt durch Kreise bzw. Ellipse.
Modifiziert nach Brede et al. 2021

In allen Experimenten wurden begleitend wiederholte Messungen der Proteinurie und der Antikörpertiter gegen m-α3(IV)NC1 mittels ELISA vorgenommen. Nach Tötung der Versuchstiere wurden weitergehende Analysen durchgeführt. Im Serum wurden die Werte von IL-6, Harnstoff und Cholesterin mittels ELISA, kinetischem Test und enzymatischem Farbtest bestimmt. Aus Milz und Niere wurden die Immunzellen isoliert und mittels Durchflusszytometrie (FACS) typisiert. Zusätzlich wurden die T-Zellen der Milz hinsichtlich ihrer spezifischen Reaktivität gegen h-α3(IV)NC1 mithilfe eines *in vitro* Stimulationsassays analysiert. Die Stimulation der T-Zellen erfolgte über acht Stunden in Anwesenheit von Brefeldin A mit h-α3(IV)NC1 oder Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin zur polyklonalen Stimulation als Positivkontrolle oder phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) als Negativkontrolle. Die jeweilige Produktion der Zytokine Tumornekrosefaktor α (TNF-α), Interferon γ (IFN-γ) und Interleukin 17A (IL-17A) der Zellen wurde im Anschluss ebenfalls mittels FACS-Analyse ermittelt.

Schließlich wurden die Nieren histologisch und immunhistochemisch hinsichtlich der typischen Endorganschäden, insbesondere der glomerulären halbmondförmigen Zellproliferationen, der tubulointerstitiellen Infiltration und der IgG-Ablagerungen entlang der Basalmembran bewertet.

Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung von GraphPad Prism durchgeführt. Für den Vergleich normalverteilter Mittelwerte aus zwei Gruppen wurde der t-Test, sowie für den Vergleich aus drei Gruppen die einfaktorielle ANOVA (analysis of variance) mit post-hoc Bonferroni-Test verwendet. Vergleiche von nicht normalverteilten Mittelwerten wurden aus zwei Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test, sowie aus drei Gruppen mittels Kruskal-Wallis-H-Test gefolgt von der post-hoc Analyse nach Dunn analysiert. Des Weiteren erfolgte die statistische Analyse der Krankheitsschwere unter Anwendung des Logrank-Tests. Eine statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert von $<0,05$ für gültig befunden.

2.3 Ergebnisse

Die Experimente unserer Forschungsarbeit zielten darauf ab die Bedeutung von IL-6 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Pathogenese zu ermitteln. Als geeignete Zeitpunkte wurden Analysen nach 10, 28 und 70 Tagen, sowie nach Ausbildung schwerer klinischer Symptomatik festgelegt (Abb. 3, Figures 2A, 3A, Suppl. Figure 2A). Die Experimente im therapeutischen Setting wurden ebenfalls nach 70 Tagen analysiert (Abb. 3, Figure 5A).

Die Immunisierung mit h-α3(IV)NC1 resultierte bei allen Mäusen in einer erfolgreichen Induktion der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis. Die krankheitstypischen Merkmale mit hohen spezifischen Antikörpertitern, Proteinurie, erhöhten Serumcholesterin- und Harnstoffwerten, Ausbildung von spezifischen T-Effektor-Zellen, IgG-Ablagerungen entlang der Basalmembran sowie glomerulären halbmondförmigen Zellproliferationen und Nekrosen in der Nierenhistologie konnten in allen immunisierten Mäusen nachgewiesen werden. Die Behandlung mit neutralisierenden anti-IL-6 mAb in der Interventionsgruppe hob die im Vergleich signifikant erhöhten IL-6 Serumlevel der mit irrelevantem Antikörper behandelten Kontrollgruppe vollständig auf (Suppl. Figure 2D).

Über alle Experimente konnten wir hinsichtlich des Ausmaßes der Proteinurie, der Serumcholesterin- und Harnstoffwerte, sowie der histologischen und immunhistochemischen Endorganschäden keine signifikanten Unterschiede zwischen der mit anti-IL-6 mAb behandelten Interventionsgruppe und der mit irrelevantem IgG behandelten Kontrollgruppe feststellen (Figures 3C, 3D, 3E, 4D, 5B, 5C, 5D, Suppl. Figure 3).

Die klinische Beobachtung der Krankheitsausprägung ergab jedoch eine im Mittel früher auftretende schwere Erkrankung in Mäusen unter Behandlung mit anti-IL-6 mAb gegenüber der mit irrelevantem Antikörper behandelten Kontrollgruppe (Figure 3B).

Die m-α3(IV)NC1-spezifischen Antikörper im Serum wiesen in den Experimenten eine Tendenz zu einer geringeren Konzentration unter Behandlung mit anti-IL-6 mAb auf, die Unterschiede erreichten aber keine statistische Signifikanz (Figures 4C, 6D, Suppl. Figure 2C).

Bei der Analyse der Immunzellpopulationen wiesen wir eine Verminderung der Zellen der myeloischen Reihe in der Milz unter Behandlung mit anti-IL-6 mAb nach. Dieser Effekt manifestierte sich am deutlichsten und mit statistischer Signifikanz zu einem frühen Analysezeitpunkt an Tag 10 (Figure 2B). Bei den späteren Analysezeitpunkten zeigte sich diese Verminderung weniger ausgeprägt und verfehlte die Signifikanz (Figure 4A). In der Niere konnte keine Reduktion von myeloiden Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

In der Analyse der T-Zellantwort gelang zum frühesten Analysezeitpunkt an Tag 10 nach Immunisierung der Nachweis einer signifikanten Verminderung der $CD154^{+}IFN\gamma^{+}$ und $CD154^{+}IL\text{-}17A^{+}$ h-α3(IV)NC1-spezifischen $CD4^{+}$ T-Zellen unter Behandlung mit anti-IL-6 mAb (Figure 2C und 2D). Zu den späteren Analysezeitpunkten blieb der Effekt unter Behandlung mit anti-IL-6 mAb nur für die h-α3(IV)NC1-

spezifischen $CD154^{+}IL\text{-}17A^{+}$ $CD4^{+}$ T-Zellen in signifikantem Ausmaß bestehen (Figure 4B, Suppl. Figure 2B).

