

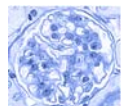
Rolle von NF- κ B in der experimentellen Glomerulonephritis

**Einfluss einer NF- κ B-Hemmung auf infiltrierende Immunzellen
in der nephrotoxischen Nephritis**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)
im Department Chemie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Eveline Christina Piotrowski geb. Piella
Hamburg 2012

Erstellt in Teilprojekt 2
der Klinischen Forschergruppe
KFO 228



KFO 228
Immunopathogenesis
of Glomerulonephritis

1. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Duchstein
2. Gutachter: Prof. Dr. F. Thaiss

Datum der Disputation: 13.12.2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	3
2 Einleitung	5
2.1 Glomerulonephritis (GN)	5
2.1.1 Das Glomerulum	6
2.2 Tiermodell der GN - Nephrotoxische Nephritis (NTN)	8
2.3 Rolle von Immunzellen in der NTN	11
2.4 NF- κ B	14
2.4.1 IKK2-Inhibitor COMPOUND A (CpdA)	16
3 Zielsetzung	17
4 Material und Methoden	18
4.1 Material	18
4.1.1 Tiere	18
4.1.2 Geräte	18
4.1.3 Verbrauchsmaterial	19
4.1.4 Chemikalien	20
4.1.5 Kits	22
4.1.6 Lösungen	22
4.1.7 Antikörper	26
4.1.8 Zellkulturmedien	27
4.1.9 Primer	28
4.1.10 Computerprogramme	29
4.2 Methoden	30
4.2.1 Tierexperimentelles Arbeiten	30
4.2.2 Herstellung des NTN-Serums	32
4.2.3 Urin- und Blutdiagnostik	34
4.2.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	36
4.2.5 Molekularbiologische Methoden	39
4.2.6 Immunhistochemische Methoden	41
4.2.7 Immunbiologische Methoden	43
4.2.8 Phänotypische Untersuchungen an der $\text{Foxp3}^{\text{YFP-Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus	49
4.2.9 Statistik	49
5 Ergebnisse	50
5.1 Systemische NF- κ B-Hemmung in der NTN	50
5.1.1 NTN mit CpdA-Behandlung	50
5.2 Treg-spezifische IKK2-Deletion	60
5.2.1 Phänotyp der $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus	60
5.2.2 Histologische Untersuchungen der $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus	62
5.2.3 Expression von Foxp3^+ T-Zellen in lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen	65
5.2.4 IFN- γ -und IL-17-Antwort in Endorganen der $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus	68
5.2.5 Suppressive Funktion IKK2-defizienter Tregs	69
5.2.6 Apoptose in Organen der $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus	70
5.2.7 Proliferationsfähigkeit der Tregs aus $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen	71
5.3 CD4^+ T-zellspezifische IKK2-Deletion in der NTN	73

5.3.1	Charakterisierung CD4 ^{Cre} IKK2 ^{fl/fl} Maus	73
5.3.2	NTN in der CD4 ^{Cre} IKK2 ^{fl/fl} Maus	76
6	Diskussion	86
7	Literatur	95
8	Anhang	105

1 Zusammenfassung

Glomerulonephritiden (GN) gehören zu den häufigsten Ursachen für Nierenerkrankungen, die einer Nierenersatztherapie bedürfen. Ein wesentliches Merkmal der GN ist die Infiltration von T-Zellen und Makrophagen in die Niere, die dort durch die Ausschüttung von Zytokinen und Anlockung weiterer Immunzellen zur glomerulären Schädigung beitragen. Die Therapie der GN ist bislang sehr unspezifisch und toxisch und es bedarf daher spezifischer Therapien mit geringen Nebenwirkungen. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt inflammatorische sowie antiinflammatorische Effekte und nimmt Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen. Die IKK2-Kinase, ein zentrales Enzym der NF- κ B-Aktivierung, steht daher als Target für entzündliche Erkrankungen im Fokus.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Effekt einer IKK2-Hemmung auf den Verlauf und die Infiltration von T-Zellen in die nephritische Niere am Tiermodell der nephrotoxischen Nephritis (NTN) untersucht. Die Hemmung der IKK2-Kinase erfolgte zum einen mittels pharmakologischer IKK2-Blockade und zum anderen durch den zellspezifischen Knockout der IKK2 in CD4⁺ T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Tregs).

Unter der systemischen Applikation eines IKK2-Inhibitors infiltrierten deutlich weniger proinflammatorische Th17-Zellen und protektiv wirkende Tregs in die nephritische Niere; daraus resultierte eine nur begrenzte Wirksamkeit des Inhibitors bezüglich der glomerulären Schädigung. Der IKK2-Knockout in CD4⁺ T-Zellen zeigte in der NTN einen stärker inhibierenden Effekt auf Tregs als auf Th17-Zellen, wodurch Tiere mit IKK2-defizienten CD4⁺ T-Zellen einen höheren glomerulären Schaden aufwiesen. Tiere mit IKK2-defizienten Tregs zeigten überraschenderweise einen Scurfy-Phänotyp, der sich durch eine schuppige Haut, eine Splenomegalie und massive entzündliche zelluläre Infiltrate in verschiedenen Organen auszeichnet. Mit dieser Maus konnten aufgrund einer frühen Mortalität keine Nephritis-Experimente durchgeführt werden. Jedoch wurde an diesen Tieren die Bedeutung der IKK2-Kinase bei der Entstehung und Proliferation regulatorischer T-Zellen genauer untersucht.

Eine therapeutische Intervention durch eine NF- κ B-Hemmung ist nicht, wie erwartet, rein antiinflammatorisch, indem proinflammatorische Immunzellen inhibiert werden. Der Effekt auf Tregs als protektive Gegenspieler in einer Entzündungsreaktion ist weitaus größer und gibt Anlass den therapeutischen Nutzen von systemisch applizierten NF- κ B-Hemmern zu überdenken.

Summary

Glomerulonephritis is one of the main causes for end-stage renal disease. The fundamental characteristic and morphological hallmark of glomerular inflammatory lesions are infiltrating T cells and macrophages into the kidney. These cells produce cytokines and attract other immune cells by the secretion of chemokines which promotes glomerular tissue injury and damage. Therapeutic strategies so far are toxic and unspecific and therefore specific therapies with less side effects are needed.

The transcription factor NF- κ B has both inflammatory and anti-inflammatory effects and plays a pivotal role in the activation of T cells. Hence the IKK2-kinase, a central enzyme of the NF- κ B activation pathway, is a promising drug target in inflammatory diseases. This Ph.D.-thesis therefore analyzes the effect of pharmacologic and genetic IKK2-inhibition on the infiltration of immune cells into the nephritic kidney using an animal model of experimental nephrotoxic nephritis (NTN).

IKK2-inhibition was achieved 1) using a pharmacological specific IKK2-inhibitor and 2) via constitutive knockout in CD4⁺ T cells and regulatory T cells (Tregs). Nephritic mice treated with the IKK2-inhibitor showed reduced infiltration of proinflammatory Th17 cells and protective Tregs into the kidneys. This effect on infiltrating Th17 cells and Tregs resulted in a minor benefit of the IKK2-inhibitor on renal function and morphology. IKK2-knockout in CD4⁺ T cells revealed a much stronger inhibitory effect on Tregs than on proinflammatory CD4⁺ T cell subsets after the induction of NTN leading to more severe glomerular damage and impaired renal function. Mice with IKK2-deficient Tregs surprisingly showed a scurfy phenotype with keratosis of the skin, severe splenomegaly and inflammatory cell infiltrates in different organs. NTN experiments could not be performed in these mice due to early lethality. Therefore the effect of IKK2-kinase knockout on the development and proliferation of Tregs was further investigated.

Therapeutic intervention in the NF- κ B-pathway using specific IKK2-inhibitors has not only anti-inflammatory effects by suppressing activation of inflammatory cells. The effect on Tregs as the anti-inflammatory counterpart is much more stronger. Therefore the successful therapeutic application of NF- κ B-inhibitors has to be carefully considered.

2 Einleitung

Weltweit leiden 2 Millionen Menschen an einer chronischen Nierenerkrankung. Mit dieser Diagnose sind ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (unabhängig von Hypertonie oder Diabetes) [1][2] und erhebliche Kosten für das Gesundheitssystem verbunden [3].

Die chronische Nierenerkrankung ist häufig verantwortlich für eine terminale Niereninsuffizienz, welche eine Nierenersatztherapie in Form einer Nierentransplantation oder Dialyse erfordert. In vielen Ländern ist eine Nierentransplantation noch nicht etabliert, so dass es dort aufgrund von Nierenerkrankungen zur erhöhten Letalität kommt [4][5]. Beide Therapien sind mit immensen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden. In Industriestaaten beträgt das 6 % bis 12 % der Gesamtausgaben im Gesundheitswesen [6].

Ein wichtiger Lösungsansatz für dieses Problem ist die Prävention der Ursachen, die zu Nierenerkrankungen führen. 75 % aller Nierenerkrankungen sind auf Hypertonie, Adipositas, Diabetes und Glomerulonephritiden zurückzuführen [7][8][9].

Während über die Ätiologie des metabolischen Syndroms bereits viel bekannt ist, bedarf es noch eines besseren Verständnisses der Pathomechanismen der Glomerulonephritis, um spezifische Therapien zu entwickeln.

Diese Arbeit fokussiert sich auf den Effekt des Transkriptionsfaktors NF- κ B auf die Glomerulonephritis und untersucht hierbei gezielt das Infiltrationsverhalten von Immunzellen in die Niere.

2.1 Glomerulonephritis (GN)

Glomerulonephritis ist ein Oberbegriff für immunvermittelte Entzündungserkrankungen, die das Glomerulum und andere Teile der Niere betreffen. Sie äußert sich durch eine Hämaturie, Proteinurie und eine eingeschränkte Nierenfunktion. Die Therapie ist meist toxisch und unspezifisch. Es kommen immunsupprimierende Arzneistoffe wie Prednisolon oder Cyclophosphamid zum Einsatz [10]. Die aggressivste Form der Glomerulonephritis ist die **Rapid Progressive Glomerulonephritis (RPGN)**. Sie kann in Tagen bis wenigen Wochen zum Verlust der Nierenfunktion führen und bedarf einer schnellen Diagnose und Behandlung. Eine RPGN kann verschiedener Ätiologie sein und sich sehr heterogen zeigen. Sie wird daher in drei Typen unterteilt:

In der RPGN Typ 1 handelt es sich um eine Anti-GBM-Nephritis. Hier werden Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM) gebildet. Bei der Immunkomplex-Nephritis spricht

man von einer RPGN Typ II. Sie tritt häufig in Verbindung mit Lupus Erythematoses auf. Am häufigsten zeigt sich eine RPGN in Form der ANCA-assoziierten Vaskulitis (RPGN Typ III) als Verlaufsform der Wegener Granulomatose. Hierbei schädigen anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA) die glomerulären Kapillaren.

Auch wenn die Ursachen dieser drei Formen der Glomerulonephritis unterschiedlich sind, finden sich immunvermittelte Prozesse und Interaktionen von infiltrierenden Immunzellen mit ortsständigen Zellen der Niere in der Pathogenese jeder Form wieder. Eine wesentliche Gemeinsamkeit ist die Rekrutierung von T-Zellen und Makrophagen in die Niere, die dort durch zytotoxische Effekte, die Ausschüttung von Chemokinen und das Anlocken von weiteren Immunzellen zur glomerulären Schädigung und einem Funktionsverlust des Glomerulums führen [9][11].

2.1.1 Das Glomerulum

Das Glomerulum befindet sich im Nierenkörperchen, welches zusammen mit dem Tubulusapparat die funktionelle Untereinheit der Niere - das Nephron - bildet. Es ähnelt einem Kapillarknäuel und ist von einer Epithelkapsel - der Bowman-Kapsel (BC) - umgeben. Hier wird der Primärharn durch Filtration des Blutes durch die glomerulären Kapillaren gebildet. Das Blut wird über das Vas afferens zugeführt, durch die Kapillarschlingen gepresst und über das Vas efferens aus dem Glomerulum geleitet. Der Filtrationsvorgang findet an der sogenannten Filtrationsbarriere der Glomeruluskapillaren statt. Das Blut passiert zuerst das fenestrierte Kapillarendothel, welches Blutzellen zurückhalten kann. Größere Moleküle, wie Eiweiße, werden an der GBM aufgehalten. Die letzte Barriere bilden Podozyten, die mit ihren Fußfortsätzen enge Schlitzporen bilden.

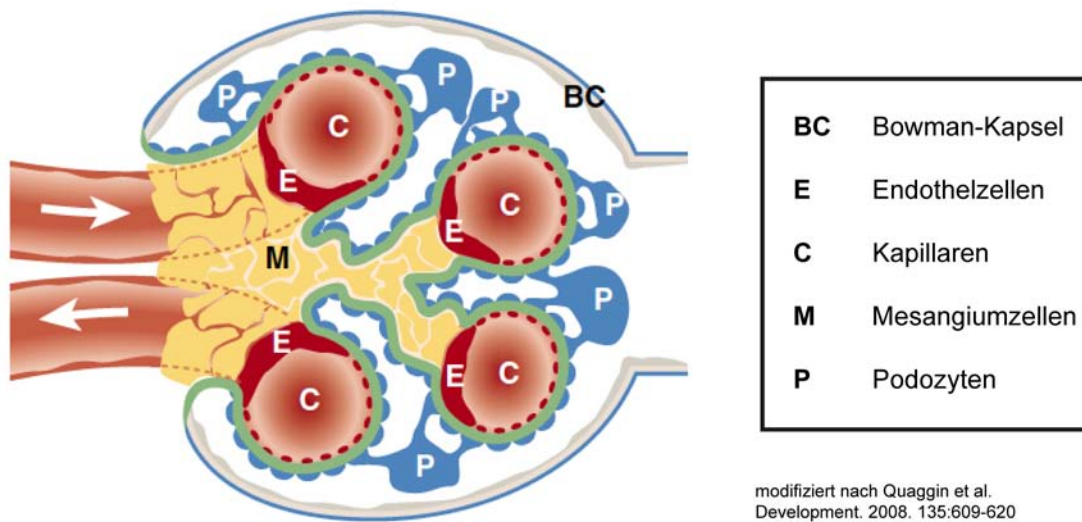


Abbildung 2.1
Schematische Darstellung eines Glomerulums.

Die PAS-Färbung eines Glomerulums zeigt einen lockeren glomerulären Taft mit einer dünnen GBM. Die Endothelzellen der BC liegen flach an und das Glomerulum weist eine normale Zellularität auf. Bei einer RPGN sind entzündliche Infiltrate und eine Halbmondbildung charakteristisch. Die GBM wird permeabler und es kommt zu Fibrineinlagerungen im Lumen der BC. Fibrin regt die Endothelzellen der Bowman-Kapsel zur Proliferation an und es kommt zu einem „Zusammendrücken“ des Kapillarknäuels.

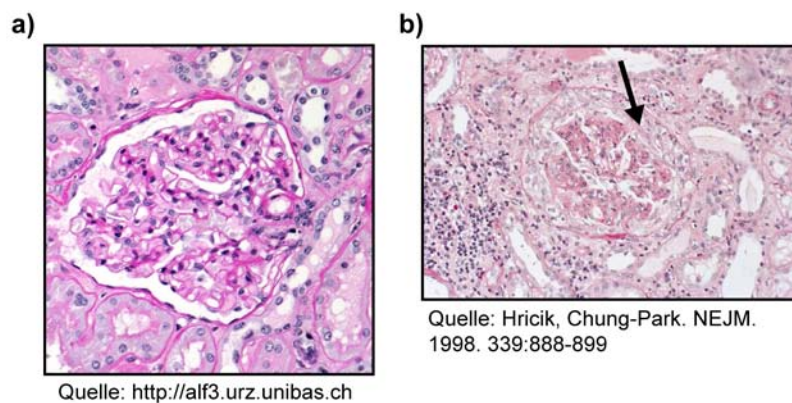


Abbildung 2.2
(a) PAS-Färbung eines gesunden Glomerulums.
(b) Halbmondbildung bei RPGN (HE-Färbung).
Pfeil zeigt den Halbmond

2.2 Tiermodell der GN - Nephrotoxische Nephritis (NTN)

Für die Untersuchung der Pathomechanismen der GN stehen viele tierexperimentelle Modelle zur Verfügung, die histologisch Gemeinsamkeiten mit humanen Glomerulonephritiden aufweisen. Das weltweit am besten untersuchte Modell zum Verständnis der GN ist das Modell der nephrotoxischen Nephritis (NTN) in der Maus. Es weist immunpathologisch Parallelen mit der RPGN, wie die Infiltration von Immunzellen und die Halbmondbildung, auf.

Die NTN wird durch die Injektion eines heterogenen Serums induziert, welches durch die Immunisierung von Schafen mit murinen GBM-Bestandteilen gewonnen wurde. 2 Tage nach der Injektion finden sich Immunkomplex-Ablagerungen des Schaf-IgGs entlang der GBM.

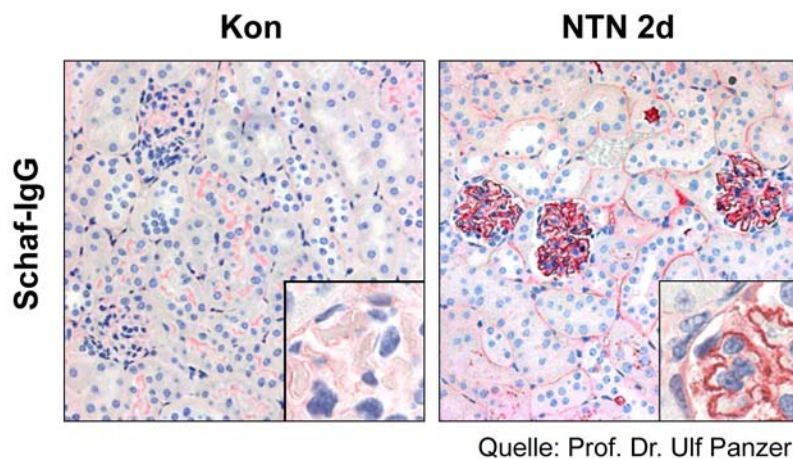


Abbildung 2.3

Heterologe Phase der NTN.

Bindung von Schaf-IgG entlang der GBM.

Man spricht hier von der heterologen Phase der NTN, der ab ca. Tag 4 die autologe Phase folgt. Die autologe Phase beschreibt die spezifische Immunantwort der Maus gegen das Schaf-IgG und ist charakterisiert durch die Infiltration von T-Zellen und Makrophagen in das Tubulointerstitium.

Diese Zellen sezernieren Zytokine und locken weitere Effektorzellen an, die sowohl das Glomerulum als auch das Interstitium schädigen. Diese Vorgänge entsprechen einer Überempfindlichkeitsreaktion des Typ III [12][13].

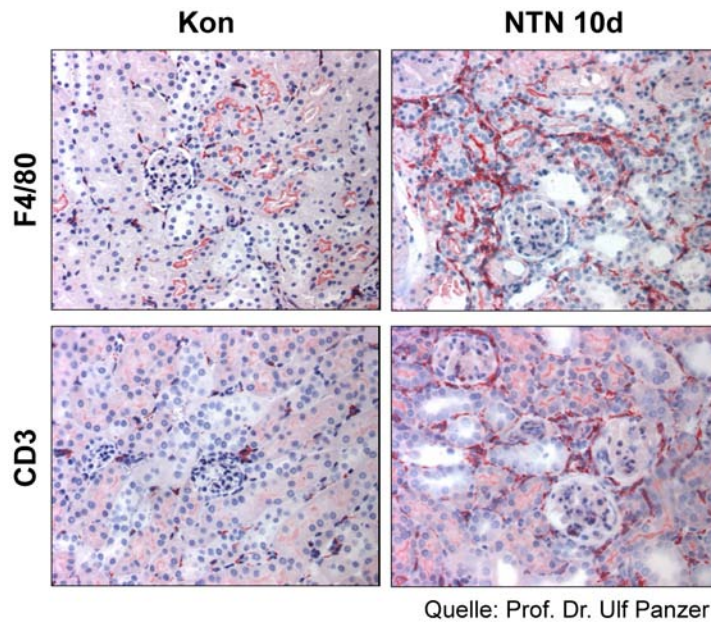
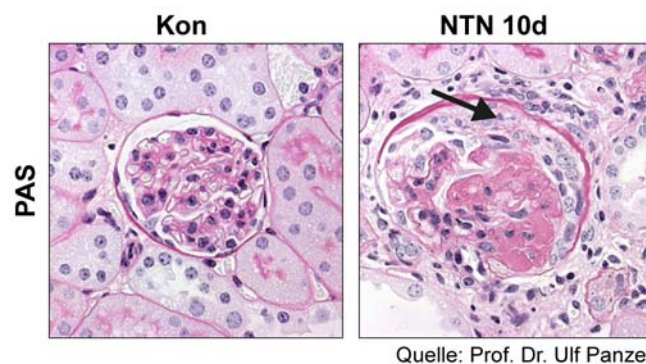


Abbildung 2.4

Autologe Phase der NTN.

Oben: Immunhistologische F4/80-Färbung für Makrophagen. Unten: Immunhistologische CD3-Färbung für T-Zellen.

10 Tage nach Induktion der NTN findet man eine ausgeprägte Halbmondbildung in den Glomeruli. Es kommt zu einer Verdickung der Bowman-Kapsel und das Lumen zwischen BC und dem Kapillarknäuel ist gefüllt mit proliferierenden Endothelzellen der BC, die letztendlich den sogenannten Halbmond bilden. Das Glomerulum weist eine Zellarmut und viele PAS-positive Bereiche auf. Diese enthalten Kollagen und Proteininfiltrate. Die lockere Struktur des glomerulären Kapillarknäuels ist verloren und das stark geschädigte Glomerulum kann die Funktion als Filtrationsbarriere nicht mehr erfüllen. Es kommt daher zu einer erhöhten Albuminurie und dem Anstieg des Serum-Harnstoff- und Kreatininspiegels.



Quelle: Prof. Dr. Ulf Panzer

Abbildung 2.5

Halbmondbildung der NTN.

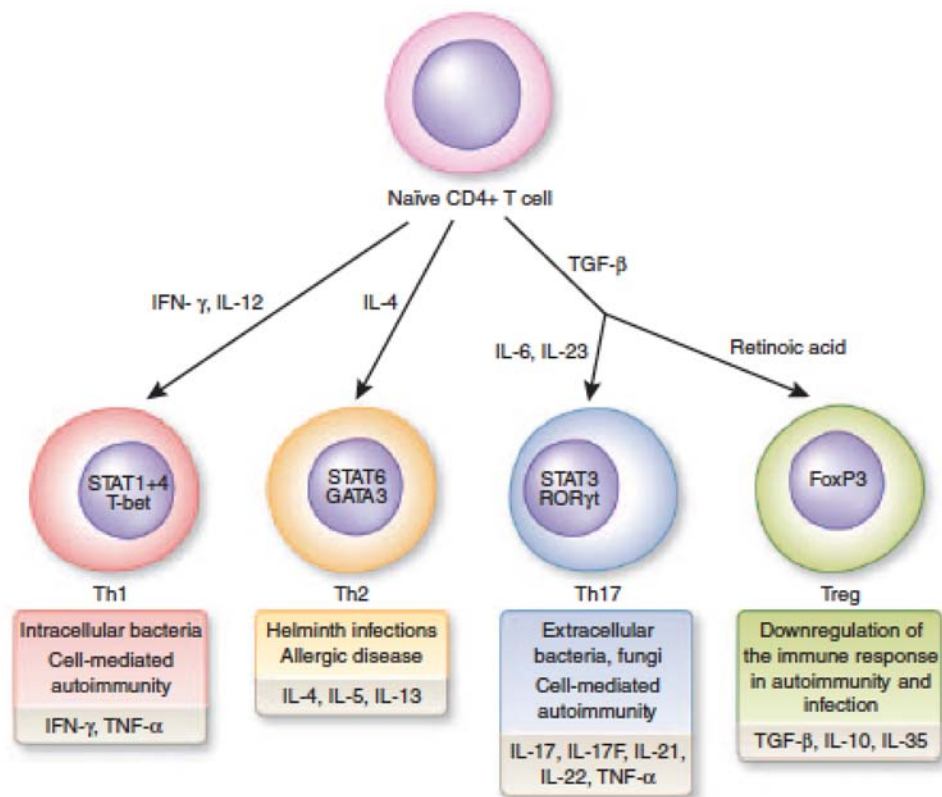
PAS-Färbung von Kontroll- und NTN-Tieren 10 Tage nach Induktion der NTN. Pfeil zeigt den Halbmond.

2.3 Rolle von Immunzellen in der NTN

Die adaptive Immunantwort spielt eine große Rolle in der NTN, da sie wesentlich zur glomerulären Schädigung beiträgt. Das injizierte Antigen wird von antigenpräsentierenden Zellen in der Niere erkannt. Das sind im klassischen Sinn dendritische Zellen (DC) [14]. Ihre Aufgabe ist es fremde Antigene zu erkennen, aufzunehmen, zu prozessieren und sie letztendlich im renalen Lymphknoten naiven $CD4^+$ T-Zellen zu präsentieren.

Dieser Vorgang aktiviert die naive $CD4^+$ T-Zelle und befähigt sie somit eine spezifische Immunantwort zu initiieren. DCs haben in der NTN ebenfalls eine Effektorfunktion. Sie wurden in der Niere als CD11c-positive Zellen im Interstitium identifiziert [15] und haben in der frühen Phase der NTN eine protektive Funktion. Im Verlauf der Entzündung reifen sie und entwickeln einen proinflammatorischen Phänotyp [16][17].

In der NTN sind proinflammatorische $CD4^+$ T-Zellen an der Ausprägung des glomerulären Schadens beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass eine $CD4$ -Depletion die Infiltration von Makrophagen in die Niere abschwächt und dass es dadurch zur verringerten Halbmondbildung kommt [18]. $CD4^+$ T-Zellen werden mittels ihrer sezernierten Zytokine und ihrer spezifischen Transkriptionsfaktoren in folgende Gruppen unterteilt:



Quelle: Turner, Paust, Kidney Int 2010, 77:1070-1075

Abbildung 2.6

Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen.

Je nach Zytokinmilieu können naive CD4⁺ T-Zellen in Th1, Th2, Th17 und regulatorische T-Zellen (Tregs) differenzieren. DCs können durch ihre Sekretion von IL-12 eine Differenzierung zu Th1-Zellen bewirken. Diese sezernieren die Zytokine IFN- γ und TNF- α , deren Rollen in der NTN sehr entscheidend sind [19]. Beide Zytokine sind an der Schädigung der Glomeruli beteiligt [20][21] und rekrutieren darüber hinaus Makrophagen, die durch die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und weiteren proinflammatorischen Zytokinen die BC zerstören und die Proliferation von Endothelzellen der BC zum Halbmond anregen [22][15].

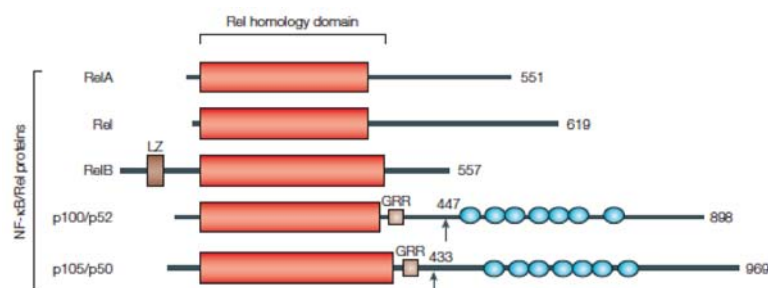
Die Th1-Antwort ist entscheidend für die NTN und wird aus diesem Grund in C57BL/6 Tieren untersucht, die stärker empfänglich sind für Th1- als für Th2-Effektorfunktionen. Eine NTN in Th2-anfälligeren BALB/c Tieren zeigt nur eine geringe Halbmondbildung [23].

Unter dem Einfluss von IL-6 und TGF- β differenziert eine CD4⁺ T-Zelle zu einer Th17-Zelle. Th17-Zellen sind pathogene T-Zellen, die sich durch die Sekretion von IL-17, TNF- α und die Transkriptionsfaktoren ROR γ t und STAT3 auszeichnen. In der NTN sind Th17-Zellen erst seit Kurzem als proinflammatorische Zellen bekannt [24]. Neuere Untersuchungen zeigen auch, dass Th17-Zellen durch die Expression des Chemokins CXCL9 in der frühen Phase der NTN Th1-Zellen rekrutieren können [25].