Im Versuchssetting mit therapeutischer anti-IL-6 mAb-Behandlung ergaben sich über alle analysierten Parameter keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden immunisierten Gruppen. Als Tendenz fiel jedoch eine durchgehend schwerere Ausprägung in der mit anti-IL-6 mAb behandelten Gruppe, gegenüber der mit irrelevantem Antikörper behandelten Kontrollgruppe bezogen auf die Proteinurie, Harnstoff- und Cholesterinwerte, sowie hinsichtlich der Ausbildung glomerulärer halbmondförmiger Zellproliferationen auf (Figures 5 A-D).

2.4 Diskussion

Die beiden Hypothesen ‚Interleukin 6 fördert die Entstehung der anti-GBM-GN.' und ‚Interleukin 6 unterstützt die renale Entzündungsreaktion.' wurden in unserem experimentellen Tierversuch auf den Prüfstand gestellt. Beide Hypothesen bestätigten sich in der Gesamtbetrachtung der Ergebnisse dieses Forschungsansatzes nicht.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ergeben sich notwendigerweise aus der Methodik einige Limitationen. Tierexperimentelle Studien sind grundsätzlich nur begrenzt auf den Menschen übertragbar. Nichtsdestotrotz tragen sie zur Generierung wertvoller Erkenntnisse bezüglich der Wirkmechanismen und Zusammenhänge im lebenden Organismus bei. Aus ethischen Erwägungen können jeweils nur kleine Gruppengrößen eingesetzt werden, woraus sich automatisch statistische Unsicherheiten ergeben. Das hier verwendete EAG-Modell der anti-GBM-GN zeichnet sich im Gegensatz zum sehr viel stärker verbreiteten nephrotoxischen Nephritis-Modell durch eine Induktion von autoreaktiven Antikörpern und T-Zellen aus. Das EAG-Modell bildet die humane Erkrankung sowohl in der Genese als auch in den typischen Merkmalen der floriden Erkrankung besser ab, bleibt aber dennoch ein artifiziell ausgelöstes Modell.

Die EAG ist eine etablierte Methode, die auch in unseren Versuchen ohne Ausnahme zum Ausbruch der Glomerulonephritis führte. Die Modulierung von IL-6 durch monoklonale Antikörper ist zwar ebenfalls ein häufig angewendetes Verfahren, unterscheidet sich in der konkreten Anwendung jedoch abhängig vom Kontext erheblich. Wir entschieden uns im Vergleich zu publizierten Studien für eine mittlere Antikörperdosis, um das verfügbare IL-6 zu minimieren. Aufgrund der benötigten Probenmenge konnten die IL-6-Serumkonzentrationen nur aus der finalen Blutentnahme und nicht versuchsbegleitend bestimmt werden. Insgesamt bestätigten die Ergebnisse trotz des zeitlichen Abstandes deutlich verminderte IL-6-Serumkonzentrationen in der Interventionsgruppe, hinweisend auf eine erfolgreiche Neutralisierung der IL-6-Wirkung. Einzelne Ausreißer können verschiedener Genese sein: Eine individuell unzureichende Dosierung, die Ausbildung von neutralisierenden Antikörpern gegen anti-IL-6 mAb wäre insbesondere in den längeren Versuchen denkbar, aber auch eine gesteigerte individuelle Stress-getriggerte IL-6 Expression am Versuchstag. Da keine Möglichkeit zur Diskrimination dieser Ursachen bestand, wurden keine Tiere aufgrund ihrer IL-6-Serumkonzentration von der Gesamtauswertung ausgeschlossen. Je nach ursächlicher Genese wäre eine Verzerrung der Daten daher möglich.

Als wichtige ursächliche Pathophysiologie für die Entstehung der EAG sind in der Literatur die Bildung spezifischer Autoantikörper und autoreaktiver TH1- und TH17-Zellen beschrieben (Wilson und Dixon 1973, Kitching und Holdsworth 2011, Hopfer et al. 2012, Hünemörder et al. 2015). Der fördernde Einfluss von IL-6 auf einerseits die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und andererseits die Produktion von Antikörpern ist ebenfalls beschrieben, sowohl mechanistisch in *in-vitro*-Versuchen

(Kishimoto 1985, Diehl et al. 2012), als auch funktionell in verschiedenen *in-vivo*-Modellen für autoimmune Lupus-assoziierte Glomerulonephritiden. Hier konnte eine verminderte Bildung von Autoantikörpern unter IL-6-Blockade gezeigt werden (Richards et al. 1998, Liang et al. 2006, Luig 2013). Überraschenderweise konnte in unseren Experimenten kein signifikanter Einfluss auf die Bildung von Autoantikörpern unter Blockade des IL-6 festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu den bisherigen Erkenntnissen in der Literatur. Jedoch basieren die publizierten Ergebnisse auf Modellen für die Lupus-assoziierte Glomerulonephritis, die eine völlig andere Entität und Pathogenese darstellen und daher keine generelle Übertragung von Ergebnissen erlauben.

Mögliche Ursachen für die fehlenden Effekte auf die Bildung α3(IV)NC1-spezifischer Antikörper unter IL-6 Blockade in unseren Versuchen könnten einerseits eine ausreichende verbliebene Restwirksamkeit des IL-6 auf die B-Zellantwort, aber auch eine funktionelle Redundanz durch andere Zytokine sein. Die vorliegenden Untersuchungen legen nahe, dass die Bildung von autoreaktiven Antikörpern in der EAG noch nicht ausreichend verstanden ist. Ob IL-6 für die Bildung autoreaktiver Antikörper in der EAG notwendig ist, könnte mithilfe von DBA1/J-IL-6KO-Mäusen festgestellt werden, da in genetisch homozygoter Defizienz keine Restaktivität bestehen bleibt.

Ebenfalls bekannt sind vielfältige Wirkungen von IL-6 auf die Zellen der myeloischen Reihe (Kaplanski et al. 2003, Clahsen und Schaper 2008, Lücke et al. 2018). Unsere Versuche bestätigen diese Effekte. Die Akkumulation von inflammatorischen Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der Milz ist hier jedoch am ehesten als Reaktion auf die Immunisierung mit komplettem Freund-Adjuvans zu werten, das eine starke Entzündung hervorruft. Insofern unterstützt die Aufhebung dieser Akkumulation durch die Behandlung mit anti-IL-6 mAb zwar die generelle funktionelle Abhängigkeit dieser Zellen von IL-6, gibt aber keinen Anhalt für eine spezifische Funktion von IL-6 in der Pathogenese der EAG.

Auch die Differenzierung von naiven T-Zellen zu TH17-Zellen und ihre Funktion in renaler Inflammation ist in der Literatur bereits vielfach beschrieben (Turner et al. 2010, Ooi et al. 2010, Salama et al. 2010, Hopfer et al. 2012, Hünemörder et al. 2015). Die Ergebnisse unserer Studie mit einer verminderten Frequenz der α3(IV)NC1-spezifischen TH17-Zellen stehen damit im Einklang.

Durch die bekannte und bereits erwähnte funktionelle Restaktivität von Zytokinen unter Antikörperblockade war eine vollständige Suppression der TH17-Zellentwicklung nicht zu erwarten. Allerdings führte die verminderte Zahl der α3(IV)NC1-spezifischen TH17-Zellen zu keiner Abmilderung des Krankheitsverlaufes, auch nicht hinsichtlich der histologisch und immunhistochemisch nachweisbaren Endorganschäden. Da die IL-17A Ausschüttung unter anderem durch ein autokrines negatives Feedback reguliert wird (Chong et al. 2020), wäre es möglich, dass in unseren Versuchen die geringere Anzahl autoreaktiver TH17-Zellen durch eine funktionell höhere Aktivität ausgeglichen wird.

In der Pathogenese der EAG kommt auch den Tregs eine bedeutende Rolle zu (Salama et al. 2003, Ooi et al. 2011, Klinge et al. 2019). Tregs wurden zunächst als $CD4^+CD25^+Foxp3^+$-Zellen charakterisiert (Hori et al. 2003), deren Differenzierung aus naiven T-Zellen durch IL-6 gehemmt werden kann (Kimura und Kishimoto 2010). Diesen Erkenntnissen folgend wäre unter IL-6-Blockade eine erhöhte Zahl an Tregs zu erwarten gewesen, woraus eine zusätzliche Abmilderung EAG folgen würde (Wolf et al. 2005). Die Daten unserer Studie zeigen jedoch keine signifikante Veränderung der Frequenz der $Foxp3^+$-Zellen und deuten mit dem unveränderten bis leicht aggravierten Verlauf der EAG eher auf eine unbeeinträchtigte oder sogar eingeschränkte Funktion der Tregs hin.

Neuere Studien konnten eine größere Heterogenität unter Tregs hinsichtlich ihrer Funktionsweise und Expressionsmarker zeigen (Vieira et al. 2004, Herrnstadt und Steinmetz 2021). Es existieren mittlerweile Hinweise darauf, dass die Responsivität auf IL-6 innerhalb der unterschiedlichen Treg-Subgruppen stark variiert. Insbesondere drei Subgruppen könnten sogar in ihrer Funktion durch IL-6 gefördert werden. Die Charakteristika der Treg-Subgruppen sind aktuell allerdings noch Gegenstand intensiver Forschung.

Als erste Subgruppe der Tregs seien hier Tr1-Zellen genannt. Diese Zellen stellen einen Sonderfall innerhalb der Tregs dar, weil sie kein Foxp3 exprimieren. Für Tr1-Zellen wurde gezeigt, dass sie eine starke immunregulatorische Kapazität besitzen und unter Einfluss von IL-6 proliferieren (Jin et al. 2013). Tr1-Zellen wurden in unseren Versuchen nicht erfasst und können folglich nicht bewertet werden, da in unseren Analysen Foxp3-Positivität als Marker für Tregs verwendet wird.

Für eine weitere Subgruppe, die $ROR\gamma t^+Foxp3^+$Tregs, konnte eine Induzierbarkeit durch IL-6 gezeigt werden. Funktionell besitzen diese Zellen sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Eigenschaften. Im Modell der nephrotoxischen Nephritis konnte eine massive Expansion dieser Zellpopulation nachgewiesen werden (Kluger et al. 2016, Hagenstein et al. 2019). In unseren Versuchen ergaben sich keine Hinweise auf eine relevante Expansion dieser Zellpopulation (Daten nicht gezeigt), sodass die $ROR\gamma t^+Foxp3^+$Tregs wahrscheinlich in unserem Modell keine entscheidende Rolle spielen.