Eine protektive CD4⁺ T-Zellpopulation sind die Tregs. Ihre Hauptaufgabe im Organismus ist es, immunologische Eigentoleranz aufrecht zu erhalten und die Funktionen von Th-Effektorzellen zu supprimieren. Sie können die IL-2-Ausschüttung von T-Effektorzellen (auch Responderzellen genannt) unterbinden [26]. Tregs werden in native Tregs (nTregs) und induzierbare Tregs (iTregs) unterteilt. nTregs werden direkt im Thymus aus CD4⁺ Thymozyten durch positive Selektion gebildet. iTregs werden in der Peripherie aus CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁻ T-Zellen durch TGF- β induziert [27][28]. Tregs sind durch die konstitutive Expression der IL-2 Rezeptor- α -Kette (CD25) und des Transkriptionsfaktors forkhead/winged-helix box P3 (Foxp3) gekennzeichnet. Foxp3 ist wichtig für ihre Entwicklung und suppressive Funktion [29][30][31]. Eine Mutation im Foxp3-Gen hat eine lymphoproliferative Autoimmunerkrankung sowohl im Menschen (IPEX-Syndrom) [32] als auch in der Maus (Scurfy-Phänotyp) zur Folge [33]. In vielen Publikationen wurde der protektive Effekt von Tregs in der NTN beschrieben [34][35]. Im Verlauf der NTN steigt die Anzahl der Tregs in der Niere an und kann die Infiltration von T-Zellen und Makrophagen in die Niere verringern. Eine Treg-Depletion fördert folglich die Th1-Antwort in der nephritischen Niere und aggraviert somit die NTN [36].

2.4 NF- κ B

Die Transkriptionsfaktorfamilie NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) hat eine zentrale Bedeutung für Vorgänge der angeborenen, sowie adaptiven Immunantwort. Sie reguliert die Transkription von Genen für Zytokine und Proliferations- sowie Differenzierungsvorgänge von Zellen. NF- κ B besteht aus fünf Untereinheiten, die sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden können: NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB and c-Rel [37]. Die Proteine haben in ihrer Struktur die Rel-Homologie-Domäne (RHD) gemein, welche ihre Dimerisierung und DNA-Bindung ermöglicht. p100 und p105 sind Vorstufen und werden zu den aktiven Formen p52 und p50 prozessiert.

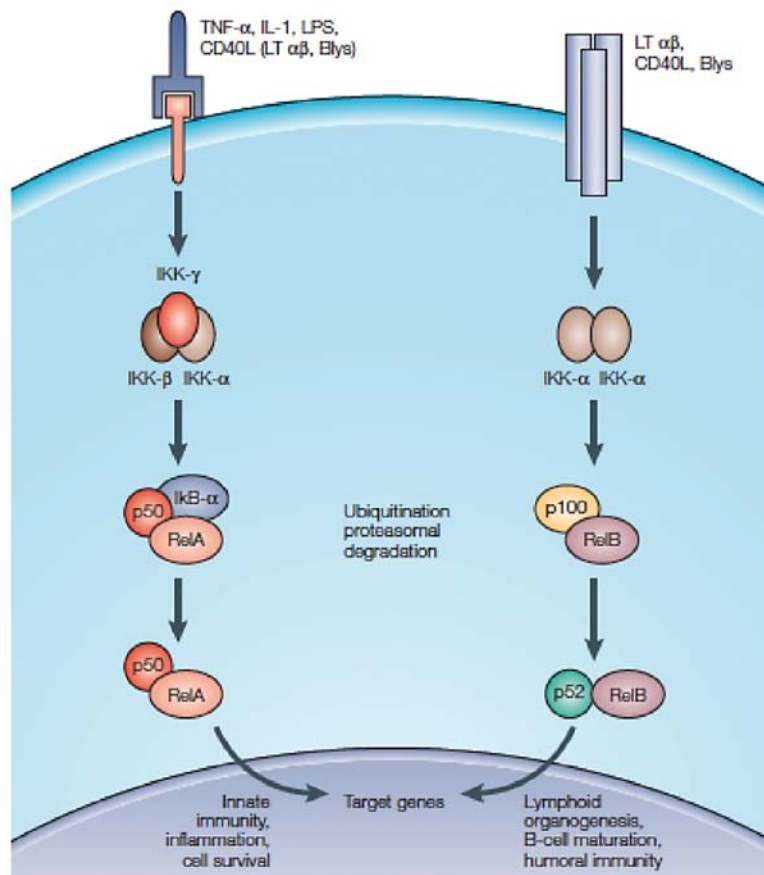


Quelle: Karin, Nat Rev Drug Discov 2004, 3:17-26

Abbildung 2.7

Die NF- κ B-Familie.

Eine NF- κ B-Aktivierung kann über den „alternativen Signalweg“, der die Transkription von Genen für die Entstehung lymphoider Organe und die B-Zellreifung induziert, laufen oder über den „klassischen Signalweg“. Hier werden Vorgänge für die angeborene Immunantwort und Inflammation durch Signale wie TNF- α oder LPS aktiviert. Die NF- κ B-Kaskade ist ebenfalls dem B- und T-Zellrezeptor nachgeschaltet.



Quelle: Karin, Nat Rev Drug Discov 2004, 3:17-26

Abbildung 2.8

NF-κB-Signalwege.

Links: Klassischer Signalweg. Rechts: Alternativer Signalweg.

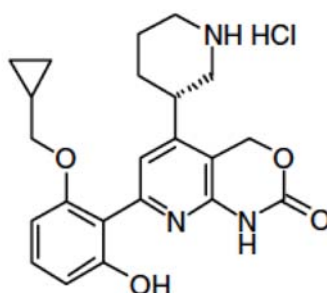
Das häufigste Heterodimer besteht aus p50 und RelA. Im inaktiven Zustand liegt es im Cytoplasma gebunden an den Inhibitor IκB-α vor. Die Aktivierung des Heterodimers erfolgt durch den IκB-Kinase-Komplex (IKK-Komplex). Dieser Komplex besteht aus drei Untereinheiten: die beiden Kinase-Einheiten IKK1 und IKK2 (auch IKKα und IKKβ genannt) und der regulatorischen Einheit NEMO (IKKγ). Die IKK2 spielt die zentrale Rolle in diesem Vorgang. Sie phosphoryliert IκB-α, welches dann über das 26-S-Proteasom degradiert wird. Das setzt die NF-κB-Proteine frei, die dann in den Nukleus einwandern, wo sie die Transkription verschiedener Gene regulieren [37].

Die Wirkungen von NF-κB sind vielfältig; es ist an pro- und auch antiinflammatorischen Prozessen [38][39][40] beteiligt und gilt darüber hinaus als antiapoptotisch [41].

NF- κ B ist ein vielversprechendes Target in der Krebstherapie und der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen. Derzeit werden viele NF- κ B-Inhibitoren - speziell IKK2-Inhibitoren - entwickelt, die beispielsweise im Tiermodell der rheumatoiden Arthritis [42] oder Lungenerkrankung [43][44] erste antiinflammatorische Effekte zeigen.

Für den IKK2-Inhibitor IMD-0354 konnte kürzlich gezeigt werden, dass er Tumorstadium im Mausmodell der adulten T-Zellleukämie unterbinden kann [45]. Der IKK2-Inhibitor SAR113945 befindet sich derzeit in Phase II zur intraartikulären Therapie bei Osteoarthritis (clinicaltrial.gov Stand Juli 2012). 2011 wurde die Kristallstruktur von IKK2 veröffentlicht und damit ist dieses Enzym als Target noch weiter in den Fokus gerückt [46].

2.4.1 IKK2-Inhibitor COMPOUND A (CpdA)



Quelle: Ziegelbauer K, Gantner F 2005.
Br J Pharmacol 145:178-192

Abbildung 2.9

Struktur der CpdA.

Die Leitstruktur des CpdA (7-[2-(cyclopropylmethoxy)-6-hydroxyphenyl]-5-[(3S)-3-piperidinyl]-1,4-dihydro-2H-pyrido[2,3-d][1,3]oxazin-2-one hydrochlorid) wurde durch ein Screening der Bayer compound library identifiziert und anschließend modifiziert.

Grundstruktur ist ein 4-Piperidin-3-ylpyridin-Gerüst, welches eine hohe zelluläre Aktivität zeigte. Durch die Substituenten an Position 4 des Pyridinrings ist die in-vitro Aktivität gesteigert. Der Cyclopropylrest an ortho-Position des Phenolrings erhöht die Spezifität. Es konnte gezeigt werden, dass CpdA die humane rekombinante IKK2 mit einer K_i von 4nM in einer nicht-kompetitiven Reaktion hemmt. IKK1 wird von CpdA erst bei K_i 135nM gehemmt [44].

3 Zielsetzung

Die Glomerulonephritis ist heutzutage eine der häufigsten Erkrankungen, die zu einer Dialysepflicht führen. Ein wesentliches Merkmal ist die Rekrutierung von T-Zellen und Makrophagen in die Niere, die dort durch zytotoxische Effekte, die Ausschüttung von Chemokinen und das Anlocken von weiteren Immunzellen zur glomerulären Schädigung und einem Funktionsverlust des Glomerulums führen. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt antiinflammatorische Effekte und spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen.

Diese Arbeit untersucht den Einfluss einer NF- κ B-Hemmung auf das Infiltrationsverhalten von T-Zellen und Makrophagen im experimentellen Modell der nephrotoxischen Nephritis. Hierfür wird die IKK2, das zentrale Enzym des NF- κ B-Signalwegs, pharmakologisch gehemmt. Anschließend wird der Effekt einer IKK2-Deletion in CD4⁺ T-Zellen und regulatorischen T-Zellen im Tiermodell der CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} und Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus untersucht.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Tiere

C57BL6/J_2009/2010

Foxp3^{YFP-Cre}

IKK2^{fl/fl}

CD4^{Cre}

UKE-Eigenzucht

A.Y. Rudensky, New York, USA

M. Karin, San Diego, USA

C. Wilson, Washington, USA

4.1.2 Geräte

1000 µl Pipette

100 µl Pipette

10 µl Pipette

200 µl Pipette

8Kanal-Pipette

Autoklav

Biofuge

Brutschrank

Brutschränke

Drucker

Durchflusszytometer LSR II

Eismaschine

Elektrophoresekammer für DNA

ELISA Reader MRX II

Entwickler

Gefrierer -20 °C

Gefrierer -80 °C

Gel-Fotoapparat

Gilson, USA

Gilson, USA

Gilson, USA

Gilson, USA

BRAND, Deutschland

Systec, Deutschland

Heraeus, Deutschland

Heraeus, Deutschland

Heraeus, Deutschland

Canon, Japan

Becton Dickinson, USA

Hoshikazi, Japan

Peqlab, Deutschland

Dynatech Laboratories, USA

AGFA, Deutschland

Bosch, Deutschland

Heraeus, Deutschland

CellBiosciences, USA

Homogenisator	Fisherbrand, Deutschland
Kamera AxioCam HRC	Zeiss, Deutschland
Kamera AxioCam HRC	Zeiss, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Deutschland
Laminar Air Flow	Nuaire, USA
Magnetrührer	Heidolph, Deutschland
Mikroskop Axioskop	Zeiss, Germany
Mikrotom RM 2255	Leica, Deutschland
Narkoseanlage	Summit Anaesthesia, USA
PC	Dell, USA
Personal Cycler	Biometra, Deutschland
Pipettus	Hirschmann, Deutschland
RT-PCR Maschine	Applied Biosystems, USA
Schüttler	Dynal, Kanada
Schwenktisch	Fröbel, Belgien
T1 Thermocycler	Biometra, Deutschland
Tischzentrifuge	Labnet, USA
Waage	Sartorius, Deutschland
Wasserbad	Julabo, Deutschland
Wecker	Roth, Deutschland
Wortex	IKA®, Deutschland
Zählkammer Neubauer	Roth, Deutschland

4.1.3 Verbrauchsmaterial

1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
10 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
200 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
24-well-Platte	Sarstedt, Deutschland
96-well-Platte	Sarstedt, Deutschland

96 well Platte round bottom	Nunc, Dänemark
Bechergläser	Schott, Deutschland
Cell Strainer 40 µm	BD Biosciences, Deutschland
Cell Strainer 70 µm	BD Biosciences, Deutschland
Deckgläschen	Marienfeld, Deutschland
Falcon FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Deutschland
Falcon Röhrchen 15 ml	BD Biosciences, Deutschland
Falcon Röhrchen 50 ml	BD Biosciences, Deutschland
Hydrophober Stift	Dako, Dänemark
Injektionskanüle 23G, 30G	Braun, Deutschland
Multistix® 10 SG	Siemens, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,2 ml, 8er Stripe	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäß 2,0 ml	Sarstedt, Deutschland
S-Monovetten 5,5 ml AH	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipette 2 ml	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Deutschland
Spritze Omnifix F	Braun, Deutschland
Super RX Film	Fuji, Japan

4.1.4 Chemikalien

β-Mercaptoethanol (β-ME)	Invitrogen, Kanada
Aqua ad iniectabilia	Baxter, Schweiz
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Cellwash	BD Biosciences, Deutschland
Collagenase D	Roche, Deutschland

DNase I	Roche, Deutschland
DTT	Sigma-Aldrich, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol abs.	JT Baker, Niederlande
Ethanol vergällt	Walter, Deutschland
Ethidiumbromid	BioRad, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences, Deutschland
FACS Flow	BD Biosciences, Deutschland
FACS Rinse	BD Biosciences, Deutschland
FCS	Invitrogen, Kanada
Filmentwickler Roentoroll 25	Tetenal, Deutschland
Filmfixierer Superfix 25	Tetenal, Deutschland
Formalin	Merck, Deutschland
Hepes	Invitrogen, Kanada
Ionomycin	Merck, Deutschland
Isofluran	Abbot, USA
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Kanada
Perjodsäure	Merck, Deutschland
PermWash	BD Biosciences, Deutschland
PMA	Sigma-Aldrich, USA
Protease 24	Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640	Invitrogen, Kanada
Salzsäure	Merck, Deutschland
Steriles HBSS	Invitrogen, Kanada
Steriles PBS	Lonza, USA
Trypanblau 0,5 %	Biochrom, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich, USA
X-Vivo Medium	Lonza, USA
Xylol	Merck, Deutschland

4.1.5 Kits

CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit II mouse	Miltenyi Biotech, USA
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotech, USA
CytoChemPlus (AP) Polymer Bulk Kit	ZytoMed, Deutschland
Cytofix/Cytoperm Kit	BD Biosciences, Deutschland
ELISA Kit, E101	Bethyl Laboratories, USA
Foxp3 FITC Intracellular Staining Kit BD	Biosciences, Deutschland
NucleoSpin [®] RNA II Mini Kit	Macherey-Nagel, Deutschland

4.1.6 Lösungen

Puffer für die Immunhistochemie

Sörensen-Puffer

3,03g NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	Merck, Deutschland
14,4g Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	Merck, Deutschland
Ad 1000 ml (pH 7,2 - 7,4)	

Formalin-Lösung (4 %)

40 ml Formaldehyd 37 %, säurefrei	Merck, Deutschland
320 ml Sörensen-Puffer	

Dako-Puffer pH9

10x Dako Target Retrieval Solution pH9	DakoCytomation, Deutschland
--	-----------------------------

Zitronensäurepuffer pH 5

10,4 g Zitronensäure H ₂ O	Sigma Aldrich, USA
17,8 g Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	Merck, Deutschland
Aqua dest. ad 1l	
1 ml Tween 20	Sigma Aldrich, USA

TNT-Puffer pH 8,2 - 8,4

9,0 g NaCl	J.T. Baker, Niederlande
6,35 g Tris	Sigma Aldrich, USA
25 ml 1N HCl	Roth, Deutschland
Aqua bidest ad 1 l	
1 ml Tween 20	Sigma Aldrich, USA

Naphtol-AS-Bi-Phosphat-Gemisch

250 mg Naphtol-AS-Bi-Phosphat	Sigma Aldrich, USA
9,38 mg NN-Dimethylformamid	Sigma Aldrich, USA

Neufuchsin-Lösung

150 ml TNT-Puffer	
300 mg NaNO ₂	Sigma Aldrich, USA
300 µl Neufuchsin-Stammlösung	
(5 % Neufuchsin in 2N HCl)	
800 µl Naphtol-AS-Bi-Phosphat Gemisch	

Hämalaun-Lösung nach Böhmer

Lösung I	
200 ml	Aqua bidest
10 g AlK(SO ₄) ₂ ×12H ₂ O	Merck, Deutschland
0,1 g NaIO ₃	Merck, Deutschland
Lösung II	
0,5 g Hämatoxylin	Serva, Deutschland
10 g Ethanol abs	

Schiff'sches Reagenz

Lösung I

2 g Fuchsin

Sigma Aldrich, USA

30 ml 1N HCl

Lösung II

3,8 g $K_2S_2O_5$

Sigma Aldrich, USA

170 ml Aqua dest.

Puffer für die Isolation nukleärer ProteineHypotoner Puffer A

10 mmol/l Hepes

Invitrogen, Kanada

10 mmol/l KCl

Merck, Deutschland

0,1 mmol/l EDTA pH 8,0

Sigma-Aldrich, USA

0,1 mmol/l EGTA pH 8,0

Sigma-Aldrich, USA

Frisch zugesetzt (1:100):

1 mmol/l DTT

Invitrogen, Kanada

100x Protease Inhibitor Mix

Serva, Deutschland

1 mmol/l Natriumvanadat

Sigma-Aldrich, USA

Hypotoner Puffer B

10 mmol/l Hepes

140 mmol/l NaCl

J.T. Baker, Niederlande

2 mmol/l EDTA pH 8,0

Sigma-Aldrich, USA

1 % NP 40

Sigma-Aldrich, USA

10 % Glycerol

Fluka, Deutschland

Frisch zugesetzt (1:100):

1 mmol/l DTT

100x Protease Inhibitor Mix

1 mmol/l Natriumvanadat

Protein-Lysis Puffer

50 mmol/l Hepes

140 mmol/l NaCl

2 mmol/l EDTA

1 % NP40

Sigma-Aldrich, USA

10 % Glycerol

Sigma-Aldrich, USA

Frisch zugesetzt (1:100):

100x Protease Inhibitor Mix

1 mmol/l Natriumvanadat

Puffer für Elektrophoresen1x TAE Puffer

4,48 g Tris-Base

Sigma-Aldrich, USA

1,15 ml Essigsäure

Roth, Deutschland

2 ml 0,5M EDTA

H₂O ad 1 l

Puffer für DurchflusszytometrieMACS-Puffer

PBS

0,5 % BSA

2 mmol/l EDTA

Puffer für Albumin-ELISAPostcoat Puffer

50 mmol/l Tris pH 8,0

Bethyl, USA

0,1 % BSA

Bethyl, USA

Ad 1 l Aqua ad iniectabilia

Sample Diluent

Postcoat Puffer

0,05 % Tween 20

(Bethyl, USA)

Coating Puffer

0,05 mol/l Carbonat-Bicarbonat pH 9,6

Sigma-Aldrich, USA

Ad 1 l Aqua ad iniectionabilia

Waschpuffer

50 mmol/l Tris

0,05 % Tween 20

Enzym Substrat

TMB Peroxidase Substrat

(Kirkegaard & Perry, USA)

Peroxidase Solution B

(Kirkegaard & Perry, USA)

4.1.7 Antikörper**Primärantikörper für die Immunhistochemie**

Antikörper	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3	DakoCytomation	1:100
Monoclonal Rat Anti Mouse F4/80	BMA Biomedicals	1:2000
Rat Anti Mouse Foxp3	eBiosciences	1:200
Rabbit Anti Mouse Schaf IgG	Dianova	1:3000

Brückenantikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
Rabbit Anti Rat	DakoCytomation	1:200

Sekundärantikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
Anti-Rabbit AP-Komplex	Zytomed	unverdünnt

Antikörper für die FACS-Färbung

Antigen	Fluorochrom	Hersteller
CD45	PerCP	BD Horizon
CD4	APCeFluor780	
CD3	V450, Fitc	
CD25	PeCy7	
CD8	V500	
F4/80	APC	
CD11b	AF700	
CD11c	V450	
Foxp3	PE, Fitc	
IL-17	PE	BD Pharmingen
IFN- γ	Fitc	

4.1.8 ZellkulturmedienBasismedium für T-Zellkulturen

RPMI 1640

5 % Penicillin-Streptomycin

5 % Hepes

10 % FCS

0,1 % β -Aqua ad injectabilia

4.1.9 Primer

(alles Invitrogen), Deutschland

Genotypisierung

Primer	Sequenz
CD4Cre FW	CGAGTGATGAGGTTCAAG
CD4Cre RW	TGAGTGAACGAACCTGGTCG
Foxp3 YFP Cre FW	AGGATGTGAGGGACTACCTCCTGTA
Foxp3 YFP Cre RW	TCCTTCACTCTGATTCTGGCAATTT
Foxp3 Cre WT FW	TGGACCGTAGATGAATTTGAGTT
Foxp3 Cre WT RW	CCAGATGTTGTGGGTGAGTG
IKK2 flox FW	CCTTGTCTATAGAAGCACAAAC
IKK2 flox RW	GTCATTTCCACAGCCCTGTGA

Realtime-PCR

Primer	Sequenz
18S FW	CACGGCCGGTACAGTGAAAC
18S RW	AGAGGAGCGAGCGACCAAA
CCL20 FW	TGGGTGAAAAGGGCTGTGA
CCL20 RW	AGCATCAGTTTTTACATCTTCTTGAC
IL-1 β FW	CCTCCAGGATGAGGACATGA
IL-1 β RW	TCATCCCATGAGTCACAGAGGAT
TNF- α FW	AAATGGCCTCCCTCTCATCAGT
TNF- α RW	GCTTGTCACCTCGAATTTTGAGAAG

Analytische PCR

Primer	Sequenz
IKK2 FW	CACAATCAGGCGACAGGTGAA
IKK2 RW	TGCCGAAGCTCCAGTAGTCAA

4.1.10 Computerprogramme

Alpha Imager Mini	Proteinsimple, USA
Axiovision	Zeiss, Deutschland
Excel	Microsoft, USA
FACS Diva	BD Biosciences, Deutschland
FlowJo	Tree Star Inc, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, USA
Photoshop	Adobe, USA
Powerpoint	Microsoft, USA
Revelation	Dynatech, UK
StepOne™ Software 2.0	Applied Biosystems, USA
T-Base	4D SAS, Frankreich
Windows XP	Microsoft, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Tierexperimentelles Arbeiten

Genotypisierung

Die Genotypisierung der transgenen Mauslinien wurde mit DNA aus Schwanzbiopsien vorgenommen. Die Schwänze wurden dafür in einem Gemisch aus Extraktionspuffer und TissuePrep 10 min bei 65 °C lysiert. Nach Zugabe eines Neutralisationspuffers konnte die gewonnene DNA für Genotypisierungs-PCRs eingesetzt werden.

Mastermix für Isolierung genomischer DNA

Extraktionspuffer	100 µl	Sigma Aldrich, Deutschland
Tissue Prep	25 µl	Sigma Aldrich, Deutschland
Neutralisationspuffer	100 µl	Sigma Aldrich, Deutschland

Das PCR-Produkt wurde auf 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid visualisiert. Die Genotypisierungsarbeiten wurden von Frau Hermann durchgeführt.

Tierhaltung

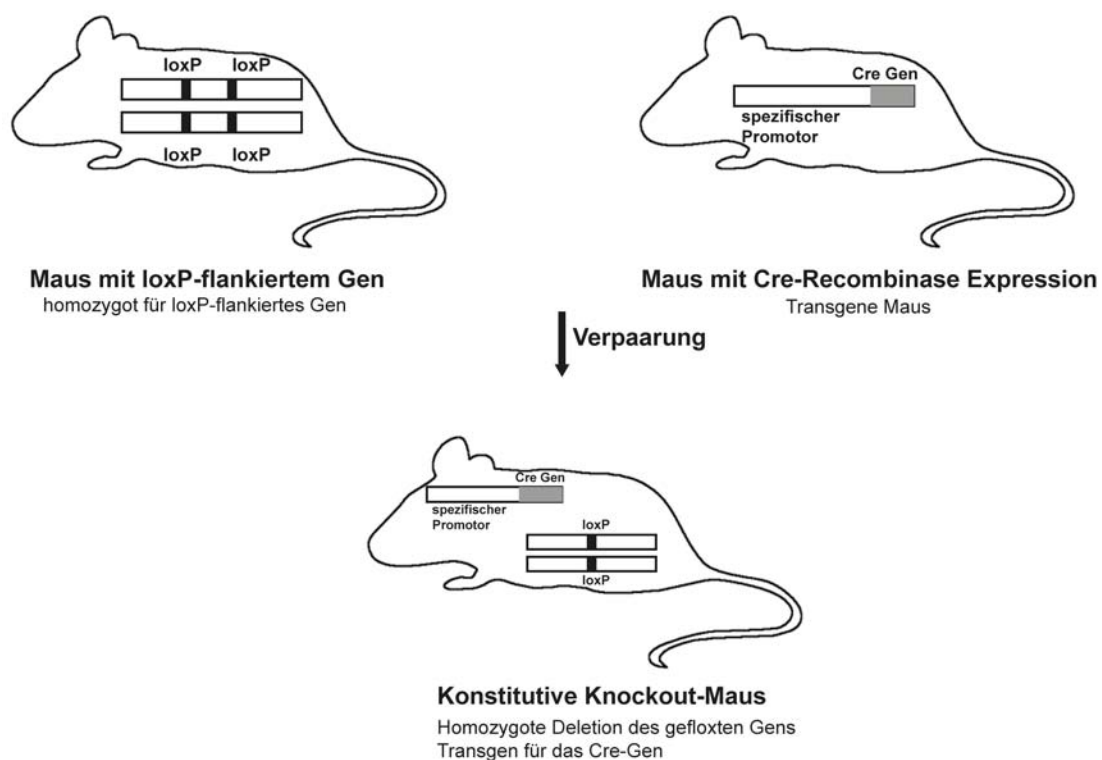
Die Experimente wurden mit 8-10 Wochen alten männlichen Mäusen aus der Tierhaltung des UKE vorgenommen. Die Tierhaltung wurde durch das Fachpersonal der Zentralen Versuchstierhaltung des UKE durchgeführt. Sie erfolgte standardisiert tiergerecht, bei einer RT von 25 °C und unter Verwendung eines artgerechten Hell-Dunkel-Zyklus. Trinkwasser und Futter in Form von Trockenpellets (bis 31.08.2011 V1536-000 sniffR/M-H, Sniff, Deutschland; ab 01.09.2011 Rod16-R LASvendi, Deutschland) war *ad libitum* vorhanden.

Die durchgeführten Tierexperimente wurden behördlich genehmigt (G10/017, G10/51, G10/64) und unter Erteilung einer Ausnahmegenehmigung nach §9 Abs. 1 Satz 4 TierSchG von mir oder Frau Hermann durchgeführt.

Tierzucht

Konstitutive Knockout-Maus - Cre/loxP System

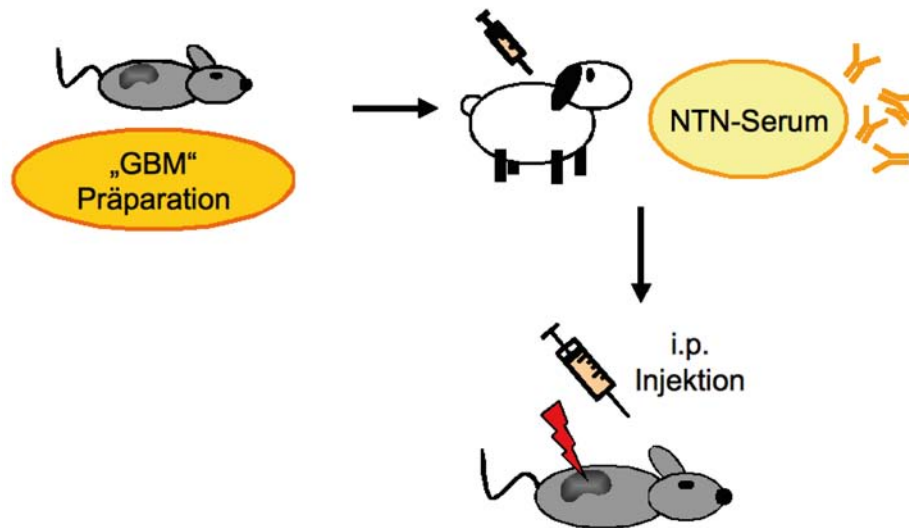
Um die Expression eines Gens zellspezifisch auszuschalten, wurde das Cre/loxP System verwendet. Eine gefloxt Gensequenz wird mittels Cre-Rekombinase herausgeschnitten. Die Rekombinase wird unter einem gewebs- oder zellspezifischen Promotor exprimiert. In dieser Arbeit wurden $\text{Foxp3}^{\text{YFP-Cre}}$ (exprimieren darüber hinaus unter dem Foxp3 Promotor YFP) und CD4^{Cre} Mäuse mit $\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen verpaart, um den zellspezifischen Knockout der IKK2-Kinase in Tregs (Foxp3 Promotor) und T-Zellen (CD4- Promotor) zu untersuchen.



Quelle: modifiziert nach Stricklett, Am J Physiol Renal Physiol 1999, 276:F651-F657

Abbildung 4.10
Schema Cre/loxP System.

4.2.2 Herstellung des NTN-Serums



Quelle: Prof. Dr. Ulf Panzer

Abbildung 4.11

Schema Herstellung NTN-Serum.

Die Herstellung des NTN-Serums erfolgte wie bereits von Assmann et. al. beschrieben [47]. Kurz, es wurden glomeruläre Basalmembranen von Mäusen präpariert und gereinigt. Mit diesem Antigen wurden Schafe (Eurogentec, Belgien) immunisiert. Aus dem Blut der Schafe wurde der Antikörper gegen die GBM in Fällungs- und Dialyseschritte gewonnen.