Zuletzt sei auf die Subgruppe der Treg17-Zellen verwiesen. Treg17-Zellen sind darauf spezialisiert die Auswirkungen pathologischer TH17-Zellen zu kontrollieren und zu begrenzen. Treg17-Zellen werden durch den Transkriptionsfaktor Stat3 charakterisiert (Chaudhry et al. 2009, Kluger et al. 2014), der ebenfalls durch die Signaltransduktion von IL-6 aktiviert werden kann. Der Einfluss von IL-6 auf Treg17-Zellen ist bislang im Kontext der Glomerulonephritiden nicht explizit untersucht. Hier wäre jedoch ein fördernder Effekt auf die Treg17-Zellen und somit ein immunregulativer Effekt von IL-6 denkbar.

In unseren Versuchen mit später Intervention, äquivalent zu einem therapeutischen Ansatz, könnten die fehlenden Auswirkungen der IL-6-Blockade darauf zurückgeführt werden, dass die relevanten Pathogenitätsfaktoren mit autoreaktiven Antikörpern und Effektor-T-Zellen bereits in den Wochen

zuvor unbeeinträchtigt präformiert wurden und ihre spezifische Antigen-Erkennung und -Reaktion unabhängig von IL-6 funktioniert. Weiterhin könnten die bereits vorhandenen Schädigungen so tiefgreifend sein, dass die Erkrankung in unverminderter Form fortschreitet. Im Gegenteil könnte hier die leichte Tendenz zu einem schwereren Verlauf unter IL-6-Blockade dahingehend interpretiert werden, dass die antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-6 zur Begrenzung der Schädigung durch die verschiedenen Effektor-Immunzellen fehlen. Dies könnte sowohl in fehlender Polarisierung der Makrophagen zu Typ-2-Makrophagen als auch in fehlenden Proliferations- und Aktivierungssignalen für die IL-6 responsiven Treg-Populationen begründet liegen.

IL-6 entfaltet seine Wirkung hauptsächlich über zwei Signalwege, die als klassischer Signalweg und als Trans-Signalweg bezeichnet werden (Abb. 1). Während der klassische Signalweg nur auf wenige Zellen wirken kann, erreicht der Trans-Signalweg nahezu alle Zellen (Peters et al. 1996, Schaper und Rose-John 2015). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass über den klassischen Signalweg eher immunmodulatorische und regenerative Effekte, über den Trans-Signalweg hingegen proinflammatorische und häufig pathologische Effekte vermittelt werden. Die selektive Blockade des Trans-Signalweges hat sich in zahlreichen Studien in Glomerulonephritismodellen als krankheitsabmildernd erwiesen (Tsantikos et al. 2013, Luig et al. 2015, Braun et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit wurden durch die Verabreichung von anti-IL-6 mAb sämtliche Signalwege gehemmt. Eine differenzielle Analyse der beiden Signalwege im Kontext der EAG könnte zusätzliche Erkenntnisse über den Einfluss von IL-6 auf die Ausbildung der relevanten Pathogenitätsfaktoren und darauf basierenden möglichen Therapieoptionen liefern.

Fazit und Ausblick

Obwohl die aufgestellten Hypothesen durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnten, sind sie dennoch auch nicht als widerlegt zu bewerten. Die geringen Auswirkungen der Neutralisierung von IL-6 auf die relevanten Pathogenitätsfaktoren, die typischen Endorganschäden und den Erkrankungsverlauf insgesamt, trotz der starken Expression in der unbeeinflussten Pathogenese, weisen am ehesten auf gegensätzliche Wirkungsweisen des IL-6 hin, die sich im Modell der EAG gegenseitig weitestgehend aufheben. Die Rolle von IL-6 im Kontext des Verlusts der Selbsttoleranz gegenüber dem Goodpasture-Antigen α3(IV)NC1 sollte daher als vielschichtig bewertet werden und bedarf weiterer differenzierter Analysen. Hilfreich könnten hier Experimente in IL-6KO-Mäusen, ergänzt durch definierte Gaben von IL-6 zu unterschiedlichen Zeitpunkten, Versuche mit selektiver Hemmung des IL-6-Trans-Signalweges, sowie Transfer-Experimente mit den relevanten T-Effektor-Zellen, einschließlich der verschiedenen Treg-Populationen sein.

Aus klinischer Perspektive implizieren die vorliegenden Erkenntnisse, dass der Einsatz von pan-IL-6-modifizierenden Therapeutika stets einer kritischen Prüfung unterzogen werden muss und im Kontext des Goodpasture-Syndroms möglicherweise sogar als kontraindiziert bewertet werden sollte.

3. Zusammenfassung

3.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die komplexe Rolle von Interleukin-6 (IL-6) in der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG), einem Mausmodell für die anti-glomeruläre Basalmembran-Glomerulonephritis (anti-GBM GN). Die anti-GBM GN ist eine rasch progrediente Autoimmunerkrankung der Nieren, die unbehandelt zu einer terminalen Niereninsuffizienz führt. Pathogenetisch sind sowohl Autoantikörper als auch autoreaktive TH1- und TH17-Zellen, die spezifisch gegen das Goodpasture-Antigen (α3(IV)NC1) gerichtet sind, relevant. Die EAG wird durch mehrfache Immunisierungen mit α3(IV)NC1 ausgelöst und bildet die humane Erkrankung in wesentlichen Aspekten ab. IL-6 ist ein bedeutendes Zytokin des Immunsystems, das pro- und antiinflammatorische Eigenschaften aufweist.

In den hier dargestellten Versuchen wurde IL-6 mittels eines neutralisierenden Antikörpers entweder präemptiv, parallel zu den Immunisierungen oder therapeutisch, nach etablierter Autoimmunität, blockiert.