Induktion der NTN

Für jede Charge des aufgereinigten NTN-Serums wurde eine Dosistestung durchgeführt. Dafür wurden den Mäusen 0,25; 0,5; 0,75 und 1 ml Serum intraperitoneal (ip) gespritzt. Die Mäuse wurden für den Eingriff mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch kurz narkotisiert. Es wurde in den nachfolgenden Experimenten dann mit der NTN-Dosis weitergearbeitet, die nicht letal war; dennoch eine erhöhte Proteinurie und einen glomerulären Schaden verursacht hat.

Applikation des IKK2-Inhibitors CpdA

Der Inhibitor wurde in PBS/10% Cremaphor in einer Dosis von 5 mg/kgKG subkutan alle 48 h verabreicht. Abbildung 4.12 zeigt den experimentellen Aufbau.

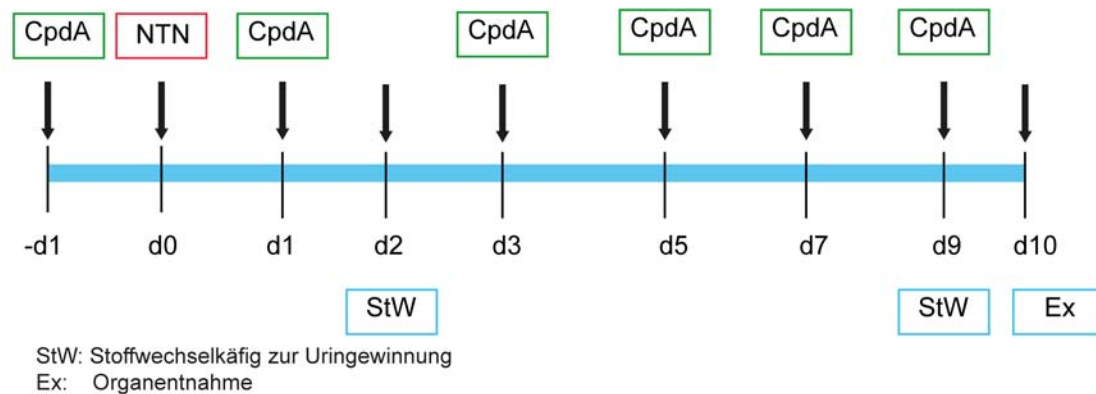


Abbildung 4.12

Versuchsaufbau NTN+CpdA.

Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte an Tag 10 nach Induktion der NTN. Die Tiere wurden mittels Isofluran für den gesamten Eingriff narkotisiert. Die Bauchhöhle wurde mit einem Bauchschnitt geöffnet und Blut wurde mit einer 1 ml Spritze und einer Kanüle (23G, 0,6 mm x 25 mm) aus der Aorta entnommen. Die Nieren wurden freigelegt und herauspräpariert. Die Tiere verstarben während der Blutentnahme. Zur Sicherheit wurde nach Eingriffsende ein Genickbruch durchgeführt. Das Nierenhäutchen wurde entfernt und eine Niere wurde bis zur Weiterverarbeitung für die FACS-Analyse in gekühltem HBSS aufbewahrt. Die zweite Niere wurde gedrittelt und für die Gewinnung von nukleären Proteinen, RNA und für immunohistochemische Untersuchungen verwendet.

Serumgewinnung

Während der Organentnahme gewonnenes Blut wurde in eine Monovette überführt, kräftig geschüttelt und im Anschluss bei 4 °C, 3500 min⁻¹ für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C weggefroren.

Einbettung und Fixierung von Gewebe

Nierendrittelt wurden über Nacht in 4%iger Formalin-Lösung im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag dreimal mit jeweils 4 ml PBS auf einem Wipptisch 10 min lang gewaschen. Die Proben wurden dann für immunohistochemische und histologische Untersuchungen in Histologie-

Kassetten gelegt und bis zur Einbettung in Paraffin in PBS aufbewahrt. Die Einbettung der Proben erfolgte durch Frau Reszka im Histologischen Labor der III. Medizinischen Klinik.

4.2.3 Urin- und Blutdiagnostik

Uringewinnung im Experiment

Zur Kontrolle des Erkrankungsgrads wurde die Proteinurie der Mäuse bestimmt. Urin wurde an den Tagen 2 und 9 nach Krankheitsinduktion gesammelt. Die Tiere wurden hierzu für 4-6 Stunden auf 96-well-Platten gesetzt und mit einer Box abgedeckt (Stoffwechselkäfig). Zugang zu Trinkwasser wurde durch zuvor befüllte wells gewährleistet. Es wurde nur Urin, der nicht mit Trinkwasser verdünnt oder Kot verunreinigt worden war, gesammelt und bei -20°C weggefroren.

Proteinbestimmung im Urin

Eine grobe Proteinbestimmung erfolgte nach jedem Stoffwechselkäfig mittels Multistix. Es wurde ein wenig frischer Urin auf das Proteinfeld des Sticks pipettiert und nach 60 s abgelesen. Es erfolgte folgende Klassifizierung, die auch als Verdünnungsgrundlage für einen Albumin-ELISA diente:

Konzentration Protein	Klassifizierung
<30 mg/dl	Spur
30 mg/dl	+
100 mg/dl	++
300 mg/dl	+++
>2000 mg/dl	++++

Tiere, die an Tag 2 nach NTN-Induktion nicht erkrankt waren (+ oder ++), wurden in dem Experiment nicht weiter berücksichtigt.

Bestimmung der Albumin-Konzentration aus Urin (Albumin- ELISA)

In dieser Arbeit wurde das ELISA-Kit von Bethyl Laboratories verwendet. Die Urinproben wurden anhand des Ergebnisses des Multistix nach folgendem Schema mit Sample Diluent verdünnt.

Klassifizierung	Verdünnungsfaktor
Spur	1:100
+	1:1000
++	1:10000
+++	1:50000
++++	1:200000

Eine 96-well-Platte wurde über Nacht bei 4 °C mit je 100 µl/well Anti-Maus Albumin-Antikörper (1:100 in Coating Puffer) inkubiert. Es wurde dreimal mit 200 µl/well Waschpuffer gewaschen, mit 150 µl/well Postcoat Puffer für 30 min bei RT inkubiert und erneut gewaschen.

Die Proben und eine Standardreihe mit Mausalbumin wurden in folgenden Konzentrationen auf die Platte pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Von jeder Probe wurde eine Doppelwertbestimmung gemacht und der Mittelwert für die Konzentrationsberechnung verwendet.

Standard Nr.	Albuminkonzentration (ng/ml)	Albuminstandard	Sample Diluent
S0	10000	2 µl Stocklösung	198 µl
S1	1000	100 µl S0	900 µl
S2	500	300 µl S1	300 µl
S3	250	300 µl S2	300 µl
S4	125	300 µl S3	300 µl
S5	62,5	300 µl S4	300 µl
S6	31,25	300 µl S5	300 µl
S7	15,625	300 µl S6	300 µl
S8	7,8	300 µl S7	300 µl

Nach fünfmaligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer wurden 100 µl/well einer 1:40000 Verdünnung des HRP-konjugierten Sekundär-Antikörpers in Sample Diluent hinzupipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Um nicht gebundenes Albumin zu entfernen wurde 5 mal mit 200 µl/well Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine Farbreaktion mit Enzym-Substrat-Lösung (1:1) für 15 min im Dunkeln, welche dann mit 2 mol/l Schwefelsäure (100 µl/well) abgestoppt wurde. Die Mikrotiterplatte wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm vermessen.

Bestimmung Harnstoff (Serum) und Kreatinin (Serum / Urin)

Es wurden jeweils 110 µl Serum oder Urin in Probengefäße gefüllt. Bei nicht ausreichender Probenmenge wurde 1:1 mit Aqua ad iniectabilia verdünnt. Die Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen wurden im Zentrallabor des UKE bestimmt.

4.2.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

EMSA ist eine Methode zur Detektion von Bindungen zwischen Proteinen und DNA. Im Falle dieser Arbeit wurde die Bindung von NF-κB aus nukleären Proteinextrakten der Niere an radioaktiv markierte NF-κB-spezifische DNA-Fragmente nachgewiesen. Hieraus konnte eine NF-κB-Aktivierung in den jeweiligen Nierenextrakten gezeigt werden.

Isolation nukleärer Proteine

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und Zentrifugationen bei 4 °C und 13 000 min⁻¹. Ein Nierendrittel wurde in hypotonem Puffer A mittels eines Homogenisators zerkleinert. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 15 min auf Eis stehen gelassen. 100 µl 10%iges NP40 wurden hinzugefügt, kurz gemischt und im Anschluss für 30 Sekunden zentrifugiert.

Der Überstand enthält die zytoplasmatischen Proteine und wurde abpipetiert. Das Pellet wurde in 200 µl hypertonem Puffer B aufgenommen, resuspendiert und 20 min lang auf einem Rotor im Kühlraum inkubiert. Im Anschluss wurde 5 min zentrifugiert und der Überstand in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

Herstellung Acrylamid-Gel

Die nukleären Proteine wurden mit dem radioaktiv markierten DNA-Fragment inkubiert und auf folgendem Acrylamid-Gel aufgetrennt:

4%iges Polyacrylamid-Gel

3,315 g Glycerol	
76,95 g Aqua ad iniectabilia	
10,5 ml 10x TBE	
14 ml 30 % Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (29:1)	(AppliChem, Deutschland)
787,5 µl 10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung	(Roth, Deutschland)
87,45 µl TEMED	(SIGMA, Deutschland)

Markierung der DNA-Probe (NF-κB-Consensus Oligonucleotide) mit ^{32}P -γ dATP

Ein Mastermix bestehend aus:

6 µl NF-κB consensus oligonucleotide (~10 pmol)	(Promega, USA)
2 µl 10x PNK Puffer A	(Fermentas, Deutschland)
1 µl T4 Polynucleotidkinase	(Fermentas, Deutschland)
8,5 µl Aqua ad iniectabilia	(Braun, Deutschland)
2,5 µl ^{32}P -γ dATP	

wurde 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Eine Inaktivierung des Enzyms erfolgte anschließend 10 min lang bei 70 °C. Der Mastermix wurde aufgereinigt, damit rein radioaktiv markierte NF- κ B-binding-sites vorlagen und unmarkierte Fragmente entfernt wurden. Dafür wurde der Mastermix auf 50 μ l mit Aqua ad iniectabilia aufgefüllt, auf eine Purifikationssäule (illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns, GE Healthcare) gegeben und bei 3000 min⁻¹ 2 min zentrifugiert. Die Radioaktivität wurde mittels β -Counter in Rotiszint Lösung bestimmt. Pro Probe wurden 100.000 cpm ³²P in folgenden Ansatz gegeben:

Shift-Mix-Ansatz

- 2,0 μ l Poly(dI-dC)
- 4 μ l 5x Binding Buffer
- 1 μ l 10x Loading Buffer
- Ad 18 μ l Aqua ad iniectabilia

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Als Standard wurde BSA gelöst in Buffer B in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Standard Nr.	Proteinkonzentration
S1	10 mg/ml
S2	5 mg/ml
S3	2,5 mg/ml
S4	1,25 mg/ml
S5	0,63 mg/ml

5 μ l Probe und Standard wurden in Doppelbestimmung auf eine 96-well-Platte pipettiert und 25 μ l eines Gemisches aus Reagenz A und Substanz S (1 ml+20 μ l; BioRad DC Protein Assay) hinzugegeben. Es wurden 200 μ l Reagenz B hinzupipettiert und 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt.

Zu 30 μ g der jeweiligen Probe wurden 18 μ l des Shift-Mix hinzupipettiert, 30 min bei RT inkubiert und anschließend auf das Gel geladen, welches 30 min bei 200 V und danach 2 h bei 250 V lief. Das Gel wurde über Nacht getrocknet und dann 7 Tage bei -80 °C in einer Filmkassette belichtet und anschließend entwickelt (AGFA Curix 60).

4.2.5 Molekularbiologische Methoden

Isolation RNA

Bei dieser Methode erfolgten alle Zentrifugationsschritte bei $10\,000\text{ min}^{-1}$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ein Nierendrittel wurde in einem Reaktionsgefäß mit $200\text{ }\mu\text{l}$ Trizol homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren $800\text{ }\mu\text{l}$ Trizol wurde die Probe geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Es wurden $200\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform hinzugegeben und die Probe wurde mindestens 15 s lang gemischt, 3 min bei RT inkubiert und 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und $500\text{ }\mu\text{l}$ Isopropanol hinzugegeben, gemixt und für 30 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 15 min wurde das entstandene Pellet dreimal mit $500\text{ }\mu\text{l}$ 80%igem Ethanol gewaschen. Die gewonnene RNA wurde in 80 % Ethanol bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren.

Aufreinigung RNA

Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA II Mini Kit nach Anleitung des Herstellers. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei RT und $11\,000\text{ min}^{-1}$. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 80%igem Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge 5 min lang getrocknet. Nach Zugabe von $50\text{ }\mu\text{l}$ DEPC-Wasser wurde 30 min auf Eis inkubiert. Das Pellet wurde mit $300\text{ }\mu\text{l}$ RA1 Puffer und $3\text{ }\mu\text{l}$ β -ME versetzt und gemischt. Anschließend wurden $350\text{ }\mu\text{l}$ 70%iger Ethanol hinzugegeben und die Lösung auf eine NucleoSpin® RNA Filter Säule pipettiert und herunterzentrifugiert. Die RNA war nun in der Säule gebunden und wurde durch die Zugabe von $350\text{ }\mu\text{l}$ MDB Puffer und einer weiteren einminütigen Zentrifugation entsalzt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation mit $10\text{ }\mu\text{l}$ rDNase gelöst in $90\text{ }\mu\text{l}$ RNase Puffer, um membrangebundene genomische DNA zu entfernen. Es wurde mit $200\text{ }\mu\text{l}$ RA2 Puffer, $600\text{ }\mu\text{l}$ RA3 Puffer und zuletzt mit $250\text{ }\mu\text{l}$ RA3 Puffer gewaschen. Die RNA wurde nun mit $50\text{ }\mu\text{l}$ RNase freiem Wasser eluiert. Für anschließende Arbeiten wurde die RNA bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren.

Reverse Transkription

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 320 nm bestimmt und 400 ng RNA wurden für die Transkription in cDNA mit folgendem Reaktionsgemisch eingesetzt,

Einfacher Ansatz Reaktionsgemisch I

2 µl Hex Primer (100 ng/µl, Invitrogen)

2 µl dNTPs (10 mmol/l gesamt)

16 µl H₂O

Es wurde für 5 min bei 65 °C erhitzt und mit dem Reaktionsgemisch II versetzt:

Einfacher Ansatz Reaktionsgemisch II

8 µl 5xPuffer + DTT (Invitrogen)

6 µl RNase out (Invitrogen)

2 µl MMLV-Reverse Transkriptase (Invitrogen)

Es folgte eine Inkubation nach dem Protokoll:

10 min bei 25 °C

60 min bei 42 °C

10 min bei 70 °C

cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei –20 °C maximal 14 Tage gelagert.

Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Mittels der qRT-PCR lässt sich die Expression zu untersuchender mRNA bestimmen.

Die Methode beruht auf dem Prinzip der PCR und vervielfältigt die aus den Proben gewonnene cDNA. Eine Quantifizierung findet über die Fluoreszenz-Messung des eingebauten DNA-inkalierenden Farbstoffs SYBR-Green statt, der proportional zur cDNA-Menge eingebaut wird. In dieser Arbeit wurde die intrarenale Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Chemokine untersucht.

Einfacher qPCR Ansatz

1,25 µl Forward Primer (0,9 mmol/l)

1,25 µl Reverse Primer (0,9 mmol/l)

2,25 µl H₂O

6,25 µl SYBR Green

1,5 µl cDNA

Es wurden 11 µl des qPCR-Ansatzes und 1,5 µl cDNA eingesetzt. Als Housekeeping-Gen wurde 18S rRNA verwendet. Die cDNA wurde für die Expressionsbestimmung von 18S 1:500 verdünnt. Die Proben wurden in Doppelbestimmungen auf eine 96-well-Platte pipettiert und in 40 Zyklen folgendem qPCR-Programm unterzogen:

1. Aktivierung der Polymerase	95 °C	10 min
2. Denaturierung	95 °C	15 s
3. Elongation	60 °C	1 min
4. Denaturierung	95 °C	15 s
5. Schmelzkurve	60 °C	1 min
	95 °C	15 s

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software StepOne™ v2.0 durch die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Der CT-Wert (auch threshold) gibt den Wert an, bei dem die Fluoreszenz des eingebauten SYBR-Green Farbstoffs erstmalig signifikant ansteigt. Je kleiner ein CT-Wert, desto höher ist das betreffende Gen exprimiert. Aus der Doppelwertbestimmung wurde der Mittelwert der CT-Werte gebildet und von dem Mittelwert des CT-Werts des Housekeeping-Gens 18S subtrahiert (ΔCT). Das Housekeeping-Gen wurde durch die experimentellen Interventionen nicht reguliert und konnte somit als interner Standard genutzt werden. Im Anschluss wurde vom ΔCT -Wert der Kontrollgruppe der ΔCT -Wert der Vergleichsgruppe subtrahiert ($\Delta\Delta\text{CT}$). Der erhaltene Wert gibt an ob ein Gen im Vergleich zur Kontrolle höher oder niedriger exprimiert wird.

4.2.6 Immunhistochemische Methoden**Deparaffinierung der Schnitte**

Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde für histologische Untersuchungen in 0,5 µm dünne Schnitte mittels Mikrotom und für immunohistologische Färbungen in 1,5 µm bis 2 µm dünne Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden für die weiteren Färbungen deparaffiniert. Sie wurden zunächst über Nacht bei 40 °C im Ofen ausgebacken, abgekühlt mit einem hydrophoben Stift

(DAKO Pen) umrandet. Die Schnitte wurden dreimal für 5 min in Xylol getaucht und das Xylol wurde anschließend durch das Eintauchen in eine Ethanolreihe absteigender Konzentration entfernt. Jeder Waschschrift erfolgte dreimal für 5 min in folgenden Konzentrationen: 100 %, 95 % und 75 % Ethanol in Aqua dest. Zuletzt wurden die Schnitte dreimal 5 min lang in Aqua dest. gewaschen.

PAS-Färbung (Periodic Acid Schiff)

Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden für 15 min in 1%ige Perjodsäure getaucht und 3 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Es folgte ein Waschschrift mit Aqua dest. und eine 50-minütige Inkubation in Schiff'schen Reagenz. Anschließend wurde fuchsin-schweflige Säure durch einen 7-minütigen Waschschrift mit warmem fließendem Leitungswasser entfernt und es wurde mit Aqua dest. nachgespült. Es folgte eine Kernfärbung nach Böhmer durch eine 12-minütige Inkubation mit Hämatoxylin-Lösung. Im Anschluss wurde 3 min mit fließendem Leitungswasser gewaschen. Um eine Kontrasterhöhung zu erzielen wurde mit 1N HCl in Ethanol differenziert. Die Schnitte wurden zur Konservierung durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 90 % und 100 %) geführt und mit Deckgläsern in Eukit (O. Kindler) eingedeckelt.

Glomeruläre Schädigung

Die glomeruläre Schädigung wurde mikroskopisch bestimmt. Ein geschädigtes Glomerulum weist eine vermehrte Ablagerung von PAS positivem Material auf. Hierbei handelt es sich um Proteininfiltrate und Kollagenablagerungen. Die glomeruläre Struktur löst sich auf und das Glomerulum wird zellärmer. Epithelzellen der Bowman-Kapsel können hin zum Glomerulum proliferieren und einen Halbmond bilden. Es wurden 50 Glomeruli pro Tier auf Halbmondbildung untersucht.

Immunhistochemische Färbungen

Vor der Inkubation mit dem spezifischen Antikörper wurden die Antigene, welche durch die Formalinfixierung verändert worden sind, demaskiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde das Gewebe für 5 min mit Blocking-Puffer (CytoChem Kit) getaucht. Es folgte eine Primärantikörper-Inkubation über Nacht bei 4 °C. Nach erneutem Waschen wurde 30 min entweder mit einem Brückenantikörper oder direkt mit dem Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Nach Waschen unter fließendem Wasser wurde 10 min mit Neufuchsin-Lösung inkubiert.

Es folgte eine Kernfärbung nach Böhmer und ein Differenzierungsschritt mit HCl-Alkohol, um überschüssige Farbpigmente der Kernfärbung zu entfernen. Die gefärbten Schnitte wurden mit Gummi arabicum-Lösung eingedeckt. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Demaskierungsmethoden und Antikörper:

Färbung	Demaskierung	Primärantikörper	Brückenantikörper	Sekundärantikörper
CD3	DAKO Puffer	Rabbit anti-mouse	X	Anti-rabbit AP Komplex
F4/80	Trypsin, 10 min Brutschrank 37 °C	Rat anti-mouse	Rabbit anti-rat	
Foxp3	Citrat Citronensäure Puffer 680W Mikrowelle 35 min	Rat anti-mouse	Rabbit anti-rat	
SlgG	Proteinase 24 Verdau, 15 min Brutschrank 37 °C	Rabbit anti-mouse	X	

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden von Frau Hermann im Histologielabor der III. Medizinischen Klinik durchgeführt.

Quantifizierung der Immunhistochemie

Pro Tier wurden für die CD3- und F4/80-Färbung bei 400-facher Vergrößerung 20 Gesichtsfelder (high power field hpf) ausgezählt. Für die Foxp3-Färbung wurden 8 Gesichtsfelder (low power field lpf) bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

4.2.7 Immunbiologische Methoden

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS = **F**luorescence **A**ntibody **C**ell **S**orter) erlaubt es Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Lichtstreuung morphologisch zu beschreiben und mittels der Detektion von Oberflächenantigenen zu identifizieren. Nach Isolation der Zellen aus ihrem Herkunftsorgan werden diese mit spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenantigene gefärbt. Diese Antikörper sind an Fluorochrome gebunden, die Licht bestimmter Wellenlängen emittieren. Für die Analyse im FACS müssen die Zellen als Einzelzellsuspension vorliegen. Jede einzelne Zelle wird in einem Flüssigkeitsstrahl an einem Laser vorbeigeführt, wodurch es zur Lichtstreuung kommt. Die Lichtstreuung wird von der Zellgröße und intrazellulären Bestandtei-

len bestimmt, was auf die Morphologie der Zelle schließen lässt.

Oberflächenantigene auf der Zelle, die mit fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert sind, werden über die Fluoreszenz des Farbstoffs detektiert und ermöglichen somit eine Charakterisierung der Zelle.

Einzelzellsuspensionen aus Milzen

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1200 min^{-1} , 8°C und 7 min lang. Milzen wurden fettfrei präpariert und mittels Skalpell mechanisch zerkleinert. Das Gewebe wurde mit einem Spritzenstempel durch ein $70 \mu\text{m}$ Sieb gestrichen; dabei wurde mit 15 ml HBSS nachgespült. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet aufgeklopft.

Es folgte eine 8-minütige Erythrozytenlyse mit einem Puffergemisch 1:10 aus 160 mmol/l NH_4Cl : 170 mmol/l Tris/HCl bei RT. Die Lyse wurde mit 5 ml HBSS gestoppt und es folgte ein Zentrifugationsschritt. Das lysierte Pellet wurde in 5 ml HBSS resuspendiert und über ein $40 \mu\text{m}$ Sieb gegeben. Das Sieb wurde mit HBSS nachgespült. Nach einer Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml PBS/10 % FCS aufgenommen.

Einzelzellsuspensionen aus Nieren

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C und 1200 min^{-1} . Es wurde von jedem Tier eine Niere für die Einzelzellsuspension eingesetzt. Nach Entfernen des Nierenhäutchens wurde die Niere mit einem Skalpell zerkleinert und in Digestionsmedium mit $8 \mu\text{g/ml}$ Collagenase D und 400 ng/ml DNase für 40 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das Gewebe wurde mittels eines Spritzenstempels zuerst durch ein $70 \mu\text{m}$ und anschließend durch ein $40 \mu\text{m}$ Sieb gedrückt. Hierbei wurde reichlich mit HBSS nachgespült. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt wurde eine Erythrozytenlyse für 5 min bei 4°C durchgeführt. Diese wurde mit 10 ml kaltem PBS gestoppt. Nach erneuter Zentrifugation von 10 min wurde das Homogenat in 5 ml kaltem PBS resuspendiert und für 15 min in den Kühlschrank gestellt. Zellreste setzten sich in der Zeit ab und im Überstand konnte dann die Leukozytenfraktion abpipettiert werden. Zur Erhöhung der Reinheit wurde die Fraktion nochmals durch ein $40 \mu\text{m}$ Sieb gegeben, welches mit PBS/10 % FCS nachgespült wurde. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und dort gefärbt.

Färbung für FACS-Analysen

4 Mio. Milzzellen oder die Einzelzellsuspension einer Niere wurden mit PBS gewaschen. Es wurde jeweils 1 µl Antikörper in den Rücklauf pipettiert und 30 min bei 4 °C gefärbt. Im Anschluss wurde zweimal mit 1 ml Cellwash gewaschen und in PBS aufgenommen und am FACS Gerät vermessen.

Für eine intranukleäre/intrazelluläre Färbung wurden die Zellen in FixPerm (1T Fixation Concentrate / 3T Fixation Diluent)/Cytoperm aufgenommen und bei 4 °C 30 min fixiert. Anschließend wurde zweimal mit Permeabilisationspuffer/PermWash gewaschen, 1 µl Antikörper wurde in den Rücklauf pipettiert und 30 min bei 4 °C gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit Permeabilisationspuffer/PermWash wurde in PBS aufgenommen und am FACS-Gerät vermessen.

Zellspezifische Isolationsmethoden

Anhand dieser Methoden können einzelne Zellpopulationen aus einem Organ isoliert werden. Ausgangsmaterial beider Methoden ist eine Einzelzellsuspension. Der Reinheitsgrad beträgt 85 % bis 95 %.

Eine mögliche Isolationsmethode war die Sortierung der Zellen mittels FACS-Sorter. Einzelzellsuspensionen wurden nach dem Protokoll Färbung für FACS-Analysen angefärbt. Die Zellen wurden nach der Fluoreszenz der Antikörper sortiert. Das FACS-Sortieren wurde in der FACS Sorting Core Unit des UKE mit dem FACS Aria III durchgeführt.

Eine Alternative waren Zellseparationssysteme.

Die Isolation regulatorischer T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen erfolgte nach dem Protokoll CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit mouse des Herstellers Miltenyi Biotec. Das System arbeitet mit magnetischen Säulen. Einzelzellsuspensionen wurden gefärbt und mit sogenannten Microbeads (magnetisches Markieren) versetzt. Mit Microbeads markierte Zellen wurden in der Säule zurückgehalten.

CD4⁺ T-Zellen wurden durch Negativselektion gewonnen: alle nicht CD4⁺ T-Zellen wurden mit einem Biotin-Antibody-Cocktail und Anti-Biotin-Microbeads inkubiert. CD4⁺ T-Zellen blieben somit ungefärbt und konnten im Eluat aufgefangen werden.

Die Isolation CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen erfolgte im ersten Schritt identisch zur CD4⁺ Isolation. Es schloss sich eine Positivselektion an: CD4⁺ CD25⁺ Zellen wurden angefärbt (CD25 PE) und mit Anti-PE-Microbeads versetzt. Sie verblieben auf der Säule und wurden mit einem Stempel nach Abfließen des Eluats herausgedrückt.

PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)/Ionomycin-Stimulation

Die Einzelzellsuspension einer Niere wurde zentrifugiert und in jeweils 1 ml X-Vivo (+1 µl 50 mmol/l β-ME) aufgenommen und mit 0,05 µg/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin für 30 min im Brutschrank inkubiert. Durch diese Stimulanzen wurden die Zellen rezeptorunabhängig und antigen-unspezifisch stimuliert. Es folgt eine Produktion der Zytokine IL-17 und IFN-γ, welche die Th17- und Th1-Antwort im Endorgan beschreiben. Durch die 4-stündige Inkubation mit Brefeldin A wurden die Zytokine im endoplasmatischen Retikulum angereichert und nicht ins Medium sezerniert. Die Zellen wurden mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen und mit 7 µl Maus-Serum 15 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte eine Oberflächen- und intrazelluläre Färbung für IFN-γ und IL-17. Nach einem Waschschrift wurde in PBS am FACS-Gerät gemessen.