Im präemptiven Ansatz wurde die Bildung α3(IV)NC1-spezifischer TH1- und TH17-Zellen beeinträchtigt. Allerdings konnte lediglich die Reduktion der TH17-Zellen dauerhaft nachgewiesen werden. Trotz dieser Deprivation der Autoimmunität verhinderte die Behandlung die Schädigung der Glomeruli und den Verlust der Nierenfunktion nicht. Im Gegenteil zeigte sich klinisch sogar eine Tendenz zu einer beschleunigten Krankheitsentwicklung. Im therapeutischen Ansatz kam es zu keiner Veränderung des EAG-Verlaufs. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei den Nierenfunktionsparametern, der Nierenschädigung, der humoralen oder der zellulären Immunantwort festgestellt.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Rolle von IL-6 in der anti-GBM GN komplex ist. Obwohl IL-6 für die Entwicklung von TH17-Zellen von entscheidender Bedeutung ist, scheinen im EAG-Modell die pro- und anti-inflammatorischen Funktionen einander insgesamt zu kompensieren.

3.2 Abstract

The present study investigates the complex role of interleukin-6 (IL-6) in experimental autoimmune glomerulonephritis (EAG), a mouse model for anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis (anti-GBM GN). Anti-GBM GN is a rapidly progressive autoimmune disease of the kidneys that leads to terminal renal failure if left untreated. It is evident that both autoantibodies and autoreactive TH1 and TH17 cells, which are specifically directed against the Goodpasture antigen (α3(IV)NC1), are pathogenetically relevant. The EAG model is initiated by multiple immunizations with α3(IV)NC1, thereby providing a representation of the human disease in its fundamental aspects. IL-6 is a pivotal cytokine within the immune system, exhibiting both pro- and anti-inflammatory properties. In the experiments presented here, IL-6 was blocked using a neutralizing antibody either pre-emptively, in parallel with immunization, or therapeutically, after established autoimmunity.

In the pre-emptive approach, the formation of α3(IV)NC1-specific TH1 and TH17 cells was impaired. However, it was only possible to detect a permanent reduction in the number of TH17 cells. Despite this deprivation of autoimmunity, the treatment did not prevent damage of glomeruli and loss of renal function. In contrast, there was even a clinical tendency towards accelerated disease development under anti-IL-6 antibody treatment. In the therapeutic approach, no alteration in the course of EAG was observed in animals with anti-IL-6 antibody treatment. No significant differences were identified in parameters of renal function, in renal damage and in humoral or cellular immune response.

The results suggest that the role of IL-6 in anti-GBM GN is complex. Although IL-6 is crucial for the development of TH17 cells, in the EAG model the pro- and anti-inflammatory functions appear to compensate each other overall.

4. Literaturverzeichnis

Braun GS, Nagayama Y, Maruta Y, Heymann F, van Roeyen CR, Klinkhammer BM, Boor P, Villa L, Salant DJ, Raffetseder U, Rose-John S, Ostendorf T, Floege J. IL-6 Trans-Signaling Drives Murine Crescentic GN. J Am Soc Nephrol. 2016 Jan;27(1):132-42.

Brede KM, Schmid J, Steinmetz OM, Panzer U, Klinge S, Mittrücker HW. Neutralization of IL-6 inhibits formation of autoreactive TH17 cells but does not prevent loss of renal function in experimental autoimmune glomerulonephritis. Immunol Lett. 2021 Aug;236:51-60.

Cash H, Relle M, Menke J, Brochhausen C, Jones SA, Topley N, Galle PR, Schwarting A. Interleukin 6 (IL-6) deficiency delays lupus nephritis in MRL-Faslpr mice: the IL-6 pathway as a new therapeutic target in treatment of autoimmune kidney disease in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 2010 Jan;37(1):60-70.

Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, Rudensky AY. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. Science. 2009 Nov 13;326(5955):986-91.

Chong WP, Mattapallil MJ, Raychaudhuri K, Bing SJ, Wu S, Zhong Y, Wang W, Chen Z, Silver PB, Jittayasothorn Y, Chan CC, Chen J, Horai R, Caspi RR. The Cytokine IL-17A Limits Th17 Pathogenicity via a Negative Feedback Loop Driven by Autocrine Induction of IL-24. Immunity. 2020 Aug 18;53(2):384-397.e5.

Clahsen T, Schaper F. Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. J Leukoc Biol. 2008 Dec;84(6):1521-9.

Dean EG, Wilson GR, Li M, Edgtton KL, O'Sullivan KM, Hudson BG, Holdsworth SR, Kitching AR. Experimental autoimmune Goodpasture's disease: a pathogenetic role for both effector cells and antibody in injury. Kidney Int. 2005 Feb;67(2):566-75.

Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A, Zapton T, Ihle JN, Fikrig E, Rincón M. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. Immunity. 2000 Dec;13(6):805-15.

Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, Blom B, Spits H. IL-6 triggers IL-21 production by human CD4+ T cells to drive STAT3-dependent plasma cell differentiation in B cells. Immunol Cell Biol. 2012 Sep;90(8):802-11.

Fernando MR, Reyes JL, Iannuzzi J, Leung G, McKay DM. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. PLoS One. 2014 Apr 15;9(4):e94188.

Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. Nat Rev Drug Discov. 2018 Jun;17(6):395-412.

Garbers C, Rose-John S. Dissecting Interleukin-6 Classic- and Trans-Signaling in Inflammation and Cancer. Methods Mol Biol. 2018;1725:127-140.

Hagenstein J, Melderis S, Nosko A, Warkotsch MT, Richter JV, Ramcke T, Herrnstadt GR, Scheller J, Yan I, Mittrücker HW, Kluger MA, Steinmetz OM. A Novel Role for IL-6 Receptor Classic Signaling: Induction of RORγt^{+}Foxp3^{+} Tregs with Enhanced Suppressive Capacity. J Am Soc Nephrol. 2019 Aug;30(8):1439-1453.