Schema der FACS- Messung aus Nieren und Milz-Einzelzellsuspensionen

Die Auswertung der FACS-Messung erfolgte nach folgendem Schema:

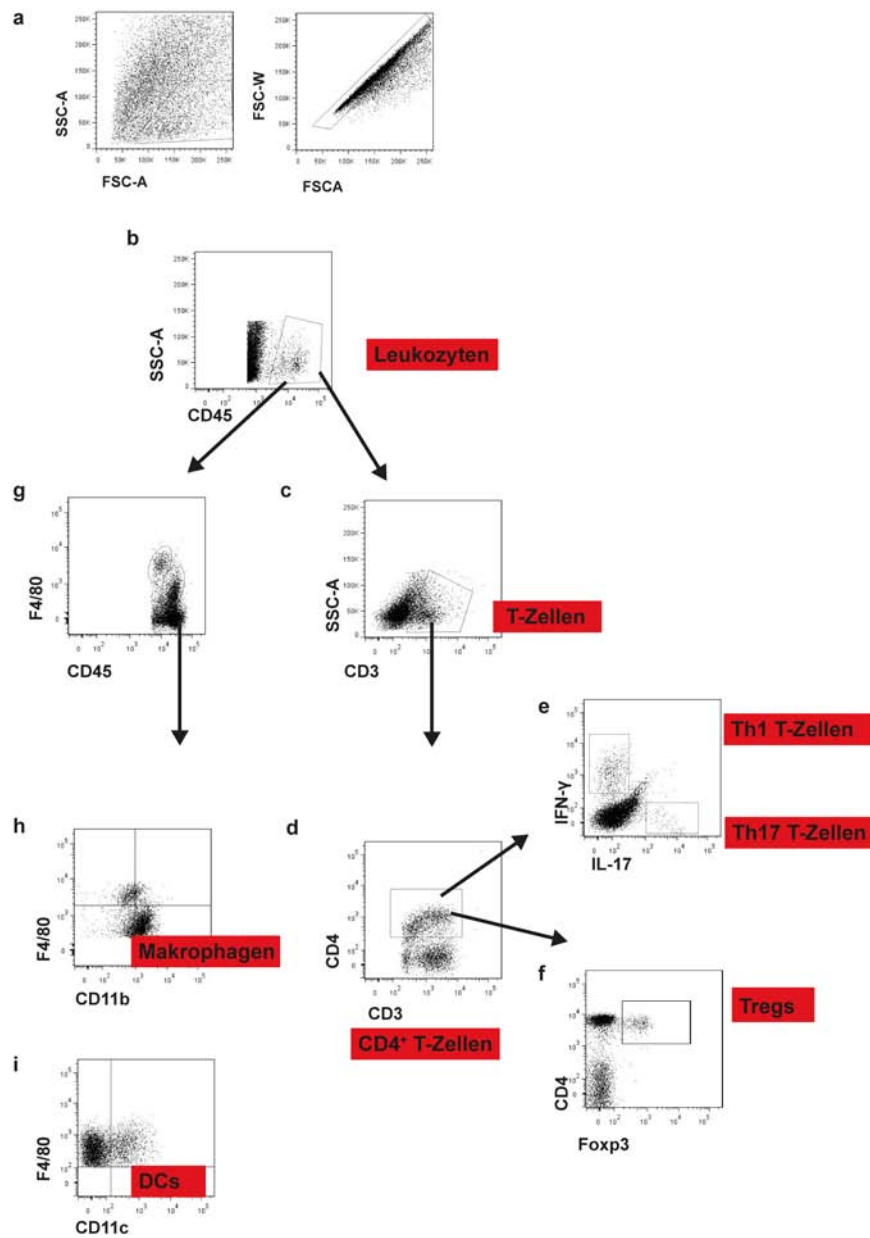


Abbildung 4.13

Gating-Strategie für FACS-Analysen.

Nach Ausschluss aller Nicht-Leukozyten und Dubletten (a) wurden alle Leukozyten durch ihre Expression von CD45 dargestellt (b). Eine Einteilung der T-Zellen erfolgte nach CD3 (c); welche dann in CD4⁺ T-Helferzellen unterteilt wurden (d). Die CD4-Population wurde weiterhin unterschieden in IFN- γ -produzierende Th1-Zellen und IL-17-produzierende Th17-Zellen (e). Regulatorische T-Zellen (Tregs) wurden durch die Expression ihres Transkriptionsfaktors Foxp3 abgetrennt (f). Makrophagen wurden durch die Koexpression von F4/80 intermediate und CD11b⁺ bestimmt (h). Dendritische Zellen exprimieren den spezifischen Marker CD11c und in geringen Mengen F4/80. Sie wurden als F4/80 intermediate und CD11c⁺ definiert (i).

Suppressionsassay

Hierbei wurde die Suppressionsfähigkeit von regulatorischen T-Zellen (Tregs) auf Responder T-Zellen (Tresp) in-vitro untersucht. Eine round-bottom 96-well-Platte wurde über Nacht im Kühlschrank mit 0,5 μ g/ml α CD3-Antikörper in PBS inkubiert. Splenozyten wurden mit CD4-PE gefärbt und anschließend FACS-gesortet. Tregs der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}Maus sind CD4⁺YFP⁺ und können gut von Tresp, welche nur CD4⁺ sind abgetrennt werden. Alternativ wurde über MACS-Säulen zellspezifisch aufgereinigt. Die Zellen wurden in Basismedium +1 μ g/ml α CD28 (Biozol Diagnostica) suspendiert. Pro well wurden Tresp:Treg im Verhältnis 2:1 eingesetzt und für 3 Tage bei 37 °C, 5 %CO₂ kultiviert. Aus dem Überstand wurde die IL-2 Konzentration mittels ELISA gemessen. IL-2 wird von Tresp produziert und die IL-2 Ausschüttung wird durch die suppressierenden Eigenschaften der Tregs gedrosselt. Tregs allein sind anerg und produzieren dieses Zytokin in-vitro nicht.

In-vivo Treg-Proliferation

Dieser Versuch prüft die Überlebensfähigkeit von Tregs im Organismus. Es wurden Einzelzell-suspensionen aus Milzen 7 Tage alter Foxp3^{YFP-Cre}IKK2^{fl/fl} Mäuse und Foxp3^{Cre} Mäuse hergestellt. Die Milzen wurden hier gepoolt, da 7 Tage alte Tiere nur eine geringe Treg-Frequenz haben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Proliferationsfarbstoff markiert (CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit, Invitrogen). Die Anzahl der Tregs pro Probe wurde mittels APC-Beads per Durchflusszytometrie bestimmt und mit PBS als Lösungsmittel auf die limitierende Zellzahl eingestellt. Es wurde eine definierte Treg Zahl intravenös in RAG1^{-/-} Mäuse gespritzt. RAG1^{-/-} Mäuse besitzen keine B- und T-Zellen. Nach 7 Tagen wurde die Proliferation der Tregs ebenfalls mittels Durchflusszytometrie anhand des Proliferationsfarbstoffs bestimmt.

Tregs aus $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ Tieren wurden als Kontrolle gespritzt. Dieser Versuch wurde im Institut für experimentelle Immunologie in Bonn durchgeführt.

4.2.8 Phänotypische Untersuchungen an der $\text{Foxp3}^{\text{YFP-Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus

Die Phänotypcharakterisierung der $\text{Foxp3}^{\text{YFP-Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus fand zu den Zeitpunkten 3, 7 und >14 Tage statt, wobei >14 Tage den Zeitpunkt beschreibt, wann der Phänotyp bei einem Individuum aufgetreten ist. $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ Tiere des gleichen Alters dienten als Kontrolle. Die Experimente wurden behördlich genehmigt (G10/064).

4.2.9 Statistik

Es wurden Mittelwerte $\pm$ SEM aller statistischer Daten angegeben. Die Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student'schen T-Test ermittelt. Die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers erster Art wurde mit $\alpha=0,05$ angenommen. Die Signifikanzen für Ergebnisse des Suppressionsassays wurden mittels einfaktoriellem ANOVA-Test berechnet. Das Signifikanzniveau wurde bei beiden Verfahren auf $p = 0,05$ festgesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Systemische NF- κ B-Hemmung in der NTN

5.1.1 NTN mit CpdA-Behandlung

In diesen einführenden Experimenten sollte der Einfluss einer durchgängigen, vor NTN-Induktion beginnenden, Behandlung mit dem IKK2-Inhibitor CpdA, untersucht werden. Der experimentelle Aufbau wurde in 4.2.1 beschrieben. Alle Experimente wurden mit NTN-Serum einer Charge durchgeführt. In diesem Fall wurden 0,4 ml ip appliziert. Für diese Experimente wurden C57BL6 WT-Tiere aus der Eigenzucht des UKE verwendet. Kontrolltiere werden folgend als „Kon“, mit CpdA behandelte als „NTN+CpdA“ und nephritische Tiere ohne Intervention als „NTN“ abgekürzt. Soweit nicht anders angegeben, handelt es sich um 3 voneinander unabhängige Experimente. Eine alleinige CpdA-Applikation hatte keine pathogene Wirkung auf die Niere (Daten nicht gezeigt).

Krankheitsinduktion

Die Albumin/Kreatinin-Ratio an Tag 2 nach Induktion der Erkrankung lag in der NTN+CpdA-Gruppe bei $445,10 \pm 57,54$ (n=15) und in der NTN-Gruppe bei $402,80 \pm 56,39$ (n=19). Somit war kein Unterschied in der initialen Erkrankung zwischen den beiden Gruppen festzustellen. Ein weiterer Parameter für eine Krankheitsinduktion ist der Nachweis der direkten Bindung des Anti-GBM-Antikörpers in der Niere. Hierfür wurde eine Schaf-IgG-Färbung an Tag 2 nach NTN angefertigt. Sie zeigte die spezifische Bindung des Schaf-IgGs entlang der glomerulären Basalmembran. In der Literatur spricht man hier von einem „eingepflanzten Antigen“ [48], welches dann die autologe Phase der NTN auslöst. Im Interstitium war keine Schaf-IgG-Bindung ersichtlich.

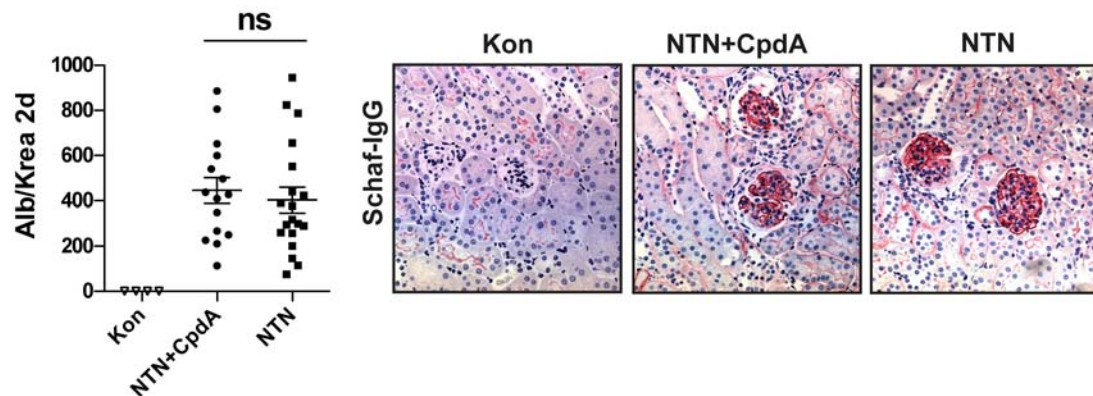


Abbildung 5.14

Induktion der NTN.

Links: Albumin/Kreatinin-Ratio an Tag 2 nach NTN in Kon, NTN+CpdA und NTN-Tieren. Rechts: Exemplarische Schaf-IgG-Immunhistochemie der Niere an Tag 2 nach NTN (200-fach vergrößert).

Renale NF- κ B-Hemmung

Die Wirkung des CpdA wurde indirekt über die renale Aktivierung von NF- κ B nachgewiesen. Die Abbildung zeigt einen EMSA aus nukleären Proteinen, die aus Nieren von Kon, NTN+CpdA und NTN-Tieren isoliert wurden. In Kon und NTN+CpdA-Tieren war keine NF- κ B-Aktivierung nachweisbar, wohingegen NTN-Tiere an Tag 10 nach Krankheitsinduktion eine deutliche NF- κ B-Aktivierung aufwiesen.

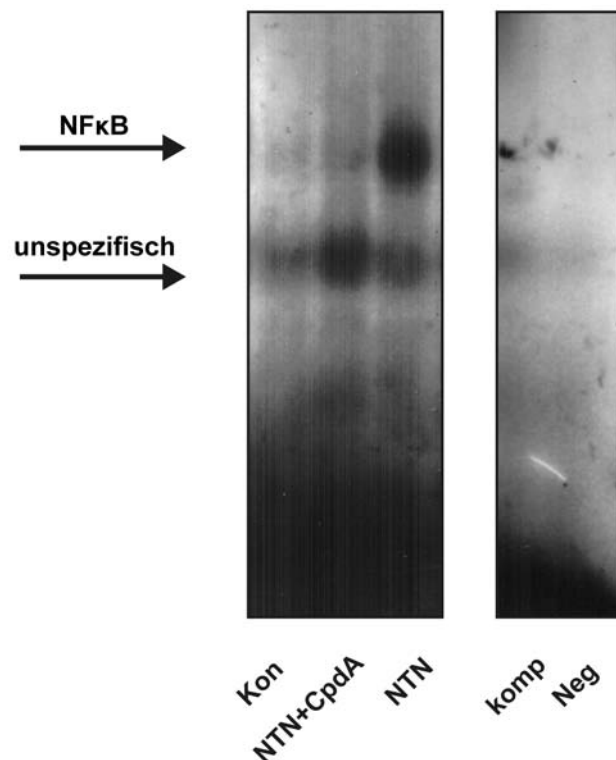


Abbildung 5.15

NF- κ B-Hemmung durch CpdA.

Der Graph zeigt einen exemplarischen EMSA für NF- κ B aus Nieren von Kon, NTN+CpdA und NTN-Tieren. Die Spezifität der Banden ist durch die Probe „komp“ gezeigt. Es wurde eine NTN-Probe zusätzlich mit 10-facher Menge unmarkierter NF- κ B-Oligoconsensus-site inkubiert und aufgetragen.

Glomerulärer Schaden und Nierenfunktion

NTN-Tiere, die mit CpdA behandelt wurden, wiesen einen geringeren glomerulären Schaden in Form von Halbmondbildung auf. Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant ($p=0,056$). Unbehandelte Tiere wiesen im Schnitt $12 \pm 1\%$ ($n=15$) Halbmonde pro Paraffinschnitt auf, wohingegen CpdA-behandelte Tiere $7 \pm 1\%$ ($n=18$) Halbmonde zeigten. Kontrolltiere zeigten erwartungsgemäß keine Halbmonde ($n=9$). Abb. 5.16 zeigt exemplarisch die Beschaffenheit der Glomeruli im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Eine Halbmondbildung ging in beiden NTN-Gruppen mit einer Zerstörung des glomerulären Tafts einher.

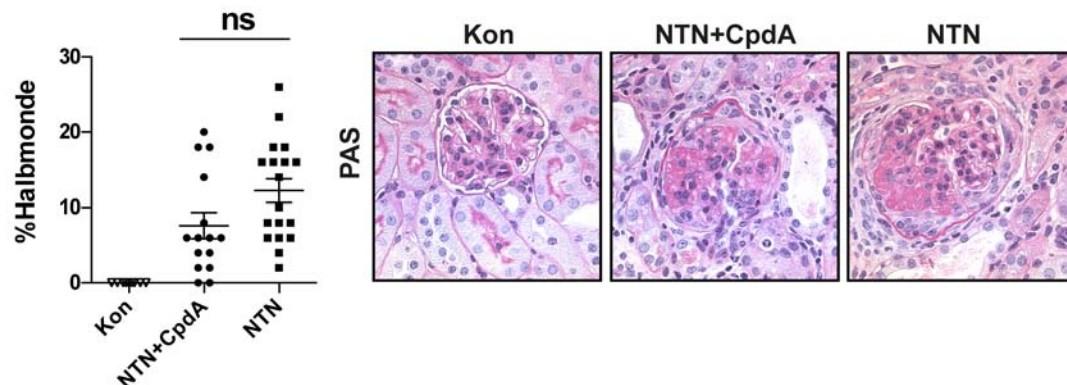


Abbildung 5.16

Glomerulärer Schaden.

Links: Der Graph zeigt die glomeruläre Halbmondbildung 10 Tage nach NTN in Kon, NTN+CpdA und NTN-Tieren. Rechts: Exemplarische PAS-Färbung der Glomeruli 10 Tag nach NTN (400-fach vergrößert).

Die Albumin/Kreatinin-Ratio als Maß für die Nierenfunktion zeigte an Tag 10 in CpdA-behandelten Tieren $18,36 \pm 3,42$ ($n=13$) und in der NTN-Gruppe $10,45 \pm 1,51$ ($n=18$). Dieser Unterschied war signifikant mit $p=0,0271$. In Bezug auf die Serum-Harnstoff-Konzentration zeigte sich nahezu kein Unterschied in den beiden nephritischen Gruppen. CpdA-behandelte Tiere wiesen $26,67 \pm 1,60$ mg/dl ($n=15$) und unbehandelte Tiere $29,06 \pm 1,10$ mg/dl ($n=18$) Harnstoff auf.

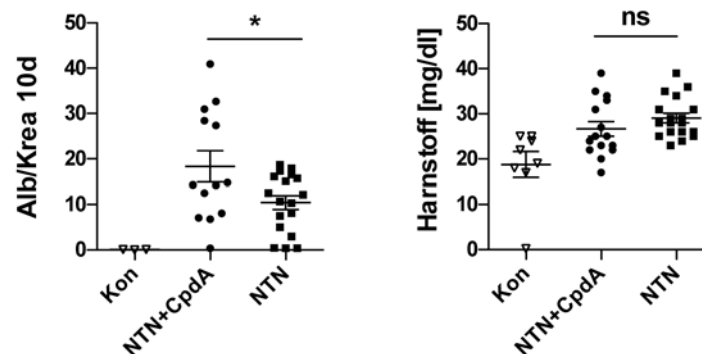


Abbildung 5.17

Nierenfunktion.

Links: Albumin/Kreatinin-Ratio an Tag 10 nach NTN in Kon, NTN+CpdA und NTN-Tieren. Rechts: Serum-Harnstoff-Konzentration der Tiere an Tag 10 nach NTN.

Die intrarenale Expression von Zytokinen wurde mit $n=14$ pro Versuchsgruppe durchgeführt. IL-1 β und TNF- α wurden ausgewählt, da sie NF- κ B-Zielgene sind [49] [50]. Das Chemokin CCL20 fördert die Chemotaxis von Th17-Zellen [51]. Alle Angaben geben die x-fache Erhöhung in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle an. Die TNF- α -mRNA-Expression war in der

CpdA+NTN-Gruppe $1,80 \pm 0,87$ und in der NTN-Gruppe $1,05 \pm 1,40$ erhöht. IL-1 β war in den CpdA-behandelten Tieren $4,17 \pm 1,56$ erhöht; in der NTN-Gruppe $2,48 \pm 0,53$. Das Chemokin CCL20 war in der NTN+CpdA-Gruppe $11,08 \pm 4,40$ und in der NTN-Gruppe um $5,14 \pm 0,77$ erhöht. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war für kein Zytokin signifikant.

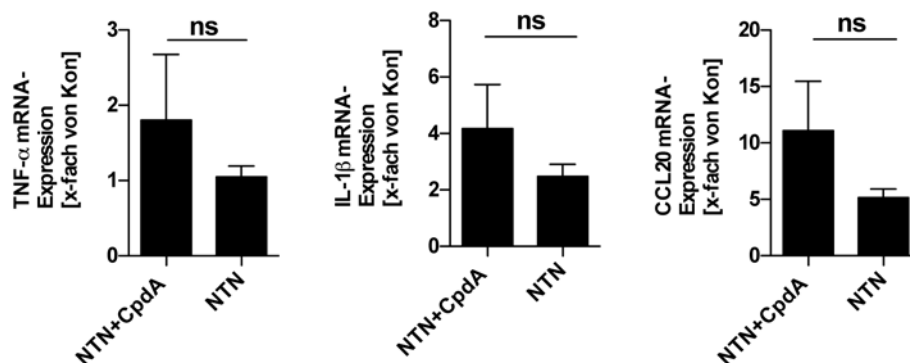


Abbildung 5.18

Expression proinflammatorischer Zytokine.

mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 β und CCL 20 10Tage nach NTN in NTN+CpdA und NTN-Tieren. Das Expressionslevel wurde in Bezug auf die nicht-nephritische Kontrolle berechnet und 18S wurde als interner Standard genutzt.

Infiltration von Immunzellen in die Niere

In der NTN spielen Immunzellen der adaptiven Immunantwort eine große Rolle. In der autologen Phase der Erkrankung beginnt die spezifische Immunantwort gegen das Schaf-IgG. Es kommt zur Infiltration von T-Zellen, die Mechanismen induzieren, welche maßgeblich an der glomerulären Schädigung beteiligt sind [20]. In diesen Experimenten sollte der Effekt der systemischen NF- κ B-Hemmung auf das Infiltrationsverhalten von Makrophagen, als auch T-Zellen untersucht werden.

Die lichtmikroskopische Auszählung von CD3⁺ T-Zellen ergab keinen Unterschied zwischen den CpdA-behandelten und nicht behandelten Tieren ($p = 0,2785$). Pro Gesichtsfeld waren durchschnittlich $33,19 \pm 4,78$ ($n=15$) CD3⁺ T-Zellen in der CpdA-behandelten Gruppe und $41,91 \pm 6,20$ ($n=16$) in der NTN-Gruppe vorhanden.

Unter der Behandlung mit CpdA infiltrierten tendenziell weniger CD4⁺ T-Zellen/ 10^3 T-Zellen in die nephritische Niere ein, als bei NTN-Tieren ($p = 0,31$). $4,3 \pm 0,7\%$ der T-Zellpopulation bestanden aus CD4⁺ T-Zellen in Nieren von NTN+CpdA-Tieren ($n=14$), wohingegen es $5,6 \pm 0,9\%$ in der NTN-Gruppe waren ($n=18$). Kontrolltiere wiesen $3,8 \pm 0,6\%$ CD4⁺ T-Zellen auf ($n=7$).

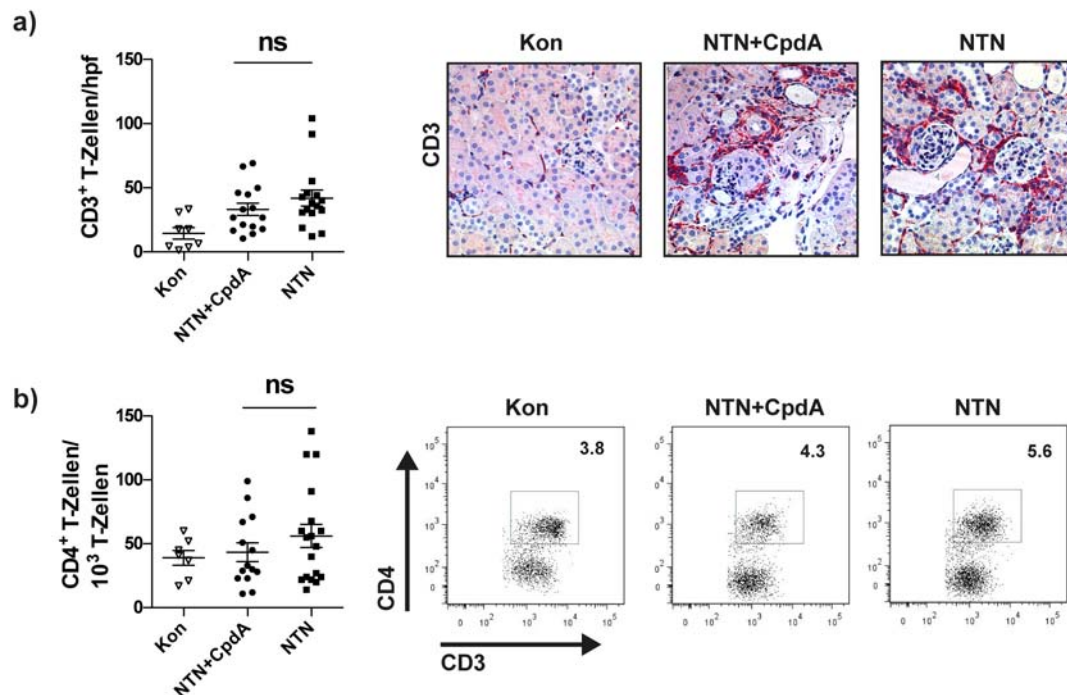


Abbildung 5.19

(a) Infiltration von CD3⁺ T-Zellen. Links: Lichtmikroskopische Auszählung CD3-positiver T-Zellen. Rechts: Exemplarische CD3 Immunhistochemie der Niere 10 Tage nach NTN (200-fach vergrößert).

(b) Infiltration von CD4⁺ T-Zellen. Links: Graphische Darstellung der infiltrierten CD4⁺ T-Zellen pro 10³ CD3⁺ T-Zellen. Rechts: Exemplarische Darstellung der CD4⁺ T-Zellen im Dot Plot gated auf CD3. Prozentangaben geben den durchschnittlichen Anteil CD4⁺ T-Zellen in der CD3⁺ Population an.

CD4⁺ T-Zellen können in proinflammatorische Th1- und Th17-Zellen, sowie protektive regulatorische T-Zellen (Tregs) unterschieden werden. Aus diesem Grund wurde die CD4⁺ Population auf ihre Subtypen hin untersucht. Die durchflusszytometrische Untersuchung der Th1-Antwort zeigte, dass die Infiltration von Th1-Zellen in nephritischen Mäusen gegenüber den Kontrollen (n=6) erhöht ist. Jedoch besteht innerhalb der NTN-Gruppen kein signifikanter Unterschied (p=0,86). CpdA behandelte NTN-Tiere (n=13) und nichtbehandelte NTN-Tiere (n=14) wiesen beide $0,50 \pm 0,05$ % Th1-Zellen innerhalb der CD4⁺-Population auf. In CpdA-behandelten Tieren ist jedoch die Th17-Antwort signifikant abgeschwächt (p=0,029). Sie zeigten $1,8 \pm 0,3$ % (n=13) Th17-Zellen, wohingegen NTN-Tiere $3,8 \pm 0,8$ % (n=14) Th17-Zellen innerhalb des CD4⁺ T-Zellpools aufwiesen.

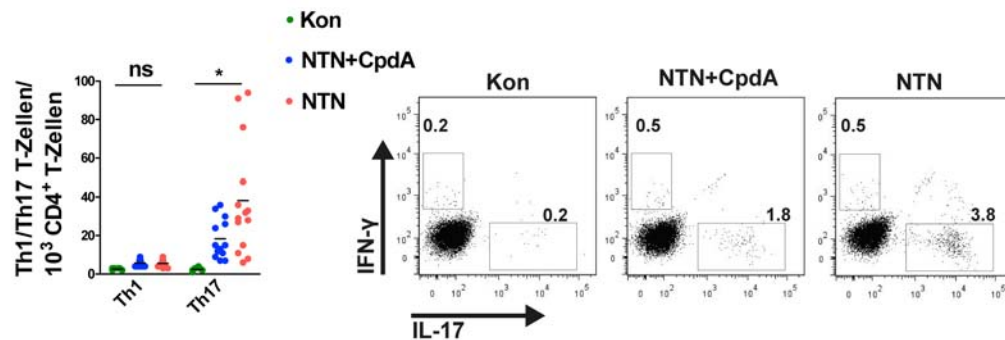


Abbildung 5.20

IFN-γ- und IL-17-Antwort in der Niere.

Links: Graphische Darstellung der infiltrierten Th1- und Th17-Zellen pro 10³ CD4⁺ T-Zellen. Rechts: Exemplarische PMA/Ionomycin-Stimulation aus Einzelzellsuspensionen der Niere. Die Plots sind gated auf CD4⁺ T-Zellen. Prozentangaben geben den durchschnittlichen Anteil IFN-γ⁺ und IL-17⁺ Zellen in der CD4⁺ Population an.

Die CpdA-Behandlung wirkte sich ebenso auf die protektive T-Zellpopulation aus. Tregs wurden sowohl immunhistologisch als auch durchflusszytometrisch untersucht. Die lichtmikroskopische Auszählung der immunhistologischen Färbung für Foxp3 ergab $3,10 \pm 0,52$ (n=15) Tregs pro Gesichtsfeld in der NTN+CpdA-Gruppe und $6,85 \pm 0,90$ (n=18) Tregs in der NTN-Gruppe. Dieser Unterschied war mit $p=0,0017$ signifikant. Kontrolltiere wiesen maximal 3 Tregs pro Paraffinschnitt auf; pro Gesichtsfeld waren das $0,13 \pm 0,07$ (n=8) Tregs. Die durchflusszytometrische Analyse ergab in CpdA-behandelten Tieren eine signifikante Erniedrigung der Tregs ($p=0,0012$) gegenüber den NTN-Tieren; durchschnittlich $3,0 \pm 0,2\%$ (n=12) der CD4⁺ T-Zellen in NTN+CpdA zu $5,1 \pm 0,5\%$ (n=14) in NTN.