Harbour SN, DiToro DF, Witte SJ, Zindl CL, Gao M, Schoeb TR, Jones GW, Jones SA, Hatton RD, Weaver CT. TH17 cells require ongoing classic IL-6 receptor signaling to retain transcriptional and functional identity. Sci Immunol. 2020 Jul 17;5(49):eaaw2262.

Herrnstadt GR, Steinmetz OM. The role of Treg subtypes in glomerulonephritis. Cell Tissue Res. 2021 Aug;385(2):293-304.

Hopfer H, Maron R, Butzmann U, Helmchen U, Weiner HL, Kalluri R. The importance of cell-mediated immunity in the course and severity of autoimmune anti-glomerular basement membrane disease in mice. FASEB J. 2003 May;17(8):860-8.

Hopfer H, Holzer J, Hünemörder S, Paust HJ, Sachs M, Meyer-Schwesinger C, Turner JE, Panzer U, Mittrücker HW. Characterization of the renal CD4+ T-cell response in experimental autoimmune glomerulonephritis. Kidney Int. 2012 Jul;82(1):60-71.

Hopfer H, Hünemörder S, Treder J, Turner JE, Paust HJ, Meyer-Schwesinger C, Hopfer U, Sachs M, Peters A, Bucher-Kocaoglu B, Ahrens S, Panzer U, Mittrücker HW. Glomerulopathy induced by immunization with a peptide derived from the goodpasture antigen α3IV-NC1. J Immunol. 2015 Apr 15;194(8):3646-55.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.

Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. N Engl J Med. 2003 Jun 19;348(25):2543-56.

Hünemörder S, Treder J, Ahrens S, Schumacher V, Paust HJ, Menter T, Matthys P, Kamradt T, Meyer-Schwesinger C, Panzer U, Hopfer H, Mittrücker HW. TH1 and TH17 cells promote crescent formation in experimental autoimmune glomerulonephritis. J Pathol. 2015 Sep;237(1):62-71.

Jin X, Zimmers TA, Perez EA, Pierce RH, Zhang Z, Koniaris LG. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. Hepatology. 2006 Mar;43(3):474-84.

Jin JO, Han X, Yu Q. Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation. J Autoimmun. 2013 Feb;40:28-44.

Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. Trends Immunol. 2003 Jan;24(1):25-9.

Karkar AM, Tam FW, Proudfoot AE, Meager A, Rees AJ. Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by interleukin-6. Kidney Int. 1993 Nov;44(5):967-73.

Karkar AM, Smith J, Tam FW, Pusey CD, Rees AJ. Abrogation of glomerular injury in nephrotoxic nephritis by continuous infusion of interleukin-6. Kidney Int. 1997 Nov;52(5):1313-20.

Kastrati K, Aletaha D, Burmester GR, Chwala E, Dejaco C, Dougados M, McInnes IB, Ravelli A, Sattar N, Stamm TA, Takeuchi T, Trauner M, van der Heijde D, Voshaar MJH, Winthrop K, Smolen JS, Kerschbaumer A. A systematic literature review informing the consensus statement on efficacy and safety of pharmacological treatment with interleukin-6 pathway inhibition with biological DMARDs in immune-mediated inflammatory diseases. RMD Open. 2022 Sep;8(2):e002359.

Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. Eur J Immunol. 2010 Jul;40(7):1830-5.

Kishimoto T. Factors affecting B-cell growth and differentiation. Annu Rev Immunol. 1985;3:133-57.

Kitching AR, Holdsworth SR. The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury. J Am Soc Nephrol. 2011 Feb;22(2):235-8.

Klinge S, Yan K, Reimers D, Brede KM, Schmid J, Paust HJ, Krebs CF, Panzer U, Hopfer H, Mittrücker HW. Role of regulatory T cells in experimental autoimmune glomerulonephritis. Am J Physiol Renal Physiol. 2019 Mar 1;316(3):F572-F581.

Kluger MA, Luig M, Wegscheid C, Goerke B, Paust HJ, Brix SR, Yan I, Mittrücker HW, Hagl B, Renner ED, Tiegs G, Wiech T, Stahl RA, Panzer U, Steinmetz OM. Stat3 programs Th17-specific regulatory T cells to control GN. J Am Soc Nephrol. 2014 Jun;25(6):1291-302.

Kluger MA, Meyer MC, Nosko A, Goerke B, Luig M, Wegscheid C, Tiegs G, Stahl RA, Panzer U, Steinmetz OM. RORγt(+)Foxp3(+) Cells are an Independent Bifunctional Regulatory T Cell Lineage and Mediate Crescentic GN. J Am Soc Nephrol. 2016 Feb;27(2):454-65.

Krebs CF, Schmidt T, Riedel JH, Panzer U. T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease. Nat Rev Nephrol. 2017 Oct;13(10):647-659.

Liang B, Gardner DB, Griswold DE, Bugelski PJ, Song XY. Anti-interleukin-6 monoclonal antibody inhibits autoimmune responses in a murine model of systemic lupus erythematosus. Immunology. 2006 Nov;119(3):296-305.

Lücke K, Yan I, Krohn S, Volmari A, Klinge S, Schmid J, Schumacher V, Steinmetz OM, Rose-John S, Mittrücker HW. Control of Listeria monocytogenes infection requires classical IL-6 signaling in myeloid cells. PLoS One. 2018 Aug 31;13(8):e0203395.

Luig M (2013). Differential Roles of Interleukin 6 on Immune Responses in Experimental Glomerulonephritis. Medizinische Dissertation, Universität Hamburg.

Luig M, Kluger MA, Goerke B, Meyer M, Nosko A, Yan I, Scheller J, Mittrücker HW, Rose-John S, Stahl RA, Panzer U, Steinmetz OM. Inflammation-Induced IL-6 Functions as a Natural Brake on Macrophages and Limits GN. J Am Soc Nephrol. 2015 Jul;26(7):1597-607.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature. 2006 May 11;441(7090):231-4.

McAdoo SP, Pusey CD. Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2017 Jul 7;12(7):1162-1172.

Minges Wols HA, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. J Immunol. 2002 Oct 15;169(8):4213-21.

Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, Kishimoto T. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. J Exp Med. 1988 Feb 1;167(2):332-44.

Ooi JD, Kitching AR, Holdsworth SR. Review: T helper 17 cells: their role in glomerulonephritis. Nephrology (Carlton). 2010 Aug;15(5):513-21.

Ooi JD, Snelgrove SL, Engel DR, Hochheiser K, Ludwig-Portugall I, Nozaki Y, O'Sullivan KM, Hickey MJ, Holdsworth SR, Kurts C, Kitching AR. Endogenous foxp3(+) T-regulatory cells suppress anti-glomerular basement membrane nephritis. Kidney Int. 2011 May;79(9):977-86.

Pedchenko V, Bondar O, Fogo AB, Vanacore R, Voziyan P, Kitching AR, Wieslander J, Kashtan C, Borza DB, Neilson EG, Wilson CB, Hudson BG. Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis. N Engl J Med. 2010 Jul 22;363(4):343-54.

Peters M, Meyer zum Büschenfelde KH, Rose-John S. The function of the soluble IL-6 receptor in vivo. Immunol Lett. 1996 Dec;54(2-3):177-84.

Phelps RG, Rees AJ. The HLA complex in Goodpasture's disease: a model for analyzing susceptibility to autoimmunity. Kidney Int. 1999 Nov;56(5):1638-53.

Richards HB, Satoh M, Shaw M, Libert C, Poli V, Reeves WH. Interleukin 6 dependence of anti-DNA antibody production: evidence for two pathways of autoantibody formation in pristane-induced lupus. J Exp Med. 1998 Sep 7;188(5):985-90.

Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. Immunity. 1997 Mar;6(3):315-25.

Salama AD, Chaudhry AN, Ryan JJ, Eren E, Levy JB, Pusey CD, Lightstone L, Lechler RI. In Goodpasture's disease, CD4(+) T cells escape thymic deletion and are reactive with the autoantigen alpha3(IV)NC1. J Am Soc Nephrol. 2001 Sep;12(9):1908-1915.

Salama AD, Chaudhry AN, Holthaus KA, Mosley K, Kalluri R, Sayegh MH, Lechler RI, Pusey CD, Lightstone L. Regulation by CD25+ lymphocytes of autoantigen-specific T-cell responses in Goodpasture's (anti-GBM) disease. Kidney Int. 2003 Nov;64(5):1685-94.

Schaper F, Rose-John S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. Cytokine Growth Factor Rev. 2015 Oct;26(5):475-87.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochim Biophys Acta. 2011 May;1813(5):878-88.

Tanaka T, Katada Y, Higa S, Fujiwara H, Wang W, Saeki Y, Ohshima S, Okuda Y, Suemura M, Kishimoto T. Enhancement of T helper2 response in the absence of interleukin (IL-)6; an inhibition of IL-4-mediated T helper2 cell differentiation by IL-6. Cytokine. 2001 Feb 21;13(4):193-201.

Tsantikos E, Oracki SA, Quilici C, Anderson GP, Tarlinton DM, Hibbs ML. Autoimmune disease in Lyn-deficient mice is dependent on an inflammatory environment established by IL-6. J Immunol. 2010 Feb 1;184(3):1348-60.

Tsantikos E, Maxwell MJ, Putoczki T, Ernst M, Rose-John S, Tarlinton DM, Hibbs ML. Interleukin-6 trans-signaling exacerbates inflammation and renal pathology in lupus-prone mice. Arthritis Rheum. 2013 Oct;65(10):2691-702.

Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Panzer U. The Th17 immune response in renal inflammation. Kidney Int. 2010 Jun;77(12):1070-5.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity. 2006 Feb;24(2):179-89.

Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O'Garra A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol. 2004 May 15;172(10):5986-93.

Wilson CB, Dixon FJ. Anti-glomerular basement membrane antibody-induced glomerulonephritis. Kidney Int. 1973 Feb;3(2):74-89.

Wolf D, Hochegger K, Wolf AM, Rumpold HF, Gastl G, Tilg H, Mayer G, Gunsilius E, Rosenkranz AR. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. J Am Soc Nephrol. 2005 May;16(5):1360-70.

Yang R, Masters AR, Fortner KA, Champagne DP, Yanguas-Casás N, Silberger DJ, Weaver CT, Haynes L, Rincon M. IL-6 promotes the differentiation of a subset of naive CD8+ T cells into IL-21-producing B helper CD8+ T cells. J Exp Med. 2016 Oct 17;213(11):2281-2291.

Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. Nat Immunol. 2007 Sep;8(9):967-74.