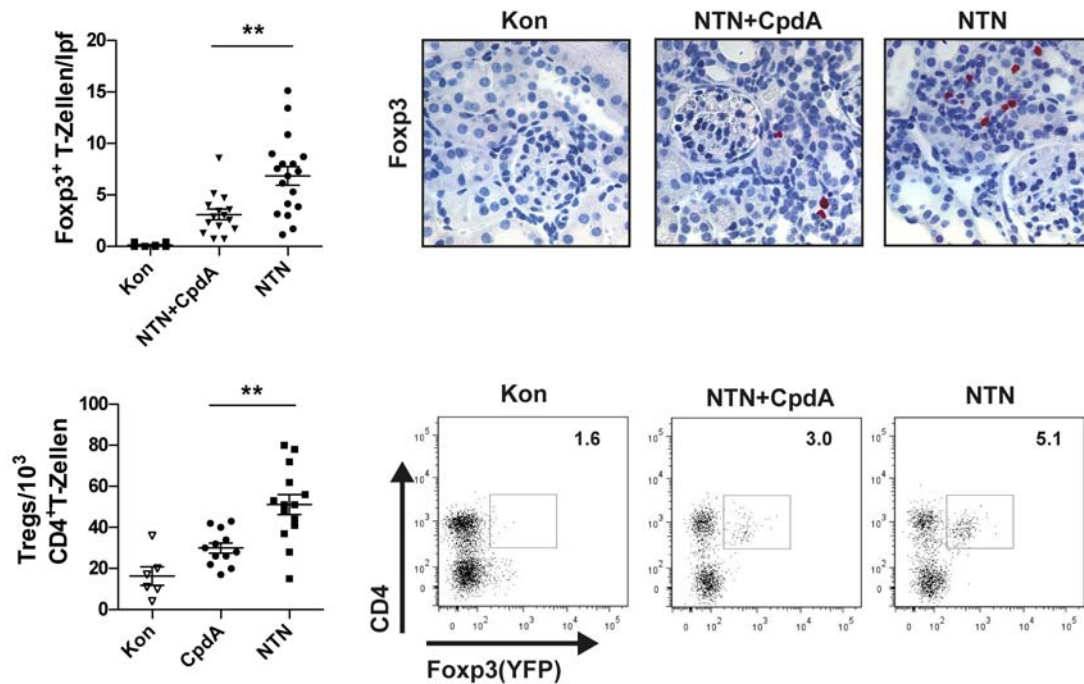


Abbildung 5.21

Infiltration von Tregs.

Oben links: Lichtmikroskopische Auszählung Foxp3-positiver Zellen. Oben rechts: Exemplarische Foxp3-Immunhistochemie der Niere 10 Tage nach NTN (400-fach vergrößert). Unten links: Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Treg-Auswertung. Unten rechts: Exemplarische Darstellung der Tregs im Dot-Plot gated auf CD3. Prozentangaben geben den durchschnittlichen Anteil von Tregs in der CD4⁺ Population an.

In einem weiteren Schritt wurde die Funktionalität der CpdA-behandelten Tregs mittels in-vitro-Suppressionsassay geprüft. Der Test ergab keinerlei Einschränkung in der Suppressorfunktion der Tregs aus Tieren, die während der NTN mit CpdA behandelt wurden. Sie konnten die IL-2-Produktion von Responderzellen aus Kontrolltieren signifikant auf $16,35 \pm 1,30\%$ ($p < 0,001$) herabsenken. Responderzellen der NTN+CpdA-Tiere konnten $93,30 \pm 21,18\%$ der IL-2-Konzentration der Kontroll-Responderzellen erreichen. NTN-Tiere zeigten $89,59 \pm 22,06\%$. Die Suppression durch NTN-Tregs konnte die IL-2-Konzentration auf $80,80 \pm 21,59\%$ senken und durch Kontroll-Tregs auf $38,63 \pm 14,52\%$ ($p=0,0193$).

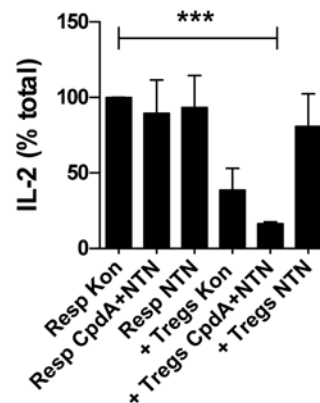


Abbildung 5.22

Suppressionsfähigkeit CpdA-behandelter Tregs.

In-vitro-Suppressionsassays wurden aus Responderzellen und Tregs von Kon, NTN+CpdA und NTN-Mäusen durchgeführt. Es wurde die IL-2-Konzentration im Überstand der Kokultur gemessen.

Die Immunhistochemie der Makrophagen ergab eine signifikant erniedrigte Infiltration der Makrophagen in der NTN+CpdA-Gruppe ($p = 0,0282$), wobei CpdA-behandelte Tiere $34,33 \pm 5,50$ ($n=15$) und NTN-Tiere $50,39 \pm 4,30$ ($n=17$) pro Gesichtsfeld aufwiesen. Kontrolltiere zeigten $9,5 \pm 1,7$ ($n=8$) Makrophagen. In der FACS-Auswertung wurden Makrophagen als F4/80 intermediate und CD11b⁺ definiert. Es ist aufgefallen, dass F4/80 high Makrophagen deutlich weniger des spezifischen Makrophagenmarkers CD11b exprimieren. F4/80 intermediate Makrophagen hingegen zeigten eine hohe Expression von CD11b. Die FACS-Analyse der Makrophagen konnte nur in einem Experiment durchgeführt werden und ergab ebenfalls eine signifikante Reduktion der Makrophagen in der NTN+CpdA-Gruppe verglichen mit der NTN-Gruppe ($p = 0,0012$). Pro 10^5 Leukozyten wiesen Kontrolltiere 5116 ± 37 ($n=2$), CpdA-behandelte Tiere 5751 ± 179 ($n=5$) und NTN-Tiere 7344 ± 269 ($n=7$) Makrophagen auf.

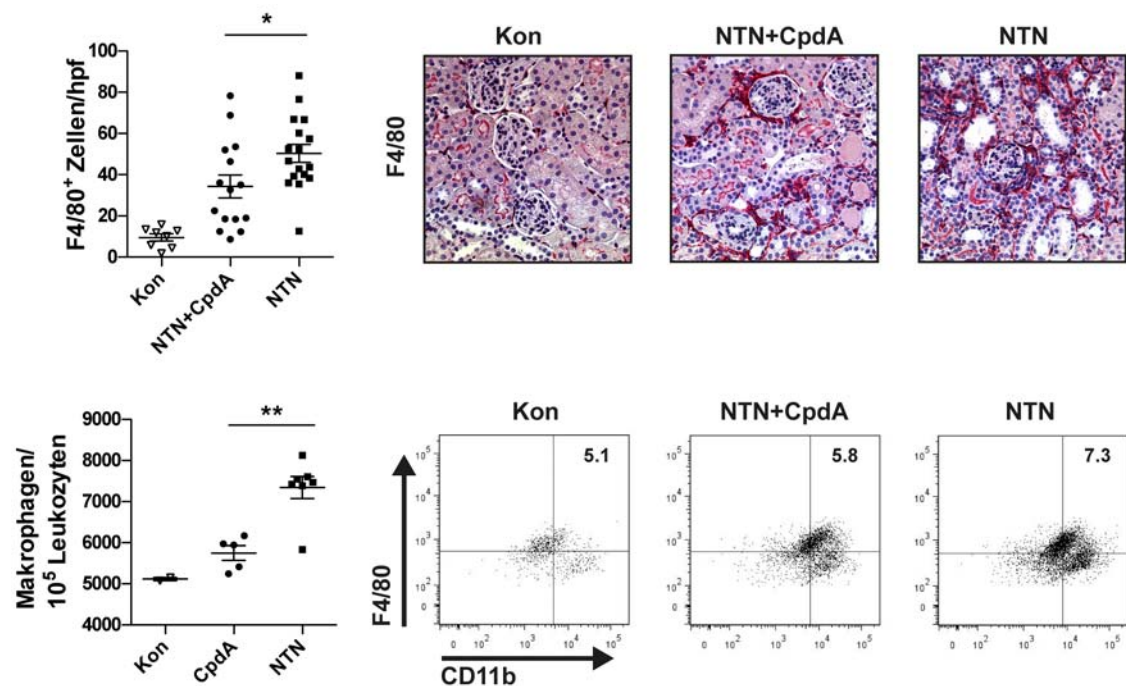


Abbildung 5.23

Infiltration von Makrophagen.

Oben links: Lichtmikroskopische Auszählung F4/80-positiver Zellen. Oben rechts: Exemplarische F4/80-Immunhistochemie der Niere 10 Tage nach NTN (200-fach vergrößert). Unten links: Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Makrophagen-Auswertung. Unten rechts: Exemplarische Darstellung der Makrophagen gated auf F4/80. Prozentangaben geben den durchschnittlichen Anteil von Makrophagen in der CD45⁺ Population an.

Da der Effekt der CpdA-Behandlung den größten Einfluss auf Tregs zeigte, war nun der nächste Schritt zellspezifisch IKK2 in Tregs auszuschalten. Hierfür wurde die *Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}* Maus generiert; in der ein Verlauf der NTN mit IKK2-defizienten Tregs untersucht werden sollte.

5.2 Treg-spezifische IKK2-Deletion

5.2.1 Phänotyp der $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus

Durch das Kreuzen einer $\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus mit einer $\text{Foxp3}^{\text{YFP-Cre}}$ Maus konnte ein zellspezifischer Knockout der IKK2 unter Kontrolle des Foxp3-Promotors erzielt werden. Der Foxp3-Promotor ist spezifisch für regulatorische T-Zellen (Tregs). Diese Mauslinie hat demzufolge IKK2-defiziente Tregs ab dem Zeitpunkt zu dem der Foxp3-Promotor aktiv wird. Im Ursprungsorgan der Tregs, dem Thymus, geschieht dies ab Tag 3 nach der Geburt [52]. Eine Besonderheit der $\text{Foxp3}^{\text{YFP-Cre}}$ Maus ist, dass sie die Cre-Rekombinase als Fusionsprotein mit Yellow Fluorescent Protein (YFP) exprimiert. Tregs dieser Maus können somit durch die YFP-Expression identifiziert werden. Im weiteren Teil dieser Arbeit wird diese Mauslinie als $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ geführt.

Die Tiere zeigten das spontane Auftreten eines Scurfy-Phänotyps. Die Scurfy Maus trägt eine Mutation im Foxp3-Gen und entwickelt spontan eine lymphoproliferative Autoimmunerkrankung [33]. Diese Entwicklung konnte bei der $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus ebenfalls beobachtet werden; die Mäuse erreichten nicht das Alter von 8 Wochen. Aus diesem Grund konnte keine NTN in diesen Tieren induziert werden, jedoch wurde die Bedeutung der IKK2 für Tregs genauer untersucht. Abb. 5.24(a) zeigt das Ergebnis einer Genotypisierung der $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus. Tiere, die homozygot waren für $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ (cre/cre) und $\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ (fl/fl) entwickelten einen Phänotyp ähnlich der Scurfy Maus. Die phänotypischen Veränderungen traten nicht bei heterozygoten Geschwistern auf.

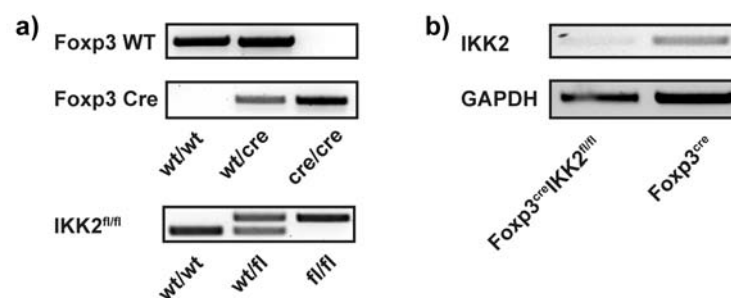


Abbildung 5.24

(a) Genotypisierung für $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ und $\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$.

$\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ Genotypisierung von wt (wt/wt), heterozygoten (wt/cre) und homozygoten (cre/cre) Tieren. Genotypisierung für $\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ zeigt wt (wt/wt), heterozygote (wt/fl) und homozygote (fl/fl) Tiere.

(b) Expression der IKK2 in Tregs von $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ und $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ Tieren.

Aus Milzeinzelzellsuspensionen wurden je 10.000 Tregs gesortet. Aus diesen Zellen wurde RNA isoliert, in cDNA transkribiert und mittels PCR auf die Expression von IKK2 geprüft. GAPDH wurde als interne Kontrolle verwendet.

In Abb. 5.24(b) ist gezeigt, dass die IKK2 in $CD4^+Foxp3(YFP)^+$ T-Zellen der $Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Maus nicht exprimiert wurde. Die ersten Anzeichen für das Auftreten der Erkrankung traten spontan zwischen Tag 12-27 nach der Geburt auf. Die Tiere wiesen eine gekrümmte Körperhaltung und reduzierte Mobilität auf. Ihre Haut war schuppig; die Ohren waren geschwollen und der Schwanz wies wulstartige Ringe auf, wie in Abb. 5.25 zu erkennen ist.

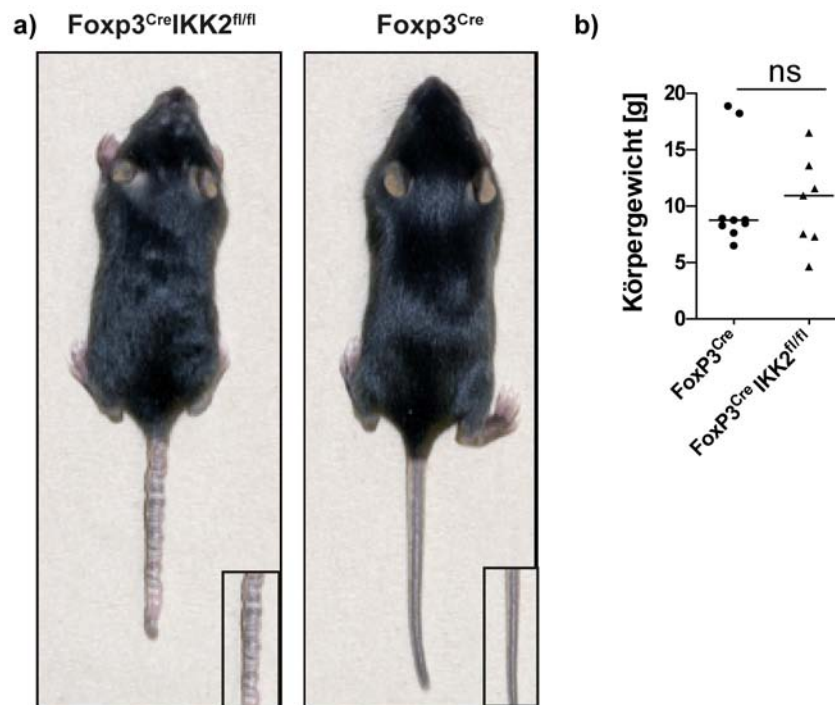


Abbildung 5.25

(a) Phänotyp der $Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Maus.

Phänotypische Veränderungen bei >14 d alten $Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Mäusen im Vergleich zur $Foxp3^{Cre}$ Maus des gleichen Alters.

(b) Körpergewicht der $Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Maus.

Darstellung des Körpergewichts der $Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ und $Foxp3^{Cre}$ Maus an >14 d. Balken zeigt den Median.

Abb. 5.26 zeigt, dass die Tiere eine ausgeprägte Splenomegalie und vergrößerte Lymphknoten im Vergleich zur $Foxp3^{Cre}$ Maus aufwiesen. Das Körpergewicht der erkrankten Tiere unterschied sich nicht vom Körpergewicht der $Foxp3^{Cre}$ Maus. Die $Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Maus wies ein mittleres Körpergewicht von $10,25 \pm 1,50$ g ($n=7$) und die $Foxp3^{Cre}$ Maus ein von $10,87 \pm 1,50$ g ($n=9$) auf ($p=0,89$). Das mittlere Milzgewicht der betroffenen Mäuse war bis zu 5 mal höher als das der Kontrolltiere: $0,48 \pm 0,30$ g zu $0,09 \pm 0,01$ g (je $n=9$) in $Foxp3^{Cre}$. Dieser Unterschied war signifikant ($p=0,0468$).

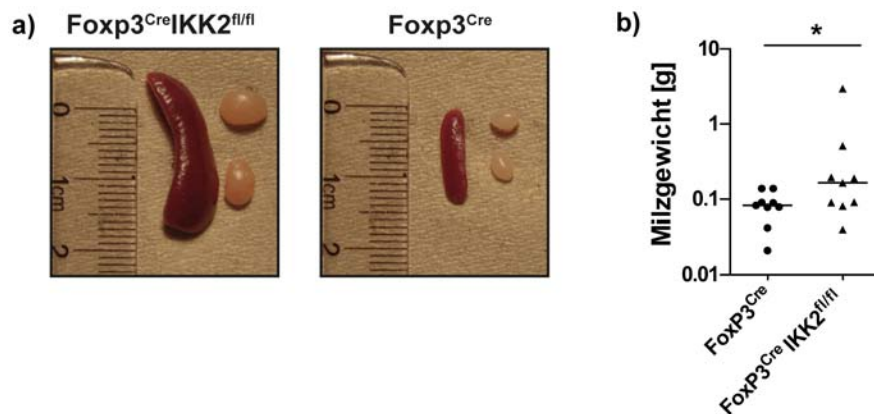


Abbildung 5.26

(a) Milz und Lymphknoten der *Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}* Maus.

Beide lymphatischen Organe sind zum Zeitpunkt des Auftretens des Phänotyps dargestellt.

(b) Milzgewicht der *Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}* Maus.

Logarithmische Darstellung des Milzgewichts der *Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}* und *Foxp3^{Cre}* Maus an >14 d. Balken zeigt den Median.

5.2.2 Histologische Untersuchungen der *Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}* Maus

Histologische Untersuchungen zum Zeitpunkt >14 d von Milz, Leber und Lunge zeigten eine gestörte Gewebestruktur und zahlreiche mononukleäre Infiltrate. In der Leber waren an Tag >14 Infiltrate in den Portalfeldern zu sehen. In der Niere fanden sich keine histologischen Veränderungen im Vergleich zur Kontrollmaus. Die oben genannten Veränderungen wurden am Tag der Geburt noch nicht festgestellt. Für weitere Untersuchungen wurden der Thymus als primär lymphatisches, die Milz als sekundär lymphatisches, sowie die Lunge als peripheres Organ gewählt.

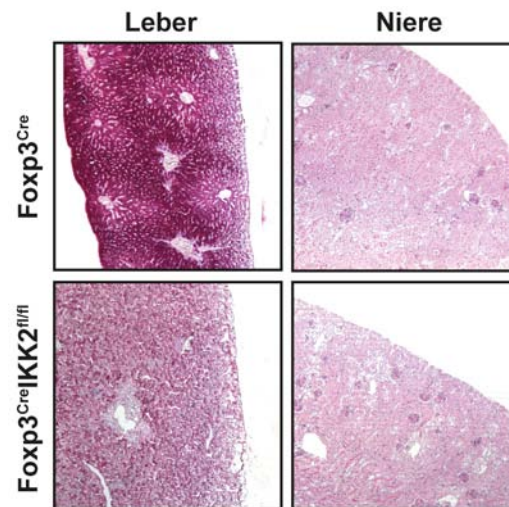


Abbildung 5.27

PAS-Färbung von Leber und Niere.

Färbung zum Zeitpunkt >14d der Foxp3CreIKK2fl/fl und Foxp3Cre Maus (50fach vergrößert).

Die strukturelle Entwicklung des Thymus der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus im Zeitraum 3 d bis zum Auftreten des Phänotyps unterschied sich nicht zur Foxp3^{Cre} Maus. Die Milz zeigte eine fehlerhafte Gewebeorganisation auf, beginnend zwischen Tag 7 und 14. An Tag 7 sah man in der Foxp3^{Cre} Maus eine erste strukturelle Organisation der Milz in rote und weiße Pulpa. Zu diesem Zeitpunkt zeigte die Milz der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus ein „Ineinanderfließen“ der weißen und roten Pulpa, welches auch bis zum Auftreten des Phänotyps unverändert blieb. Darüber hinaus fanden sich mehr Bereiche mit extramedullärer Hämatopoese und eine erhöhte Anzahl an Megakaryozyten als in den Kontrollmäusen. Bei Foxp3^{Cre} Tieren älter als 14 d sah man eine klare Abgrenzung von weißer und roter Pulpa. Die Reifung der Lunge der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus war im Beobachtungszeitraum nicht unterschiedlich zur Foxp3^{Cre} Maus. Es zeigten sich keine Auffälligkeiten bezüglich der Gewebearchitektur.

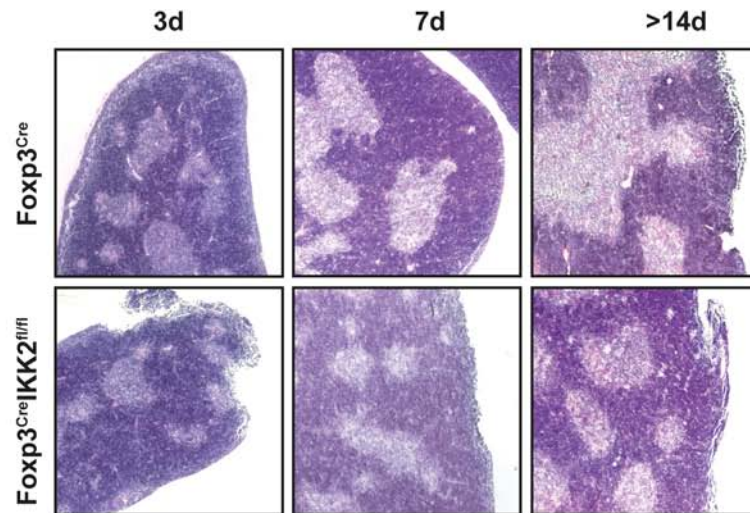
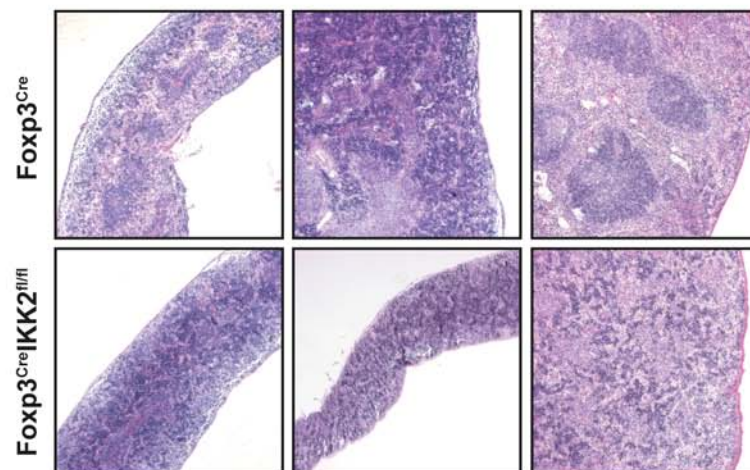
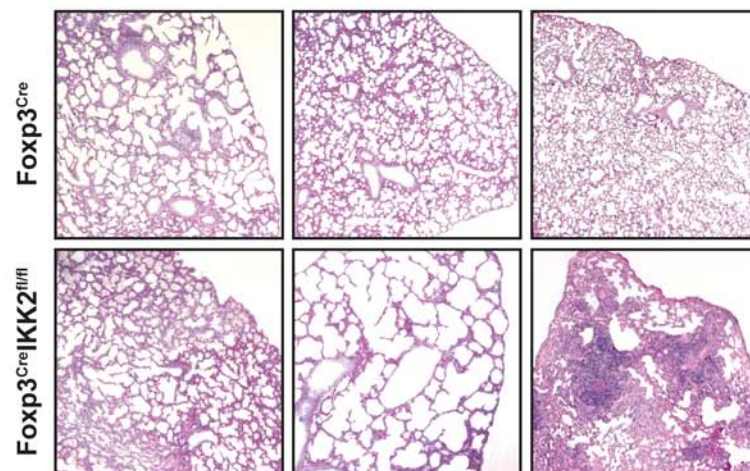
Thymus**Milz****Lunge**

Abbildung 5.28

PAS-Färbung von Thymus, Milz und Lunge zu verschiedenen Zeitpunkten.Färbung der ausgewählten Organe einer Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} und Foxp3^{Cre} Maus an Tag 3, 7 und >14 (50fach vergrößert).

Ab Auftreten des Phänotyps kam es zu peribronchialen und perivaskulären Infiltraten. Diese Infiltrate bestanden aus T-Zellen und Makrophagen.

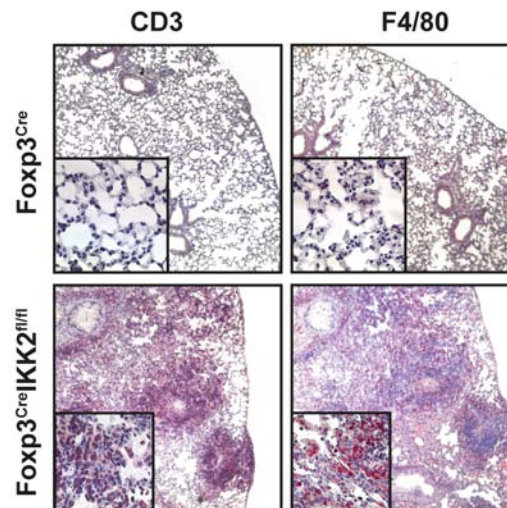


Abbildung 5.29

Infiltrate in der Lunge der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus.

CD3- und F4/80-Immunhistochemie der Lunge zum Zeitpunkt >14 d der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} und Foxp3^{Cre} Maus (50 und 400fach vergrößert).

5.2.3 Expression von Foxp3⁺ T-Zellen in lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen

Thymus, Milz und Lunge wurden nach der histologischen Untersuchung auf ihre Treg-Frequenz untersucht. Es wurde eine Oberflächenfärbung für CD4 gemacht und Foxp3 wurde über die YFP-Cre-Expression dargestellt. Alle FACS-Plots sind gated auf CD3⁺ T-Zellen und jeweils exemplarisch für 3 unabhängige Experimente. Alle prozentualen Angaben in diesem Experiment geben den durchschnittlichen Anteil der Tregs im CD4⁺ Pool an.

Die immunhistochemische Färbung für Foxp3 im Thymus von Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen zeigte im Beobachtungszeitraum keinen Unterschied in der Besiedlung und Anzahl der Tregs im Vergleich zur Foxp3^{Cre} Maus. Eine quantitative Analyse mittels FACS zeigte vergleichbare Frequenzen von Tregs im Thymus beider Tierlinien an Tag 7 ($p=0,48$). Foxp3^{Cre} Tiere wiesen durchschnittlich $2,0 \pm 0,2\%$ Tregs ($n=4$) und Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Tiere $1,3 \pm 0,8\%$ ($n=3$) Tregs auf. Zum Zeitpunkt der vollständigen Ausprägung des Phänotyps waren keine Veränderungen der Treg-Frequenz im Thymus der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus verglichen mit einer Kontrollmaus gleichen Al-

ters zu sehen ($p=0,50$). $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Mäuse zeigten $4,10 \pm 0,68\%$ Tregs ($n=6$), wobei die Kontrollen $3,50 \pm 0,18\%$ ($n=5$) Tregs aufwiesen.

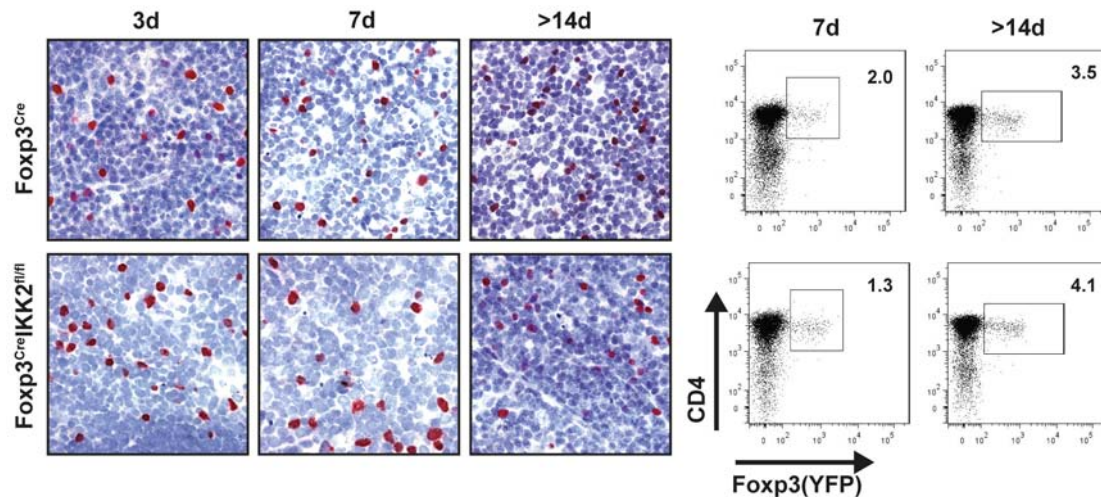


Abbildung 5.30

Treg Frequenzen im Thymus.

Links: Foxp3-Immunhistochemie des Thymus einer $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ und $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ Maus an Tag 3, 7 und >14 (400fach vergrößert).

Rechts: Exemplarische FACS-Analyse des Thymus einer 7 und >14 d alten $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ und $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ Maus.