5. Abkürzungsverzeichnis

<	kleiner als
α3(IV)NC1	nicht-Kollagendomäne 1 der α3-Kette von Kollagen IV
ANOVA	analysis of variance
CD	Cluster of Differentiation
CFA	komplettes Freund-Adjuvans
EAG	experimentelle autoimmune Glomerulonephritis
ELISA	*enzyme linked immunosorbent assay*
FACS	*fluorescence-activated cell sorting*
FOXP3	*forkhead box protein 3*
GBM	glomeruläre Basalmembran
GN	Glomerulonephritis
gp130	*glycoprotein 130*
h	human
HEK	*human embryonic kidney*
IFA	inkomplettes Freund-Adjuvans
IFN-γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin 6 Rezeptor
IL-6KO	*Interleukin 6 knockout*
m	murin
M2-Makrophagen	Makrophagen des Subtyps 2
mAb	*monoclonal antibody*
µg	Mikrogramm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RORγt	*RAR-related orphan receptor γt*
RPGN	rapid progressive Glomerulonephritis
sIL-6R	*soluble Interleukin 6 receptor*
SDS-PAGE	*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TGF-β	*transforming growth factor β*
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
Tr1	*type 1 regulatory T-cell*
Treg	regulatorische T-Zelle

6. Erklärung des Eigenanteils

Das Konzept des Forschungsprojekts wurde von Prof. H.-W. Mittrücker und Dr. S. Klinge für die Bewerbung zur Projektförderung durch den Sonderforschungsbereich SFB 1192 der Deutschen Forschungsgemeinschaft entwickelt. Nach Einarbeitung durch Dr. S. Klinge und J. Schmid erfolgte die detaillierte Planung und Vorbereitung der einzelnen Versuche durch mich. Selbstständig führte ich die Antigenproduktion und Aufreinigung, sowie die tierexperimentellen Arbeiten (Immunisierung, Antikörperbehandlung, Stoffwechselkäfige) durch. Lediglich die Blutentnahmen am lebenden Tier führte die zuständige Fachtierpflegerin S. Noster durch.

Die laborchemischen Daten erhob ich teilweise selbstständig mittels ELISA (Albuminurie, Immunglobulin-Titer, Interleukin-6 im Serum) und wurden teilweise (Harnstoff im Serum, Cholesterin im Serum) durch die klinische Chemie des Zentrallabors des UKEs bestimmt.

In der Durchführung der einzelnen Experimente wurde ich bei der zeitkritischen Gewebeverarbeitung mit Organentnahmen und Leukozytenisolation aus den Geweben (Milz und Niere) durch meine Arbeitsgruppe namentlich J. Schmid, Dr. K. Yan, Dr. D. Reimers und Dr. N. Lory unterstützt. Die weitere Verarbeitung - Durchführung von in vitro Stimulationsassays, extra- und intrazelluläre Molekülfärbungen, Messung und Auswertung der isolierten und angefärbten Leukozyten mittels Durchflusszytometrie (FACS) - führte ich selbstständig durch. Die Bearbeitung und verblindete Auswertung der histologischen Proben wurde von A. Peters und Prof. U. Panzer respektive gewährleistet.

Das Zusammentragen der einzelnen Ergebnisse, die Analyse der Daten, die statistische Auswertung und Visualisierung der Ergebnisse führte ich selbstständig durch. Ergebnisdiskussionen mit wertvollen Anregungen führte ich wiederholt mit Prof. H.-W. Mittrücker und Dr. S. Klinge, sowie auch Prof. O. Steinmetz und Prof. U. Panzer.

Die Verschriftlichung des Manuskriptes und die Anpassung der Abbildungen erfolgte durch Prof. H.-W. Mittrücker, Dr. S. Klinge und mich.

7. Danksagung

Danken möchte ich an erster Stelle meinem Doktorvater Herrn Prof. Mittrücker, der mir zuerst dieses interessante Projekt anvertraut und zugetraut hat und im Weiteren durch alle Schwierigkeiten und Rückschläge als ständig verfügbarer Ansprechpartner mit hilfreichen Diskussionen, großen Ratschlägen und kleinen Tipps, immer neuer Motivation und auch tatkräftiger Hilfe zur Seite stand.

Weiter gilt mein besonderer Dank der gesamten Arbeitsgruppe Mittrücker. Besonders herausheben möchte ich Dr. Stefanie Klinge, die nicht nur meine Zeit im Labor hervorragend vorbereitet und mich eingearbeitet hat, sondern auch die Nachbereitung und Fertigstellung der Publikation entscheidend mitgestaltet und gefördert hat. Darüber hinaus möchte ich auch Joanna Schmid, Dr. Daniel Reimers, Dr. Karsten Yan, Dr. Niels Lory, Dr. Max Webendörfer und Dr. Constantin Schmidt danken, die meine Einarbeitung unterstützt, in meiner Abwesenheit meine Zellen gepflegt, mir an den langen Versuchstagen zugearbeitet und mich alltäglich mit Tatkraft, Humor, Anteilnahme oder auch Musik begleitet haben. Und ich entschuldige mich hiermit nochmals sehr dafür, dass ich wirklich keinen Kaffee trinke.

Ich danke Sabrina Noster für ihre exzellente Arbeit, stets verfügbare Unterstützung beim Umgang mit meinen wilden Mäusen und viele wertvolle Gespräche.

Besonderer Dank gilt auch der Arbeitsgruppe Panzer, insbesondere Anett Peters und Herrn Prof. Panzer für die Aufarbeitung und Auswertung der histopathologischen Gewebeproben, aber auch für wichtige Anregungen, interessante Gespräche und viele kleine Hilfestellungen im Forscheralltag.

Danken möchte ich auch Frau Prof. Harendza für die Organisation und Durchführung der Seminare und Workshops im Rahmen des Graduiertenkollegs, die ich als sehr lehrreich und intensiv erlebt habe und von denen ich auch langfristig noch sehr profitiere. Dank gebührt in diesem Zusammenhang auch dem Sonderforschungsbereich 1192 der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die dieses Graduiertenkolleg ermöglicht hat.

Ich danke auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, die eine großartige Arbeitsatmosphäre und immer freundliches, unterstützendes Miteinander leben.

Der größte Dank gebührt meiner Familie, allen voran meinen Eltern, meinen Schwestern und Sebastian und ganz besonders Fabian.

8. 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.

16.09.2025

Datum Unterschrift