Die Immunhistochemie in Abb. 5.31 zeigt, dass die Besiedlung mit Tregs in der Milz der $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ Maus von Tag 3 bis Tag 7 zunahm. Bei Tieren >14 d blieb die Besiedlung mit Tregs in der Milz stabil. $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Mäuse wiesen Tregs an Tag 3 in der Milz in vergleichbarem Ausmaß wie die Kontrollmäuse auf. Auch zeigten sie immunhistochemisch einen Anstieg der Tregs im Zeitraum 3-7 Tage, jedoch ist die Frequenz der Tregs an Tag 7 um das fast 4-fache ($p=0,006$) und an Tag >14 signifikant um ein 7-faches ($p<0,0001$) niedriger als in den Kontrolltieren. $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ Mäuse hatten durchschnittlich $9,1 \pm 0,4\%$ Foxp3^+ Zellen in der Milz an Tag 7 ($n=4$); an Tag >14 $8,8 \pm 0,3\%$ ($n=7$). $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Mäuse hingegen zeigten an Tag 7 eine Treg-Frequenz von $2,45 \pm 1,60\%$ ($n=4$); an Tag >14 sank diese auf $1,5 \pm 0,2\%$ ($n=13$). Die Lokalisation der Zellen in der weißen Pulpa war in beiden Tierlinien identisch.

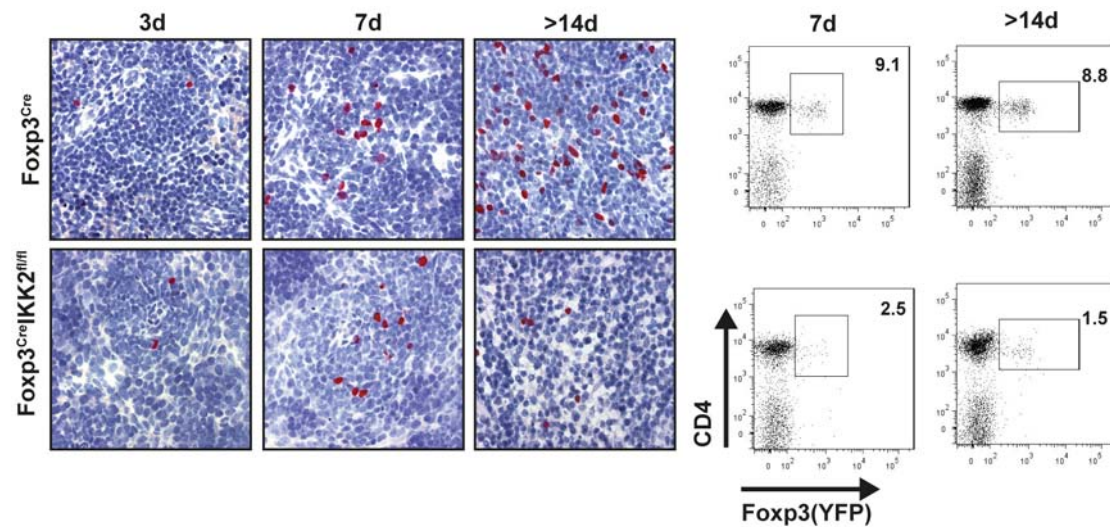


Abbildung 5.31

Treg Frequenzen in der Milz.

Links: Foxp3-Immunhistochemie der Milz einer *Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}* und *Foxp3^{Cre}* Maus an Tag 3, 7 und >14 (400fach vergrößert).

Rechts: Exemplarische FACS-Analyse der Milz 7 und >14 d alter *Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}* und *Foxp3^{Cre}* Maus.

Die Lunge von *Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}* Tieren zeigte eine gegenüber den Kontrolltieren reduzierte Treg-Frequenz auf immunhistochemischer Ebene. Die durchflusszytometrische Untersuchung an Tag 7 und >14 ergab eine Erniedrigung der Treg-Frequenz. *Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}* Tiere zeigten an Tag 7 durchschnittlich $1,66 \pm 0,85\%$ Tregs ($n=4$), wohingegen gesunde *Foxp3^{Cre}* Tiere $3,80 \pm 0,49\%$ ($n=4$) Tregs aufwiesen ($p=0,073$). Zum Zeitpunkt >14d zeigten *Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}* Tiere eine um das 3,6-fache erniedrigte Treg-Frequenz im Vergleich zur Kontrollmaus ($p=0,0014$); durchschnittlich waren es $2,33 \pm 0,96\%$ Tregs ($n=4$) bei *Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl}* Tieren und $8,48 \pm 0,76\%$ Tregs bei *Foxp3^{Cre}* Kontrollen ($n=5$).

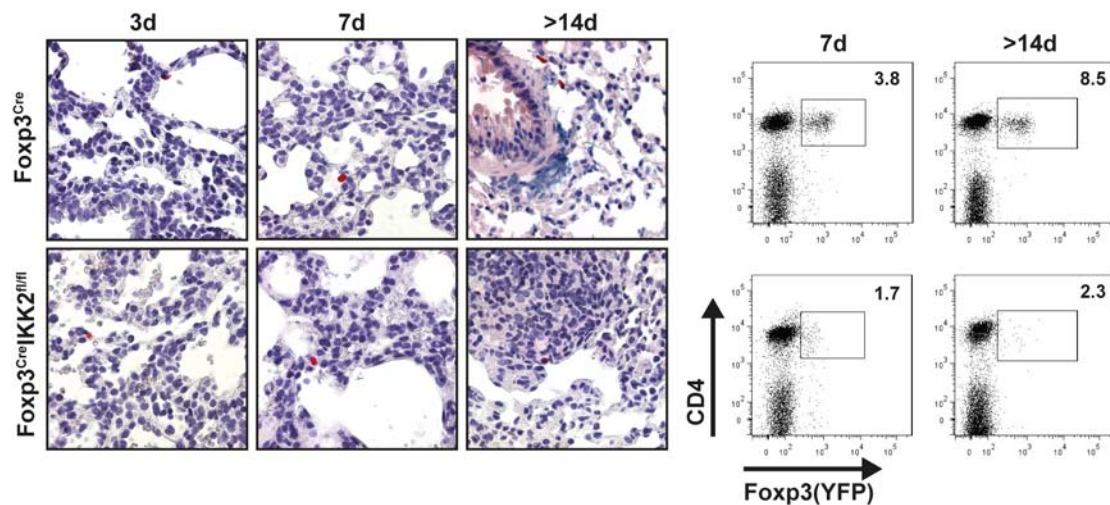


Abbildung 5.32

Treg Frequenzen in der Lunge.

Links: Fxp3-Immunhistochemie der Lunge einer Fxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} und Fxp3^{Cre} Maus an Tag 3, 7 und >14 (400fach vergrößert). Rechts: Exemplarische FACS-Analyse der Lunge 7 und >14 d alter Fxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} und Fxp3^{Cre} Maus.

5.2.4 IFN- γ -und IL-17-Antwort in Endorganen der Fxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus

Die reduzierte Treg-Frequenz in der Milz und der Lunge der Fxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus legte nahe die proinflammatorischen Gegenspieler zu untersuchen. In einem weiterführenden Experiment wurde die IFN- γ -und IL-17-Antwort zum Zeitpunkt >14 Tage untersucht. Es wurden je Tierlinie $n=7$ Milzen und $n=3$ Lungen untersucht. In der Milz der Fxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus konnte ein signifikanter Anstieg der IFN- γ -Produktion verglichen mit der Fxp3^{Cre} Kontrolle ($p=0,0445$) festgestellt werden. Durchschnittlich waren hier $2,78 \pm 0,00$ % Th1-Zellen zu finden, wobei gesunde Kontrollen durchschnittlich $1,02 \pm 0,00$ % Th1-Zellen zeigten. Auch die Lunge der Fxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus zeigte eine Erhöhung der IFN- γ -Antwort im Vergleich zur Kontrollmaus. Hier fanden sich 11mal mehr Th1-Zellen als bei den Kontrollen. Fxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Tiere zeigten $8,2 \pm 3,3$ % Th1-Zellen, wohingegen Fxp3^{Cre} Tiere $0,70 \pm 0,25$ % Th1-Zellen aufwiesen. Jedoch war dieser Unterschied aufgrund einer starken Streuung nicht signifikant ($p=0,08$). In der Milz der Fxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus zeigten sich nur geringfügig mehr Th17-Zellen verglichen mit der Kontrolle ($p=0,108$). $0,06 \pm 0,01$ % ($n=3$) in Milzen der Fxp3^{Cre} und $0,19 \pm 0,07$ % in Milzen der Fxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus. Die Lunge zeigte keinen Unterschied in den beiden untersuchten Tierlinien hinsichtlich der Expression von Th17-Zellen. Fxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäuse zeigten $0,300 \pm 0,032$ % Th17-Zellen in der Lunge und Fxp3^{Cre} Mäuse $0,320 \pm 0,045$ %.

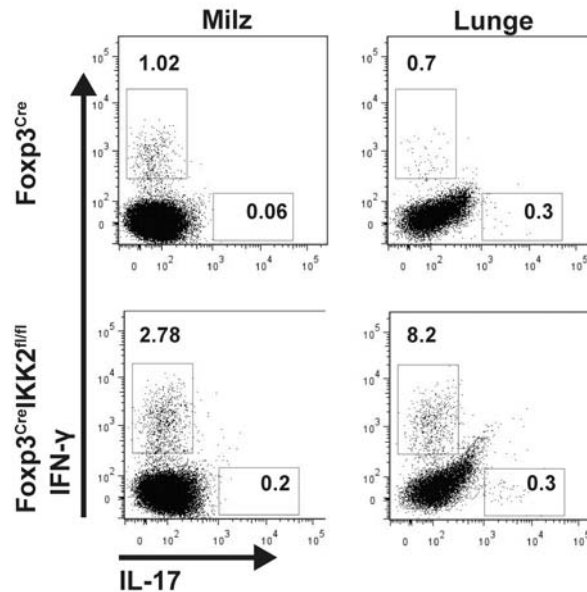


Abbildung 5.33

IFN- γ - und IL-17-Antwort in Endorganen der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus.

Exemplarische PMA/Ionomycin-Stimulation von Einzelzellsuspensionen aus Milz und Lunge der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} und Foxp3^{Cre} Maus an Tag >14. Die Plots sind gated auf CD4⁺ Zellen und exemplarisch für 2 unabhängige Experimente. Prozentangaben geben den durchschnittlichen Anteil IFN- γ ⁺ und IL-17⁺ Zellen in der CD4⁺ Population an.

5.2.5 Suppressiv Funktion IKK2-defizienter Tregs

Da die IKK2-Defizienz in Tregs der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus die Anzahl dieser Zellen in der Peripherie verringert, lag es nahe zu untersuchen ob dieser Knockout auch einen Effekt auf die Funktion der Tregs hatte. Der Funktionalitätstest mittels in-vitro-Suppressionsassay zeigte, dass Tregs aus Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen Responder-T-Zellen im gleichen Maße supprimieren können wie Tregs aus gleichaltrigen Foxp3^{Cre} Mäusen. Die IL-2-Ausschüttung in der Kokultur mit Tregs wurde prozentual zur IL-2-Ausschüttung in der Einzelkultur der Responder-T-Zellen berechnet. Tregs der Foxp3^{Cre} Maus konnten die IL-2-Ausschüttung auf $29,8 \pm 14,6\%$ (n=4) drosseln, wohingegen Tregs der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus die IL-2-Konzentration auf $10,5 \pm 5,9\%$ (n=4) supprimieren konnten (p=0,0002). Zwischen der Suppressionsfähigkeit von Tregs aus Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} und Foxp3^{Cre} Tieren bestand kein signifikanter Unterschied (p=0,27).

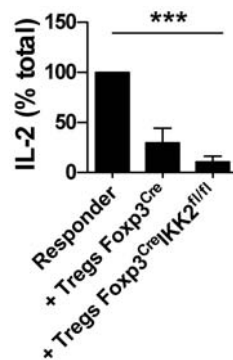


Abbildung 5.34

Suppressionsfähigkeit von Tregs aus Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen.

In-vitro-Suppressionsassays wurden mit 7-10 Tage alten Tieren durchgeführt. Suppressive Funktion der Tregs ist in % IL-2 im Überstand der Kulturen ausgehend von der TResp-Kultur aus Foxp3^{Cre} Mäusen angegeben. Der Graph zeigt 4 unabhängige Experimente.

5.2.6 Apoptose in Organen der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus

cFlip und A20 sind NF κ B-regulierte Apoptosehemmer [53] [54]. Die drei gewählten Organe der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus wurden zum Zeitpunkt >14d auf die Expression dieser Hemmer überprüft. Die mRNA-Expression wird als das x-fache der Kontrolle angegeben. Im Thymus fand sich eine hoch signifikante Erniedrigung der Expression von A20 auf $0,18 \pm 0,10$ ($n=3$, $p=0,0018$) und cFlip auf $0,24 \pm 0,07$ ($p=0,0004$). In der Milz zeigte sich das gleiche Muster. A20 und cFlip waren stark erniedrigt ($p=0,0459$ und $p=0,0089$); A20 auf $0,4 \pm 0,2$ und cFlip auf $0,59 \pm 0,10$ ($n=3$). In der Lunge war A20 auf 0,33 und cFlip auf 0,16 herunterreguliert. Signifikanzen in der Lunge können hier nicht berechnet werden, da nur eine Gewebeprobe der Lunge einer Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus zur Verfügung stand.

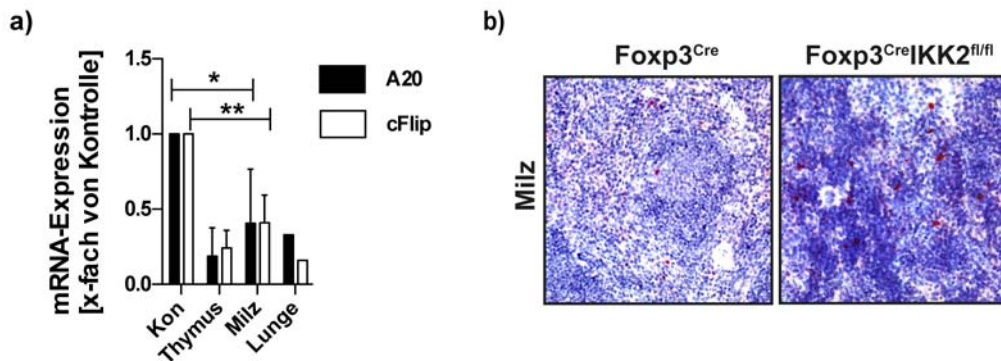


Abbildung 5.35

(a) RT-PCR für Apoptosehemmer.

Expression der Apoptosehemmer A20 und cFlip in Thymus, Milz und Lunge der $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus an Tag >14. Als Kontrolle diente jeweils die Expression von A20 und cFlip in den untersuchten Organen einer $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ Maus gleichen Alters.

(b) Caspase-3-Immunhistochemie der Milz. Caspase-3 Expression in der Milz von $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ im Vergleich zu $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ Tieren an Tag >14 (200fach vergrößert).

Die Milz als strukturell am stärksten verändertes Organ wurde immunhistochemisch auf den Apoptosemarker Caspase-3 gefärbt. Die Milz der $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus zeigte vermehrt Caspase-3-positive Zellen.

5.2.7 Proliferationsfähigkeit der Tregs aus $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen

Um das Überleben der IKK2-defizienten Tregs zu überprüfen wurden Milz-Einzelzellsuspensionen mit einer definierten Treg-Anzahl von 7 Tage alten $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ und $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ Mäusen in RAG1^{-/-} Mäuse intravenös gespritzt. 4 % der Tregs aus $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen waren nach 7 Tagen noch im Organismus der RAG1^{-/-} Maus zu finden, im Gegensatz zu 36 % der Tregs aus $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}$ Kontrollmäusen.

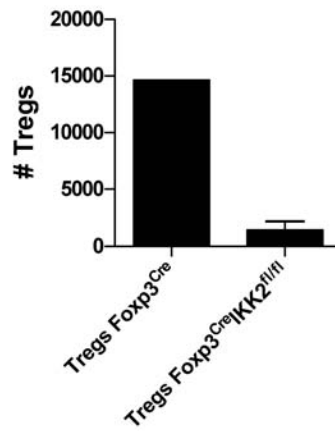


Abbildung 5.36

Proliferationsfähigkeit von Tregs aus Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen.

Eine definierte Treg Zahl (37.000) wurde in RAG1^{-/-}-Mäuse transferiert und nach 7 Tagen wurde die Proliferation der Tregs überprüft. Der Graph zeigt ein Experiment.

5.3 CD4⁺ T-zellspezifische IKK2-Deletion in der NTN

Der Einfluss einer IKK2-Defizienz in Tregs auf die NTN konnte aufgrund des Auftretens des Scurfy-Phänotyps und damit verbundenem frühen Letalität der Tiere nicht untersucht werden. Aus diesem Grund wurde der konstitutive Knockout eine Ebene höher in der T-Zell-Hierarchie, in CD4⁺ T-Zellen, durchgeführt. Durch diesen Knockout würde nicht nur der immunregulatorische Teil der Tregs, sondern auch der proinflammatorische Teil der T-Effektorzellen beeinträchtigt werden.

5.3.1 Charakterisierung CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus

Alle in NTN-Experimente eingeschlossenen Tiere wurden auf die Expression der Cre-Rekombinase und der IKK2^{fl/fl} genotypisiert. Es wurden nur Cre-positive und für IKK2^{fl/fl} homozygote Tiere in den Experimenten verwendet. Der zellspezifische Knockout wurde mittels PCR überprüft. Abbildung 5.37 b) zeigt das Fehlen der IKK2 in CD4⁺ T-Zellen der CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus.

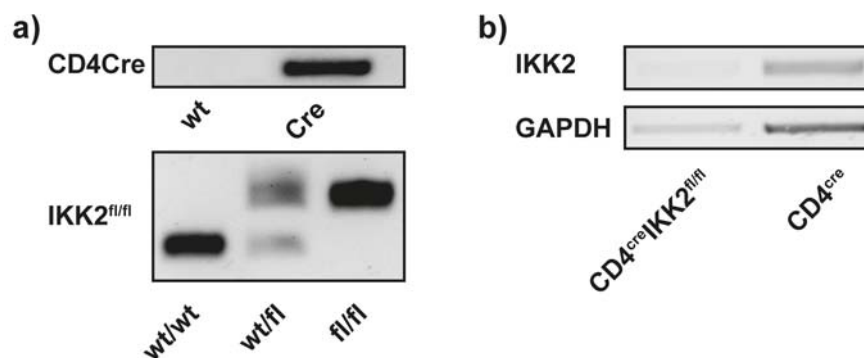


Abbildung 5.37

(a) **Genotypisierung für CD4^{Cre} und IKK2^{fl/fl}.** CD4^{Cre} Genotypisierung aus Mausschwanzbiopsien von wt (wt) cre-positiven (cre) Tieren. IKK2^{fl/fl} Genotypisierung zeigt wt (wt/wt), heterozygote (wt/fl) und homozygote (fl/fl) Tiere.

(b) **Expression der IKK2 in CD4⁺ Zellen von CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} und CD4^{Cre} Tieren.** Aus Milzeinzelzellsuspensionen wurden je 10.000 CD4⁺ Zellen gesortet. Aus diesen Zellen wurde RNA isoliert, in cDNA transkribiert und mittels PCR auf die Expression von IKK2 geprüft. GAPDH wurde als interne Kontrolle verwendet.

Die CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus zeigte im Vergleich zur Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus keine äußerlich sichtbaren Krankheitszeichen. Die Tiere wurden jedoch im Alter von 14 Tagen histologisch untersucht, um Veränderungen im Körperinneren auszuschließen, die im Alter von 14 Tagen nach Außen hin noch nicht sichtbar erscheinen. Abbildung 5.38 zeigt eine normale Organentwicklung der Milz und des Thymus von CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Tieren.

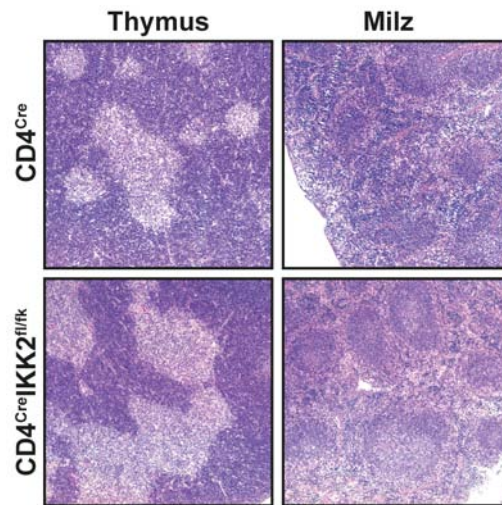


Abbildung 5.38

PAS-Färbung von Thymus und Milz.

PAS-Färbung von Thymus und Milz einer CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} und CD4^{Cre} Maus an Tag 14 (50fach vergrößert).

Darüber hinaus wurden die Treg-Frequenzen im Alter von 14 Tagen in Thymus und Milz bestimmt. Sowohl im Thymus als auch in der Milz waren Tregs in CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Tieren im Vergleich zu CD4^{Cre} Kontrollen um das 6,5 und 7-fache erniedrigt. Trotz dieses Unterschieds entwickelte sich die Maus normal, zeigte keinerlei spontane Immunerkrankung und erreichte das herkömmliche Lebensalter, sodass NTN-Experimente mit dieser Mauslinie möglich waren.

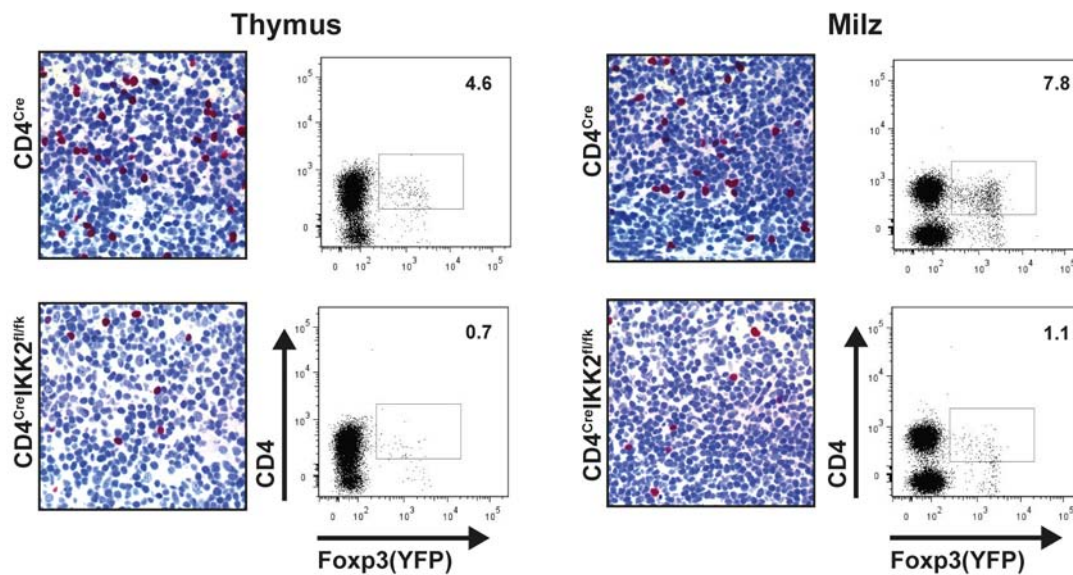


Abbildung 5.39

Treg Frequenzen in Milz und Thymus an Tag 14 nach der Geburt.

Jeweils links: Foxp3-Immunhistochemie der Milz bzw. des Thymus einer $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ und $CD4^{Cre}$ Maus an Tag 14 (400fach vergrößert). Jeweils rechts: Exemplarische FACS-Analyse der Milz bzw. des Thymus 14 Tage alter $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ und $CD4^{Cre}$ Maus (je $n=3$, 1 Experiment). Es wurde eine Oberflächenfärbung für CD4 und eine intranukleäre Färbung für Foxp3 durchgeführt. Die Plots sind gated auf CD3 Zellen und sind zeigen ein Experiment. Prozentangaben geben den durchschnittlichen Anteil Foxp3⁺ Zellen in der CD4⁺ Population an.

Die $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Maus wurde bereits 2003 von Schmidt-Supprian beschrieben [55]. Hierbei wurde festgestellt, dass adulte Tiere mit IKK2-defizienten CD4⁺ T-Zellen eine veränderte periphere Zusammensetzung ihrer T-Zellpopulationen aufweisen. In der Milz weist diese Maus eine um das 3-fache reduzierte Treg-Frequenz auf. Ebenfalls wurde eine Reduzierung der Memory T-Zellen um das 4-fache festgestellt. Sobald CD4⁺ T-Zellen den Thymus verlassen und in die Peripherie einwandern, ist ihr Überleben von einer NFκB-Aktivierung abhängig.

Aufgrund dieser Daten wurde in der vorliegenden Arbeit die periphere T-Zell-Frequenz der Zellen, welche im NTN-Modell eine entscheidende Rolle im Krankheitsverlauf spielen, untersucht. Die $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Maus wies im Vergleich zur $CD4^{Cre}$ Maus eine 2,5-fache Reduktion der CD4⁺ T-Zellen und eine 1,5-fache Reduktion der Tregs auf.

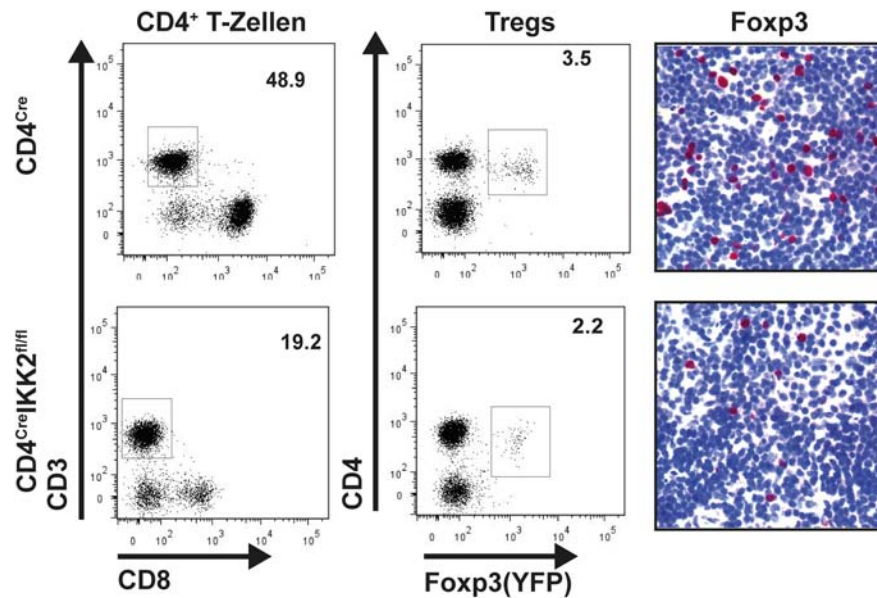


Abbildung 5.40

T-Zell Frequenzen in Milz 8 Wochen alter Tiere.

Links: Exemplarische FACS-Analyse von CD4⁺ T-Zellen und Tregs aus der Milz einer CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} und CD4^{Cre} Maus im Alter von 8 Wochen. Beide Populationen sind gated auf CD3 dargestellt. Prozentangaben geben den durchschnittlichen Anteil von CD4⁺ T-Zellen innerhalb der CD3⁺ Population und Tregs innerhalb der CD4⁺ Population an. Rechts: Exemplarische Foxp3-Immunhistochemie der Milz einer 8 Wochen alten CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} und CD4^{Cre} Maus (400fach vergrößert).

5.3.2 NTN in der CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus**Krankheitsinduktion**

Für alle NTN-Experimente mit dieser Mauslinie wurden CD4^{Cre} Tiere als Kontrolle verwendet. In Vorexperimenten wurden auch unbehandelte Kontrollen der CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} und CD4^{Cre} Maus verwendet. Diese waren erwartungsgemäß gesund und die Nieren wiesen histologisch keine Unterschiede zu gesunden C57BL6-Wildtyp-Tieren auf (Daten nicht gezeigt). Soweit nicht anders angegeben, handelt es sich um 6 voneinander unabhängige Experimente. CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} und CD4^{Cre} Tiere wiesen eine vergleichbare Krankheitsinduktion mit einer Proteinurie an Tag 2 nach NTN und einer durchschnittlichen Albumin/Kreatinin-Ratio von $264,30 \pm 30,71$ (n=34) und $286,90 \pm 46,57$ (n=20) auf. Eine immunhistochemische Färbung für Schaf-IgG an Tag 2 zeigte die Ablagerung der Immunkomplexe aus GBM-Antigen und Schaf-IgG entlang der GBM. Das Tubulointerstitium war frei von Schaf-IgG.

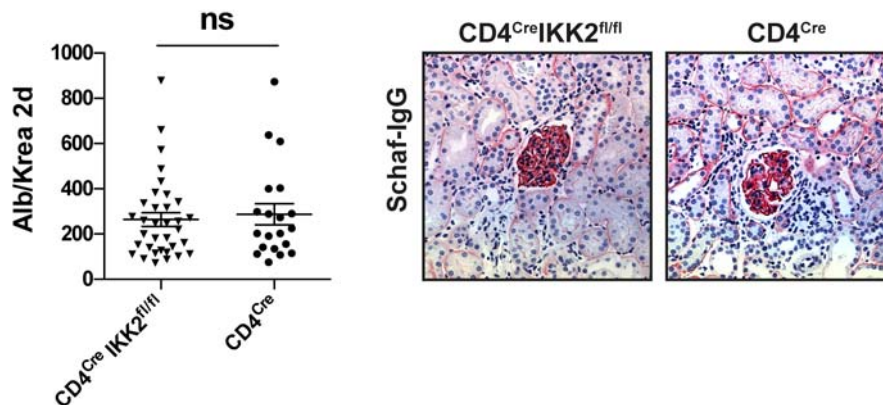


Abbildung 5.41

Induktion der NTN.

Links: Albumin/Kreatinin-Ratio an Tag 2 nach NTN in $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ und $CD4^{Cre}$ Mäusen. Rechts: Exemplarische Schaf-IgG-Immunhistochemie der Niere an Tag 2 nach NTN (200fach vergrößert).

Glomerulärer Schaden und Nierenfunktion

$CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Mäuse wiesen eine signifikant höhere Halbmondbildung im Vergleich zu den Kontrollen auf ($p=0,035$). $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Tiere zeigten durchschnittlich $8,5 \pm 1,0$ ($n=29$) und $CD4^{Cre}$ Tiere $5,3 \pm 1,0$ ($n=17$) Halbmonde pro Paraffinschnitt. Eine NTN mit C57BL6 zeigt nach 10 Tagen eine deutliche höhere Halbmondbildung (bis zu 30%). Es ist während der ersten Experimente, welche auch nephritische WT-Kontrollen beinhalteten, aufgefallen, dass Tiere, die das $CD4^{Cre}$ Transgen tragen, einen geringeren glomerulären Schaden aufwiesen als WT-Tiere. Die NTN verlief in diesem Fall milder. Diese Beobachtung konnte von weiteren Arbeitsgruppen innerhalb der Nephrologie bestätigt werden.

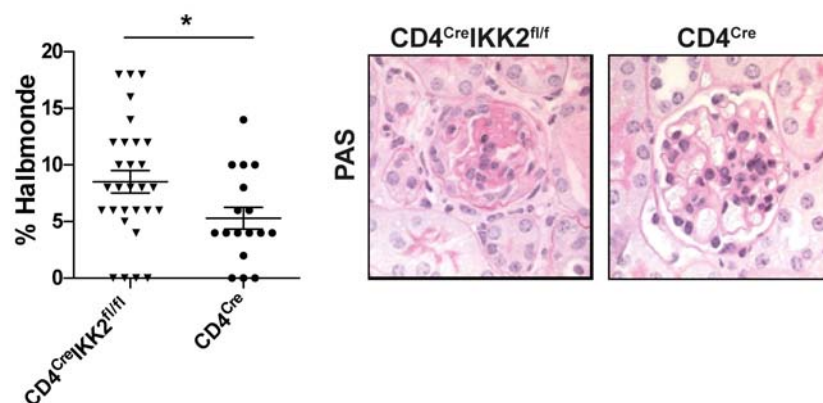


Abbildung 5.42

Glomerulärer Schaden.

Links: Der Graph zeigt die glomeruläre Halbmondbildung 10 Tage nach NTN in $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ und $CD4^{Cre}$ Mäusen. Rechts: Exemplarische PAS-Färbung der Glomeruli 10 Tage nach NTN (400fach vergrößert).

Die Albumin/Kreatinin-Ratio an Tag 10 zeigte keinen signifikanten Unterschied. $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Mäuse zeigten eine leicht höhere Ratio von $34,40 \pm 16,63$ ($n=34$), wohingegen $CD4^{Cre}$ Tiere eine durchschnittliche Ratio von $18,60 \pm 3,65$ ($n=21$) hatten. Einige Tiere in beiden Gruppen waren zwar an Tag 2 proteinurisch, wiesen jedoch eine sehr geringe Albumin/Kreatinin-Ratio an Tag 10 auf.

Beide nephritischen Gruppen zeigten eine Erhöhung des Serum-Harnstoffs gegenüber den gesunden Kontrollen. $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Mäuse wiesen hier mit $30,3 \pm 1,8$ mg/dl ($n=29$) eine signifikant geringere Harnstoff-Konzentration als $CD4^{Cre}$ Mäuse mit $39,7 \pm 2,7$ mg/dl ($n=15$) auf ($p = 0,0047$).

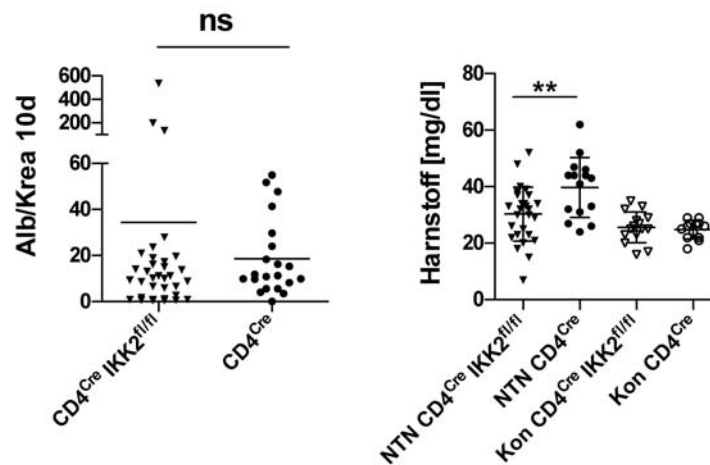


Abbildung 5.43

Nierenfunktion.

Links: Albumin/Kreatinin-Ratio an Tag 10 nach NTN in $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ und $CD4^{Cre}$ Mäusen. Rechts: Serum-Harnstoff-Konzentration der nephritischen Tiere an Tag 10 nach NTN im Vergleich zu gesunden $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ und $CD4^{Cre}$ Mäusen.

Der Entzündungszustand in den Nieren 10 nach NTN-Induktion kann durch die mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen widerspiegelt werden. Die Expression der Zytokinlevel wurde hier als x-fach der unbehandelten Kontrolle aus der gleichen Mauslinie berechnet. Die intrarenale mRNA-Expression von $TNF-\alpha$ war in Nieren von $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Mäusen $25,8 \pm 8,0$ erhöht ($n=13$); bei den nephritischen $CD4^{Cre}$ Kontrollen um $5,5 \pm 1,5$ ($n=11$). Dieser Unterschied war mit $p = 0,03$ signifikant.

Die Expression von $IL-1\beta$ war in $CD4^{Cre}$ Tieren um $2,4 \pm 0,4$ ($n=11$) und in $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Tieren um $6,3 \pm 0,7$ ($n=17$) erhöht. Diese stärkere Erhöhung in den $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Mäusen war gegenüber den nephritischen $CD4^{Cre}$ Kontrollen signifikant ($p = 0,0005$). In der Expression von $CCL20$ zeigten sie ebenfalls eine signifikante Erhöhung ($p = 0,002$). Nephritische $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Mäuse

exprimierten $63,1 \pm 8,0$ ($n=17$) und $CD4^{Cre}$ Mäuse $26,5 \pm 4,9$ ($n=11$) mehr CCL20-mRNA.

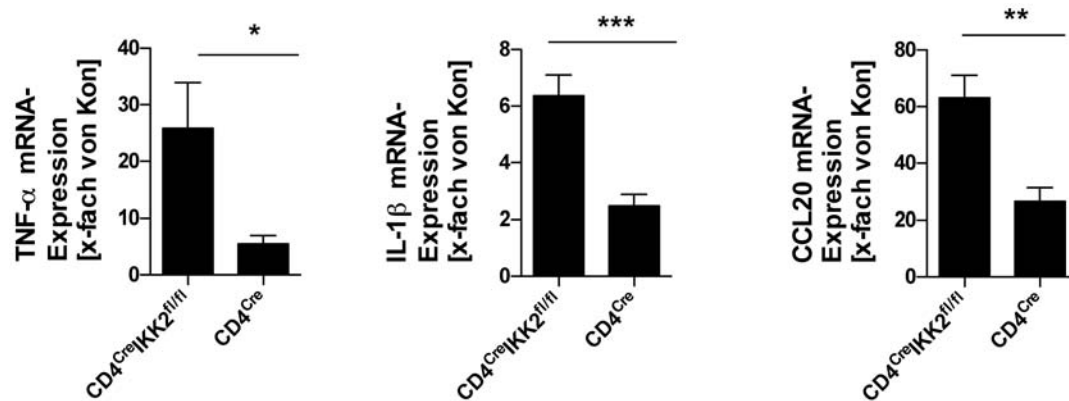


Abbildung 5.44

Expression proinflammatorischer Zytokine.

mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 β und CCL20 10 Tage nach NTN in $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ und $CD4^{Cre}$ Mäusen. Das Expressionslevel wurde in Bezug auf die jeweilige nicht-nephritische Kontrolle berechnet und 18S wurde als interner Standard genutzt. Alle Graphen stellen 5 voneinander unabhängige Experimente dar.

Infiltration von Immunzellen in die Niere

NTN-Vorexperimente mit systemischer NF- κ B-Hemmung zeigten eine Reduktion der infiltrierenden Th17-Zellen und Tregs in die nephritische Niere. In diesem Teil der Arbeit sollte vor allem der zellspezifische Einfluss einer IKK2-Defizienz in $CD4^{+}$ T-Zellen auf das Infiltrationsverhalten von Immunzellen in der NTN untersucht werden.

Die lichtmikroskopische Auszählung von $CD3^{+}$ T-Zellen ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,35$) zwischen $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ und $CD4^{Cre}$ Mäusen. Durchschnittlich waren 70 ± 6 ($n=28$) $CD3^{+}$ T-Zellen in Nierenschnitten von $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Tieren und 61 ± 5 ($n=13$) $CD3^{+}$ T-Zellen in $CD4^{Cre}$ Tieren zu finden. Die weiterführende Analyse der T-Zellen in Bezug auf ihre Subpopulationen wurde durchflusszytometrisch vorgenommen. Es wanderten signifikant weniger $CD4^{+}$ T-Zellen in die Nieren von $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ als in $CD4^{Cre}$ Mäusen ein. Pro 1000 $CD3^{+}$ T-Zellen fanden sich 339 ± 28 ($n=23$) $CD4^{+}$ T-Zellen in Nieren von $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Mäusen und 495 ± 52 ($n=16$) $CD4^{+}$ T-Zellen in Nieren von $CD4^{Cre}$ Tieren wieder. Dieser Unterschied war signifikant ($p=0,0071$).

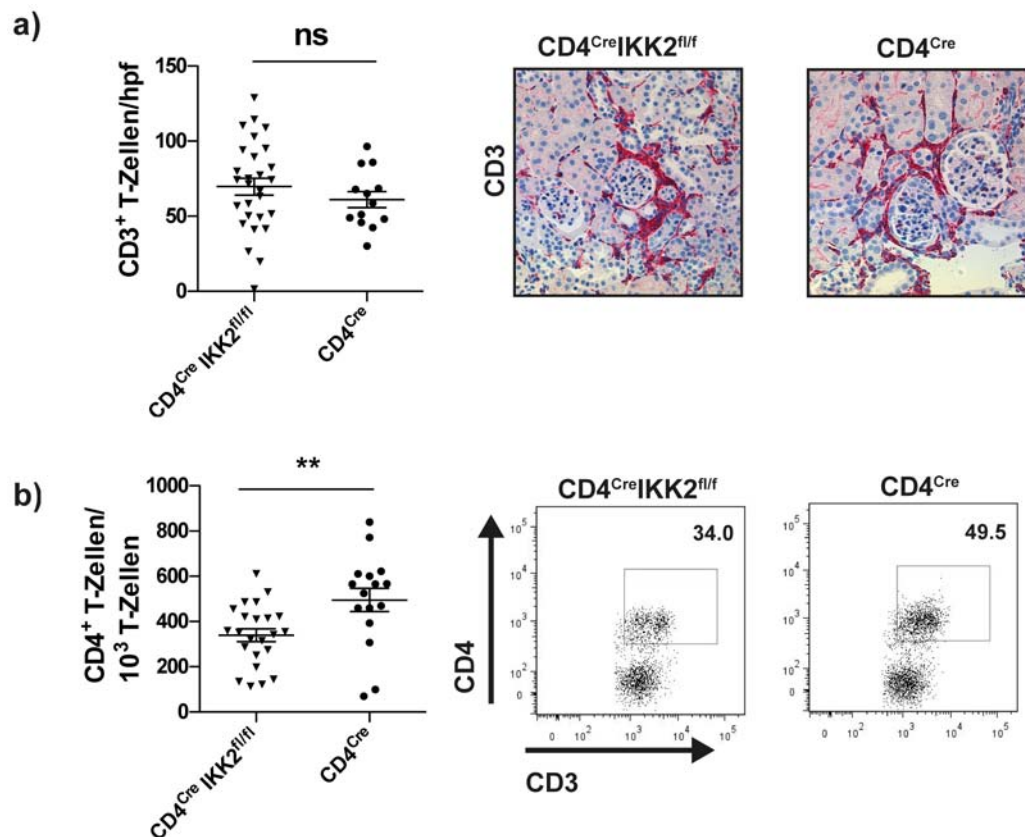


Abbildung 5.45

(a) Infiltration von CD3⁺ T-Zellen.

Links: Lichtmikroskopische Auszählung CD3-positiver Zellen. Rechts: Exemplarische CD3-Immunhistochemie der Niere 10 Tage nach NTN (200-fach vergrößert).

(b) Infiltration von CD4⁺ T-Zellen.

Links: Graphische Darstellung der infiltrierten CD4⁺ T-Zellen pro 10³ CD3⁺ T-Zellen aus 5 unabhängigen Experimenten. Rechts: Exemplarische Darstellung der CD4⁺ T-Zellen im Dot Plot gated auf CD3. Prozentangaben geben den durchschnittlichen Anteil CD4⁺ Zellen in der CD3⁺ Population an.

Die weitere Zusammensetzung des CD4⁺ Pools wird im Folgenden genauer dargestellt. Die durchflusszytometrische Auswertung der IFN- γ -Antwort ergab eine tendenzielle Erhöhung der Th1-Zellen in der Niere von CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen verglichen mit den Kontrollen. In die Nieren von CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen infiltrierten $4,2 \pm 1,2\%$ (n=12) Th1-Zellen, wohingegen es bei CD4^{Cre} Mäusen $1,8 \pm 0,5\%$ (n=6) Th1-Zellen waren. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (p=0,19).

Innerhalb der Th17-Antwort gab es zwischen den beiden Tierlinien keinen Unterschied. Die Frequenz der IL-17 produzierenden Zellen betrug in nephritischen CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen durchschnittlich $3,2 \pm 1,3\%$ (n=12) und in CD4^{Cre} Tieren $2,1 \pm 1,1\%$ (n=12).

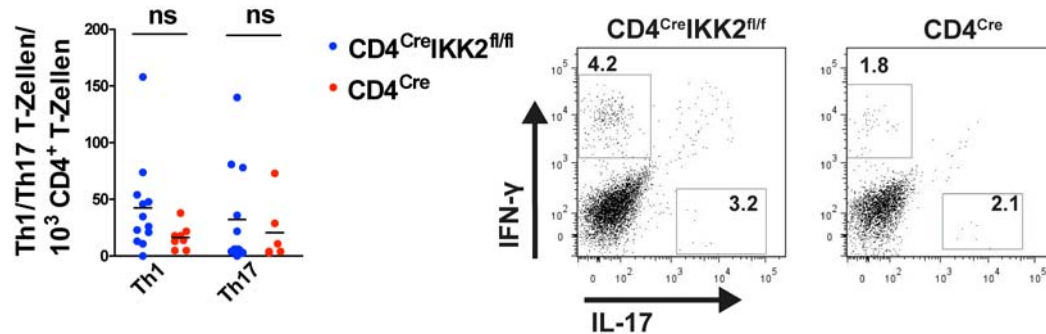


Abbildung 5.46

IFN- γ - und IL-17 Antwort in der Niere.

Links: Graphische Darstellung der infiltrierten Th1- und Th17-Zellen pro 10³ CD4⁺ T-Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten. Rechts: Exemplarische PMA/Ionomycin-Stimulation von Einzelzellsuspensionen aus der Niere nephritischer CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} und CD4^{Cre} Mäuse gegated auf CD4. Prozentangaben geben den durchschnittlichen Anteil IFN- γ ⁺ und IL-17⁺ Zellen in der CD4⁺ Population an.

Tregs konnten sowohl histologisch als auch durchflusszytometrisch untersucht werden. Beide Methoden zeigten, dass Tregs in Nieren von CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen signifikant erniedrigt waren im Vergleich zu den CD4^{Cre} Kontrollen. Die immunhistologische Auswertung ergab durchschnittlich $2,5 \pm 0,4$ (n=22) Tregs pro Gesichtsfeld in nephritischen CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} und $20,6 \pm 3,3$ (n=13) Tregs in CD4^{Cre} Tieren ($p < 0,0001$). In der FACS-Analyse konnten pro 10³ CD4⁺ T-Zellen $134,60 \pm 25,16$ (n=12) Tregs in Nieren von CD4^{Cre} Tieren gemessen werden, wohingegen es in Nieren von CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Tieren $62,83 \pm 22,82$ (n=12) Tregs waren ($p = 0,0462$).

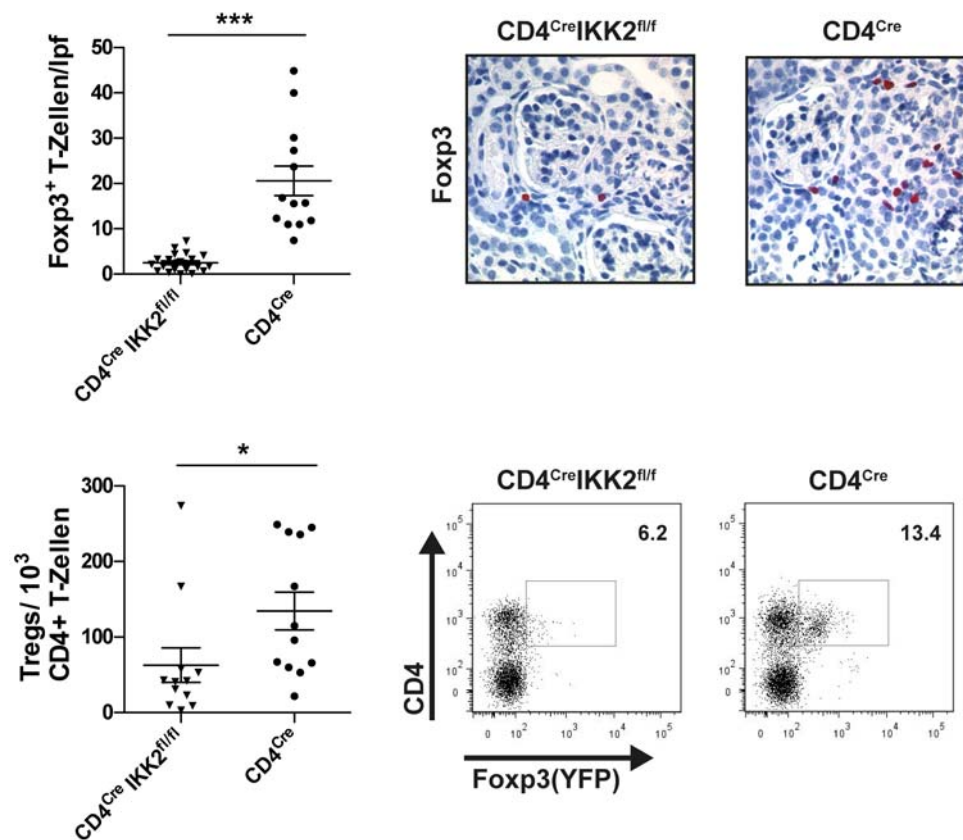


Abbildung 5.47

Infiltration von Tregs.

Oben links: Lichtmikroskopische Auszählung Foxp3-positiver Zellen. Oben rechts: Exemplarische Foxp3-Immunhistochemie der Niere 10 Tage nach NTN (200 fach vergrößert). Unten links: Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Treg-Auswertung aus 3 unabhängigen Experimenten. Unten rechts: Exemplarische Darstellung der Tregs im Dot-Plot gated auf CD3. Prozentangaben geben den durchschnittlichen Anteil von Tregs in der CD4⁺ Population an.

Die Suppressionsfähigkeit IKK2-defizienter Tregs wurde in 5.2.5 gezeigt. Wie zu erwarten zeigte sich, dass Tregs aus CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen die IL-2 Produktion von Responder-T-Zellen aus CD4^{Cre} Mäusen signifikant auf $4,81 \pm 0,56$ % drosseln können ($p < 0,0001$). Die IL-2-Produktion der IKK2-defizienten CD4⁺ stand hier im Vordergrund. Hierbei wurde auch der Einfluss des CD4^{Cre} Transgens auf die IL-2 Produktion und die Suppressionsfähigkeit mitgeprüft. Es war auffällig, dass Responder-T-Zellen aus CD4^{Cre} und CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen deutlich weniger IL-2 sezernierten als Responder-T-Zellen aus C57BL6-Tieren. Im Vergleich zu WT-Respondern konnten CD4^{Cre}-Responder nur $46,51 \pm 11,38$ % IL-2 sezernieren und Responder aus CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen $34,33 \pm 8,03$ %.

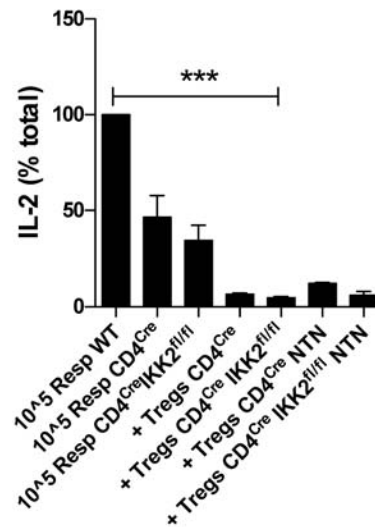


Abbildung 5.48

Suppressionsfähigkeit der Tregs aus CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Tieren.

In-vitro-Suppressionsassays wurden aus Responderzellen und Tregs von CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} und CD4^{Cre} Mäusen durchgeführt. Es wurde die IL-2-Konzentration im Überstand der Kokultur gemessen. Der Graph zeigt 3 unabhängige Experimente mit je n=3-4.

Die Infiltration von Makrophagen als Zellen der angeborenen Immunantwort wurde im Weiteren untersucht. Die lichtmikroskopische Auszählung der F4/80-Immunhistochemie ergab keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Tiere zeigten $91,71 \pm 7,20$ (n=30) F4/80⁺ Zellen pro Gesichtsfeld und CD4^{Cre} Tiere wiesen $76,35 \pm 7,30$ (n=15) Zellen auf. F4/80 intermediate Makrophagen hingegen zeigten eine hohe Expression von CD11b. Die Infiltrationsrate von Makrophagen in die Niere von CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen und CD4^{Cre} zeigt keinen Unterschied. Pro 10⁵ Leukozyten zeigten Nieren von CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen 3304 ± 243 (n=27) und Nieren von CD4^{Cre} Mäusen 3728 ± 228 (n=24) Makrophagen (p = 0,212).

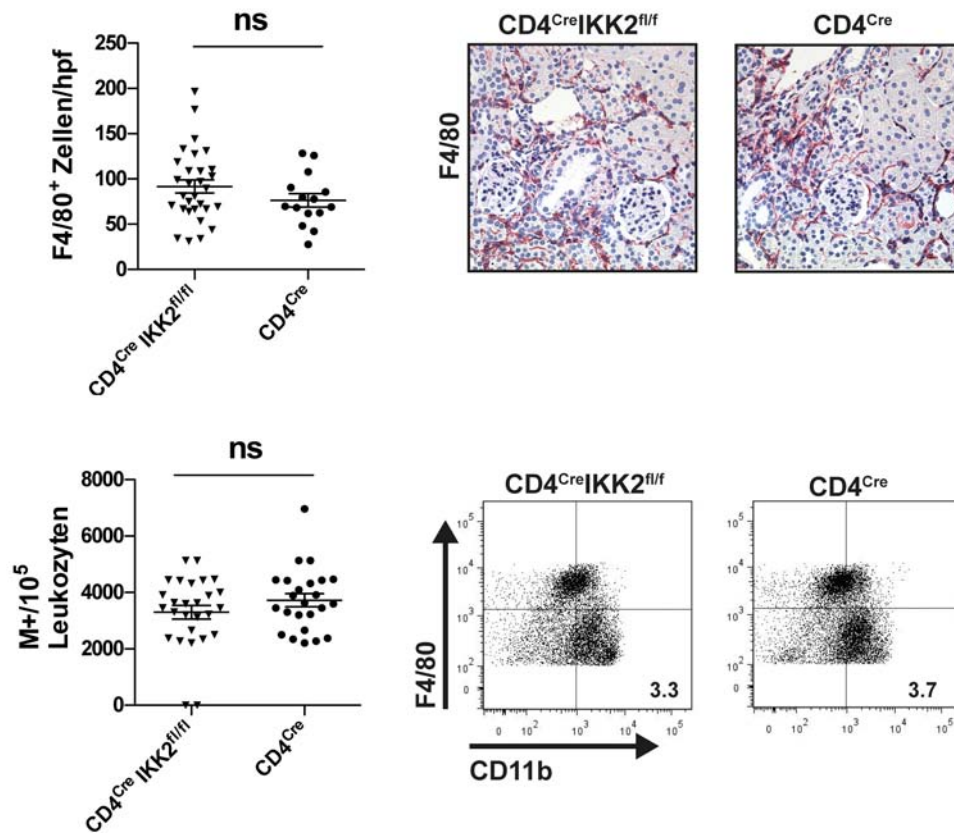


Abbildung 5.49

Infiltration von Makrophagen.

Oben links: Lichtmikroskopische Auszählung F4/80-positiver Zellen (M+). Oben rechts: Exemplarische F4/80-Immunhistochemie der Niere 10 Tage nach NTN (200 fach vergrößert). Unten links: Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Makrophagen Auswertung. Unten rechts: Exemplarische Darstellung der Makrophagen im Dot-Plot gated auf F4/80. Prozentangaben geben den durchschnittlichen Anteil von Makrophagen in der CD45⁺ Population an.

Eine weitere proinflammatorisch wirkende Zellpopulation in der NTN sind reife dendritische Zellen (DCs). Im Verlauf der NTN sind sie in der heterologen Phase protektiv und entwickeln sich in der autologen Phase zu entzündungsfördernden Zellen, die eine NTN aggravieren. In zwei unabhängigen Experimenten wurde die Infiltration von DCs in die Niere untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Nieren der CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäuse signifikant mehr DCs zeigten, als die der Kontrollen ($p = 0,049$). CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäuse zeigten pro 10^5 Leukozyten durchschnittlich 5817 ± 1223 ($n=6$) DCs wohingegen es bei CD4^{Cre} Mäusen 2688 ± 279 ($n=5$) DCs waren.

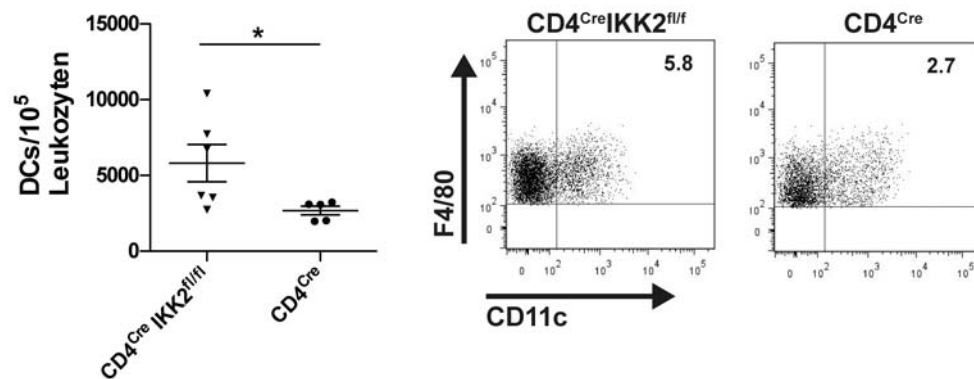


Abbildung 5.50

Infiltration von dendritischen Zellen.

Links: Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Auswertung dendritischer Zellen aus 2 Experimenten. Rechts: Exemplarische Darstellung der DCs im Dot-Plot gated auf F4/80 intermediate. Prozentangaben geben den durchschnittlichen Anteil von F4/80 intermediate/CD11c⁺ Zellen in der CD45⁺ Population an.

6 Diskussion

Diese Arbeit zeigt die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B für die Infiltration von Immunzellen in der nephrotoxischen Nephritis. Dabei wird die essentielle Funktion von NF- κ B für das Überleben und die Proliferation regulatorischer T-Zellen dargestellt. Im Folgenden sollen wichtige Ergebnisse interpretiert und diskutiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es den Effekt einer NF- κ B-Hemmung auf das Infiltrationsverhalten von unterschiedlichen Immunzellen in der NTN zu charakterisieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass T-Zellen maßgeblich an Effektormechanismen, die zur glomerulären Schädigung beitragen, beteiligt sind [56]. Die Funktion von NF- κ B in T-Zellen rückt in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus. Es konnte gezeigt werden, dass das NF- κ B-Protein p50 an der Aktivierung von T-Zellen und die IKK2-Kinase am Schutz vor Apoptose beteiligt ist [57] [58]. Eine NF- κ B-Hemmung ist in Vorexperimenten durch die systemische Applikation des IKK-2-Inhibitors CpdA im Modell der NTN durchgeführt worden. NTN+CpdA-Experimente sollten zeigen ob diese Intervention eine Verbesserung der NTN erzielt und welche T-Zellpopulationen in ihrem Infiltrationsverhalten in die Niere verändert werden. Es lag die Hypothese zu Grunde, dass die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung die Infiltration von T-Zellen in die Niere verhindert und es somit zu einer Verbesserung der NTN kommt. Der antiinflammatorische Effekt von NF- κ B-Inhibitoren ist in-vivo bereits u.a. im Rattenmodell der rheumatoiden Arthritis demonstriert [59]. Im nächsten Schritt wird die Bedeutung der NF- κ B-Hemmung spezifisch in CD4⁺ und regulatorischen T-Zellen untersucht.

Effekt von NF- κ B auf infiltrierende Immunzellen in der NTN

In den NTN-Experimentreihen dieser Arbeit wird zum einen NF- κ B systemisch gehemmt und des weiteren zellspezifisch in CD4⁺ T-Zellen. Bei der systemischen Hemmung handelt es sich um eine pleiotrope Hemmung, die sowohl ortsständige Zellen der Niere, Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort, sowie die Expression von Chemokinen, betrifft. Der zellspezifische IKK2-Knockout in CD4⁺ T-Zellen wirkt sich in der NTN lediglich auf Th1, Th17 und Tregs aus.

Die Applikation des IKK2-Inhibitors CpdA während der NTN erzielt eine deutlich verminderte NF- κ B-Aktivierung in der Niere. Ein Monitoring der CpdA-Plasmaspiegel wäre von Vorteil gewe-

sen um die Wirkung des Inhibitors zu zeigen; jedoch stand eine Technik zur Messung der CpdA-Plasmaspiegel nicht zur Verfügung. Wie bereits in anderen Publikationen, ist die Wirkung des Inhibitors indirekt mittels EMSA gezeigt [39]. Alle NTN-Experimente wurden mit NTN-Serum der gleichen Charge durchgeführt. Es ist auffällig, dass die Serum-Harnstoff-Werte in den nephritischen Gruppen der CpdA-Experimente nicht deutlich höher liegen als die der Kontrollgruppe. CpdA-behandelte Tiere zeigen zwar eine verminderte Halbmondbildung; diese ist jedoch nicht signifikant (Abb. 5.16). Es werden eher Serum-Harnstoff-Werte von 50 mg/dl bis 100 mg/dl und eine Halbmondbildung von über 30 % erwartet [24]. Ein weiterer Punkt ist die verhältnismäßig geringe Infiltrationsrate von T-Zellen in die nephritische Niere (Abb 5.19). Zusammen mit der relativ geringen Halbmondbildung und der kaum messbaren Th1-Antwort in Abb. 5.20 lassen diese Ergebnisse auf eine milde NTN schließen, was durch das mir zur Verfügung stehende NTN-Serum begründet werden kann.

Die NTN-Serum-Dosis wurde auf 0,4 ml titriert. Eine Dosissteigerung auf 0,45 ml oder 0,5 ml war nicht möglich, da diese Dosen eine Letalität von über 50 % verursachten. Voraussichtlich könnten mit dem Einsatz eines potenteren NTN-Serums in dieser Experimentreihe größere Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Basierend auf den hier vorliegenden Ergebnissen ist davon auszugehen, dass eine starke NF- κ B-Aktivierung einhergehend mit einer stärkeren Entzündung durch die IKK2-Hemmung stärker gehemmt würde.

Der CD4⁺-spezifische Knockout der IKK2 führt zu einer Aggravierung der NTN. 10 Tage nach Krankheitsinduktion weisen CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Tiere erhöhte Zytokinlevel (Abb. 5.44), eine höhere Albumin/Kreatinin-Ratio und eine signifikant höhere Halbmondbildung als CD4^{Cre} Tiere auf. Die erhöhten Harnstoffwerte in CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Tieren im Vergleich zur CD4^{Cre} Kontrolle sind widersprüchlich; jedoch werden die Parameter Albumin/Kreatinin und Serum-Harnstoff erfahrungsgemäß in der experimentellen Nephrologie nicht als aussagekräftig genug bewertet, um daran das Ausmaß des glomerulären Schadens zu beurteilen [60] [36]. CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}-NTN-Experimente wurden ebenfalls mit dem milden Serum der NTN+CpdA-Experimente durchgeführt und in Vorexperimenten ist darüber hinaus aufgefallen, dass CD4^{Cre} Tiere im Vergleich zu WT-Tieren weniger Halbmonde ausbilden. Es liegt die Vermutung nahe, dass die transgene Expression der Cre-Rekombinase in CD4⁺ T-Zellen diese Zellen schwächt und es dadurch zu einem Schutz vor T-zellbasierten Entzündungsvorgängen kommt. Einen weiteren Hinweis auf einen Einfluss des CD4-Transgens liefert die IL-2 Produktion von CD4^{Cre}-Responder T-Zellen in Abb. 5.48, welche im Vergleich zu WT-Respondern stark erniedrigt ist. Die erniedrigte IL-2-

Produktion von $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Respondern war zu erwarten, da IL-2 ein NF- κ B-Zielgen ist [61]. Aus diesem Grund wurden NTN-Experimente mit WT, homozygoten und heterozygoten $CD4^{Cre}$ Tieren durchgeführt. Erste Ergebnisse zeigen eine höhere Halbmondbildung in heterozygoten $CD4^{Cre}$ Tieren als in Homozygoten und bestätigen somit diese Vermutung.

In den NTN+CpdA-Experimenten zeigen die Daten zur Nierenfunktion (Abb. 5.17) und die Analyse der proinflammatorischen Zytokine in Abb. 5.18, dass der Entzündungszustand in CpdA-behandelten NTN-Tieren 10 Tage nach Krankheitsinduktion sogar leicht erhöht ist. NF- κ B vermittelt nicht nur proinflammatorische Vorgänge, sondern ist auch an der Ausheilung von Entzündungen beteiligt [39]. Die Ausheilungsphase der NTN beginnt erfahrungsgemäß 14 d nach Krankheitsinduktion. Bedingt durch das milde NTN-Serum in diesen Experimenten könnte diese Phase auch schon früher begonnen haben. Einen Hinweis darauf gibt die Bestimmung der Proteinurie mittels Multistix. Einige Tiere weisen an Tag 9 eine Proteinurie von +1 auf (Daten in Form von Albumin/Kreatinin-Ratio), obwohl sie an Tag 2 stark proteinurisch (+3 bis +4) waren. In einem LPS-induzierten Nephritis-Modell wird gezeigt, dass NF- κ B biphasisch aktiviert wird. Zu Beginn der Entzündung finden sich vorrangig p65/p50-Heterodimere in der Niere und in der Ausheilungsphase der Erkrankung dominieren antiinflammatorische p50/p50-Homodimere [62]. Eine NF- κ B-Hemmung bis in die Ausheilungsphase einer Entzündung könnte den Heilungsvorgang verzögern und anhaltende proinflammatorische Prozesse fördern [63].

NF- κ B ist an der Gentranskription der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α , welche Makrophagen aktivieren, und durch die Expressionsregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM und E-Selektin an der Leukozytendiapedese zum Ort der Entzündung beteiligt [38] [64]. Dieser Prozess könnte durch die CpdA-Behandlung herunterreguliert sein, womit sich die signifikant reduzierte Makrophageninfiltration in der NTN+CpdA-Gruppe erklärt. Dieser Mechanismus kann auch Grund für die geringere Treg- und Th17-Infiltration sein. Die Deletion der IKK2 in $CD4^{+}$ T-Zellen hat in der NTN keinen Einfluss auf das Chemokinmilieu. Wie dadurch zu erwarten ist in dieser Experimentreihe die Makrophageninfiltration unverändert (Abb. 5.49). Bedingt durch die periphere Zusammensetzung der T-Zellen in der $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Maus wäre ein Kompensationsmechanismus der angeborenen Immunantwort in Form einer erhöhten Makrophageninfiltration jedoch denkbar. Die erhöhte mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 β und CCL20 in NTN-Experimenten mit der $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Maus können einerseits auf den erhöhten Entzündungszustand in den Tieren zurückzuführen sein, andererseits ist eine reflektorische Zytokinerrhöhung als Antwort auf die geringere T-Zell-Frequenz in der Peripherie dieser Tiere

möglich.

In beiden experimentellen Ansätzen findet eine Beeinflussung der CD4⁺ T-Zellen statt. In beiden Systemen kommt es zu einer Dämpfung von pro- und antiinflammatorischen Effekten. CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäuse zeigen die peripher geringen Treg- und CD4⁺-Zahlen und die CpdA-Behandlung der NTN senkt die Infiltration von Th17-Zellen und Tregs in die Niere. Letzteres erklärt auch den nicht signifikant besseren Verlauf bezüglich des glomerulären Schadens in NTN+CpdA-Experimenten.

Aus der Literatur zur CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus ist bekannt dass IKK2-defiziente T-Zellen NF-κB alternativ über IKK1 aktivieren können [55] und Proliferation, T-Zellaktivierung über den TCR (CD3/CD28- Signal) sowie die Konversion in Th1- und Th17-Zellen nicht beeinträchtigt sind [65]. In der NTN mit CpdA-Behandlung wird eine Hemmung der IKK1 durch CpdA ausgeschlossen, da der Inhibitor eine hohe Spezifität für IKK2 aufweist [44]. Die Aktivierungsvorgänge von T-Zellen sind von zentraler Bedeutung für den Krankheitsverlauf der NTN. Dendritische Zellen (DCs) erkennen das NTN-Serum und präsentieren es über MHCII naiven T-Zellen. Diese binden das Antigen über den TCR (CD3) und in einem zweiten Schritt kommt es zum kostimulatorischen Signal zwischen B7 auf der DC und CD28 auf der T-Zelle [12]. Diese beiden Vorgänge initiieren zusammen die Aktivierung und Differenzierung der naiven T-Zelle zur Th1- und Th17-Effektorzellen, welche in der NTN den glomerulären Schaden bewirken [66]. Die stark erniedrigte Infiltrationsrate von CD4⁺ T-Zellen in die Niere von CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen ist somit auf die peripher niedrigere T-Zellzahl in diesen Tieren zurückzuführen, zumal die Infiltration von T-Lymphozyten insgesamt nicht unterschiedlich zur nephritischen CD4^{Cre} Maus ist.

Betrachtet man die CD4⁺ T-Zellsubpopulationen detaillierter, so lässt sich zwischen den beiden experimentellen Ansätzen bezüglich der Infiltration von Th1- und Th17-Zellen ein Unterschied feststellen. In der NTN mit CpdA-Behandlung kann aufgrund der geringen Th1-Antwort nur die Th17-Zellpopulation bewertet werden. Sie ist durch die pharmakologische Intervention herunterreguliert, was auf die systemisch antiinflammatorische Wirkung des Inhibitors zurückzuführen sein kann. Die Expression des Chemokins CCL20 gibt an dieser Stelle keinen Anhaltspunkt, da eine erniedrigte mRNA-Expression bei geringerer Th17-Infiltration zu erwarten wäre. Ein Einfluss des CpdA auf das Konversionsverhalten von naiven T-Zellen wird aufgrund der Untersuchungen in IKK2-defizienten CD4⁺ T-Zellen ausgeschlossen. CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäuse zeigen in der Nephritis eine tendenzielle Erhöhung der Th1- und Th17-Antwort, welche auch mit einer erhöhten Expression der inflammatorischen Zytokine, sowie CCL20 einhergeht. Beide Befunde

erklären den größeren glomerulären Schaden in $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Tieren [56].

Sowohl die systemische NF- κ B-Hemmung als auch der $CD4^{+}$ -spezifische Knockout der IKK2 zeigen in der NTN eine erniedrigte Treg-Zahl in der Niere. Erst seit Kurzem ist bekannt, dass NF- κ B mit dem Treg-spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 interagiert [67]. Das NF- κ B-Protein c-Rel reguliert die Expression von Foxp3 sowohl im Thymus als auch in der Peripherie. c-Rel-defiziente Mäuse weisen eine um das 5-fache niedrigere Treg-Frequenz in der Milz auf. Ru-an et al. postulieren zudem eine zentrale Rolle für c-Rel als Initiator eines Transkriptions-Enhancersoms für Foxp3 [68] [69]. Die kontinuierliche Expression von Foxp3 ist sowohl für das Überleben als auch für die Funktion von Tregs notwendig [70]. Foxp3 ist demnach ein Angriffspunkt für CpdA und würde die geringere Treg-Zahl in der NTN+CpdA-Gruppe erklären. Auch für die NTN in $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Mäusen wäre das, neben der geringen Treg-Zahl in der Peripherie, ein nachvollziehbarer Mechanismus. Die Untersuchungen zur Foxp3 $^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Maus zeigen, dass IKK2 unverzichtbar für die Foxp3-Expression ist.

Die aggravierte NTN in $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Mäusen ist zum einen auf das Fehlen der Tregs zurückzuführen; die tendenzielle Erhöhung von Th1 und Th17-Zellen hingegen ist nicht ausreichend um dieses Phänomen zu erklären. Es ist bekannt, dass Tregs die Aktivierung und Reifung von DCs durch die Herunterregulation der Reifungsmarker CD80 und CD86 auf der Oberfläche der DC hemmen können [71]. DCs reifen im Verlauf der NTN und entwickeln dadurch ab Tag 7 einen proinflammatorischen Phänotyp, der die NTN nachweislich verschlechtert [72]. Das Fehlen der Tregs in $CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl}$ Mäusen begünstigt eine ungehemmte Reifung und Proliferation der DCs [73], wodurch sich die erhöhte DC-Infiltration in die Niere dieser Tiere erklärt (Abb. 5.50).

Die Funktion der Tregs aus CpdA-behandelten Tieren ist nicht beeinträchtigt. Jedoch ist die suppressive Kapazität von NTN-Tregs nicht wie erwartet auf dem Niveau der Kontroll-Tregs. Ein Grund dafür könnte sein, dass NTN-Tregs in-vivo schon suppressive Effekte vermittelt haben und im in-vitro-Experiment diese Kapazität schon erschöpft ist. Diese Beobachtung wurde von der Arbeitsgruppe Experimentelle Immunologie von Frau Prof. Tiegs bestätigt. Die suppressive Funktion von Tregs ist nicht durch NF- κ B direkt reguliert, sondern ergibt sich aus einem Zusammenspiel von CTLA-4, IL-2, TGF- β und IL-10 [74]. Eine verminderte suppressive Aktivität der Tregs durch eine NF- κ B-Hemmung oder einen zellspezifischen IKK2-Knockout war somit nicht zu erwarten.

Sowohl die CpdA-Behandlung, als auch die $CD4^{+}$ -spezifische Deletion der IKK2 bewirken in der NTN den unerwarteten inhibitorischen Effekt auf protektiv wirkende regulatorische T-Zellen.

Der Effekt einer NF- κ B-Hemmung auf diese Zellpopulation wurde in einem Krankheitsmodell bislang noch nicht untersucht und gab Anlass die Funktion von NF- κ B in Tregs im Modell der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus genauer zu untersuchen.

IKK2-Defizienz in regulatorischen T-Zellen verursacht eine lymphoproliferative Erkrankung

Die IKK2-Defizienz in Tregs der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus führt zu einer Autoimmunerkrankung der Tiere, welche dem Scurfy-Phänotyp der Foxp3^{-/-} Maus ähnelt [33]. Die Tiere zeigen stark reduzierte Treg-Frequenzen in der Milz und der Lunge (Abb. 5.31, 5.32); im Thymus hingegen bleibt die Treg-Besiedlung der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus während des gesamten Beobachtungszeitraums auf dem Level der Foxp3^{Cre} Kontrollmäuse.

Die antiapoptotische Wirkung von NF- κ B scheint an dieser Stelle entscheidend zu sein [41]. In T-Zellen sind Aktivierungs- und Proliferationsprozesse ausgehend vom TCR-Signal NF- κ B-reguliert [75]. PKC θ stimuliert CARMA1, Bcl10 und MALT; diese formen den CBM-Komplex, der in einem weiteren Schritt IKK2 phosphoryliert. Tiere mit einer Defizienz für die NF- κ B Proteine CARMA, Bcl10 und c-Rel zeigen peripher reduzierte Treg-Zahlen [76] [57] [77] [68] [55]. Obwohl die Mechanismen der Treg-Entwicklung im Thymus noch nicht vollständig aufgeklärt sind, stellen die Wissenschaftler Lio und Hsieh ein 2-Stufen-Modell der Treg-Entwicklung auf [78]. In einem ersten TCR-abhängigen Schritt benötigt die Treg-Generation im Thymus ein TCR/CD28-Signal zwischen einem CD4⁺ Thymozyten und einer autoantigenpräsentierenden Thymus-Epithelzelle [79] [80]. Dies führt zu einer Hochregulation von CD25, welches in einer höheren IL-2-Empfindlichkeit resultiert [81]. In einem zweiten TCR-unabhängigen Schritt, nachfolgend dem IL-2-Rezeptor, kommt es zur Aktivierung von STAT5, welches dann die Foxp3-Expression anregt.

In der Treg-Entwicklung wird Foxp3 somit erst im letzten Schritt hinzugeschaltet. Ein kürzlich publizierter Thymozyten-spezifischer NF- κ B-Knockout gibt eine Einsicht in den frühen Zeitpunkt der Treg-Entwicklung. Die thymozytenspezifische Expression einer stabilen I κ B α zeigte eine reduzierte Expression von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen sowohl im Thymus als auch in der Milz. Die Arbeitsgruppe postuliert einen zellintrinsischen Effekt, da die exogene Zuführung von IL-2 keinen Einfluss auf die Treg-Zahlen hatte [82]. Die Entwicklung der Tregs im Thymus der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus verläuft normal, was anhand der Treg-Zahlen zu den untersuchten Zeit-

punkten zu sehen ist. Tregs können in diesen Tieren im Thymus generiert werden, da der IKK2-Knockout erst nach Aktivierung des Foxp3-Promotors stattfindet. Der Foxp3-Promotor wird im Thymus erst an Tag 3 nach der Geburt aktiv [52]. Das ist der kritische Zeitpunkt, an dem Tregs aus dem Thymus in die Peripherie wandern [83] und es ist bekannt dass eine Foxp3-Expression im Thymus allein nicht vor dem Scurfy-Phänotyp schützt [84].

In der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus sind diese in der Peripherie angelangten Tregs nicht überlebensfähig, wie in dem Transferexperiment in Abb. 5.36 gezeigt. Die überlebensnotwendigen Signale über den NF-κB-Signalweg können nicht verarbeitet werden. Das Überleben von Tregs in der Peripherie benötigt eine kontinuierliche Foxp3-Expression [70], TCR-Signalverarbeitung über die IKK2-Kinase [55] und exogen zugeführtes IL-2 [85]. Es ist bekannt, dass NF-κB die Foxp3-Expression reguliert [69]. Dies könnte ein Weg sein über den das defekte NF-κB-Signalling in Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Mäusen zu den reduzierten Treg-Zahlen führt. Eine kontinuierliche Foxp3-Expression kann somit über den IKK2-Knockout in der Peripherie nicht aufrechterhalten werden. Eine weitere Erklärung lässt sich in der NF-κB-abhängigen Signalverarbeitung nachfolgend dem TCR und auch dem IL-2- Rezeptor finden. Die IL-2-Signalverarbeitung beinhaltet c-Rel, p50 und p65 [86].

In Thymus, Milz und Lunge der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus wurde auch eine erniedrigte Expression der Apoptosehemmer A20 und cFlip festgestellt. Im Thymus ist viel Apoptose zu erwarten, da autoreaktive T-Zellen durch Apoptose ausgesiekt werden. In den beiden peripheren Organen jedoch ist dieses Ergebnis auf die gestörte Eigentoleranz zurückzuführen. Hier wäre eine kombinierte FACS-Messung von Vorteil gewesen, um darzustellen ob noch weitere Zellen Apoptosevorgängen unterliegen. Die Apoptose der Tregs wird mittels Transferexperiment in RAG1-/- Mäusen demonstriert.

Durch die fehlenden Tregs in der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus kommt es zu einer gestörten peripheren Eigentoleranz, da ein Missverhältnis von T-Effektorzellen zu Tregs herrscht. Untersuchungen zur Scurfy-Maus haben ergeben, dass es bei dieser Genmutation zu einer starken Proliferation von autoantigenen T-Effektorzellen kommt [87]. Dies ist ebenfalls in der Foxp3^{Cre}IKK2^{fl/fl} Maus zu beobachten. Die proinflammatorische Immunantwort wird nicht mehr supprimiert und es kommt zu den in Abb. 5.29 gezeigten Infiltraten und überschießenden Th1- und Th17-Immunantworten (Abb 5.33).

Klinische Bedeutung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der antiinflammatorisch angelegte Einsatz eines IKK2-Inhibitors nicht nur Auswirkungen auf den Pathomechanismus der Entzündung hat, sondern ebenfalls protektive Mechanismen - wie z.B. regulatorische T-Zellen - der Immunantwort hemmt. Dies kann den Verlauf der Entzündung beeinträchtigen und diese sogar aggravierern. Derzeit sind einige IKK2-Inhibitoren bereits in Phase-I-Studien in Erprobung und neue Inhibitoren sind in der Entwicklung [88].

Für den Verlauf einer Entzündung sind sowohl pro-, als auch antiinflammatorische Prozesse wichtig; es kann jedoch variieren wann Resolutionsprozesse in einer Erkrankung beginnen. Der Zeitpunkt pro- und antiinflammatorischer Phasen im Rahmen eines Entzündungsgeschehens beim Patienten kann in der klinischen Anwendung patientenspezifisch nur schwer beantwortet werden.

Darüber hinaus ist noch zu wenig über die pro- und antiapoptotische Wirkung von NF- κ B in verschiedenen Zelltypen und deren Reifestadium, bekannt. Die IKK2-Deletion in Lymphozyten provoziert Apoptose, in Hepatozyten hingegen wird kein antiapoptotischer Effekt von NF- κ B beobachtet [89] [58]. Eine NF- κ B-Aktivierung kann durch unterschiedliche Stimuli, wie TNF- α , LPS, doppelsträngige RNA oder oxidativen Stress erfolgen [90]. Durch eine systemische NF- κ B-Hemmung würden die Signalweiterleitung aller dieser Stimuli beeinträchtigt werden. Darüber hinaus gibt es auch NF- κ B-unabhängige Signalwege, die die Aktivierung von NF- κ B beeinflussen [91]. Diese Signalwege werden mit einem IKK2-Inhibitor nicht erfasst und Untersuchungen zur CD4^{Cre}IKK2^{fl/fl} von Schmidt-Supprian zeigen auch die alternative NF- κ B-Aktivierung über IKK1, wenn IKK2 fehlt [55].

Des Weiteren kann NF- κ B bzw. IKK2 in verschiedenen Zellen unterschiedliche Funktionen vermitteln. An einem Kolitis-assoziierten Tumormodell wurde gezeigt, dass ein Epithel-spezifischer IKK2-Knockout die Inflammation im Gewebe nicht erniedrigt und keinen Effekt auf die Tumorgroße hat. Eine IKK2-Deletion in myeloiden Zellen hingegen erniedrigte signifikant die Tumorgroße [92].

Ein weiterer Punkt ist die Signalstärke, mit der NF- κ B aktiviert wird. Ein gutes Beispiel dafür ist die Reifung eines CD4⁺CD8⁺ Thymozyten zur CD4⁺ T-Zelle. Kommt es zu einer starken NF- κ B-Aktivierung über den TCR, so handelt es sich wahrscheinlich um eine autoreaktive T-Zelle, die durch die Induktion von Apoptose eliminiert wird. Ein moderates NF- κ B-Signal hingegen führt

zur positiven Selektion und aus dem doppelpositiven Thymozyten wird eine einfach positive CD4⁺ T-Zelle [93].

All diese Aspekte zeigen auf, dass NF- κ B/IKK2 pleiotrope Effekte vermittelt und es noch weiterer zellspezifischer Untersuchungen zu den verschiedenen Rollen von NF- κ B bedarf, bevor NF- κ B-Inhibitoren Anwendung in der Therapie entzündlicher Erkrankungen finden.

Ausblick

Basierend auf der antiinflammatorischen Rolle von NF- κ B in der Ausheilung von Entzündungen wäre es wichtig den Effekt einer IKK2-Hemmung in lediglich in der frühen Phase der NTN, beispielsweise bis Tag 6, zu untersuchen. Es wäre zu erwarten, dass Resolutionsprozesse ungehindert ablaufen können und diese Intervention zum schnelleren Ausklingen der NTN beiträgt. Zur Bestätigung der Ergebnisse wären NTN-Experimente mit anderen IKK2-Inhibitoren sinnvoll und könnten zur Aussagekraft einer NF- κ B-Hemmung in der NTN beitragen.

Der Einfluss des CD4^{Cre}-Transgens auf die Effektorfunktion von CD4⁺ T-Zellen könnte auch in anderen Tiermodellen problematisch werden. Hiervon könnten vor allem Modelle zur Untersuchung T-zellvermittelter Erkrankungen betroffen sein. Ein Beispiel wäre die EAE als Modell der Multiplen Sklerose, bei der autoreaktive CD4⁺ T-Zellen die Myelinscheiden von Nervenzellen zerstören [94]. Die Analyse zellspezifischer Effekte mit dem Einsatz von CD4^{Cre} Tieren in T-zellvermittelten Mausmodellen, sollte daher zuvor den Einfluss des CD4^{Cre}-Transgens in dem jeweiligen Modell untersuchen.

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen der T-zellspezifischen IKK2-Deletion wäre der nächste Schritt die Untersuchung der IKK2-Funktion in Th17-Zellen. Dafür steht die IL-17A^{Cre} Maus zur Verfügung. Es stellt sich die Frage, ob die eine IL-17A^{Cre}IKK2^{fl/fl} eine veränderte periphere Th17-Frequenz aufweist und wie sich diese Zellen in der NTN verhalten. Hierbei könnte der Unterschied in der IKK2-Abhängigkeit zwischen Tregs und Th17-Zellen herausgestellt werden.

7 Literatur

- [1] E. Ritz, G. Bakris, and World Kidney Day Organising Committee, "World Kidney Day: hypertension and chronic kidney disease," *Lancet*, vol. 373, pp. 1157–8, Apr 2009.
- [2] R. C. Atkins, P. Zimmet, 2010 International Society of Nephrology/International Federation of Kidney Foundations World Kidney Day Steering Committee (RA), and International Diabetes Federation (PZ), "Diabetic kidney disease: act now or pay later," *J Bras Nefrol*, vol. 32, pp. 7–10, Mar 2010.
- [3] W. H. Organization, *Preventing chronic diseases : a vital investment*. Geneva Ottawa: World Health Organization Public Health Agency of Canada, 2005.
- [4] M. El Nahas, "The global challenge of chronic kidney disease," *Kidney Int*, vol. 68, pp. 2918–29, Dec 2005.
- [5] R. S. Barsoum, "Chronic kidney disease in the developing world," *N Engl J Med*, vol. 354, pp. 997–9, Mar 2006.
- [6] W. G. Couser, G. Remuzzi, S. Mendis, and M. Tonelli, "The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases," *Kidney Int*, vol. 80, pp. 1258–70, Dec 2011.
- [7] A. J. Collins, R. N. Foley, C. Herzog, B. Chavers, D. Gilbertson, A. Ishani, B. Kasiske, J. Liu, L.-W. Mau, M. McBean, A. Murray, W. St Peter, H. Guo, Q. Li, S. Li, S. Li, Y. Peng, Y. Qiu, T. Roberts, M. Skeans, J. Snyder, C. Solid, C. Wang, E. Weinhandl, D. Zaun, C. Arko, S.-C. Chen, F. Dalleska, F. Daniels, S. Dunning, J. Ebben, E. Frazier, C. Hanzlik, R. Johnson, D. Sheets, X. Wang, B. Forrest, E. Constantini, S. Everson, P. Eggers, and L. Agodoa, "United States Renal Data System 2008 Annual Data Report," *Am J Kidney Dis*, vol. 53, pp. S1–374, Jan 2009.
- [8] W. G. Couser, "Glomerulonephritis," *Lancet*, vol. 353, pp. 1509–15, May 1999.
- [9] S. J. Chadban and R. C. Atkins, "Glomerulonephritis," *Lancet*, vol. 365, no. 9473, pp. 1797–806, 2005.
- [10] B. Block, *Innere Medizin : Leitlinien 2007/2008 ; Zusammenstellung evidenzbasierter Leitlinien und Empfehlungen ; 108 Tabellen*. Stuttgart New York: Thieme, 2007.

- [11] D. H. Hooke, D. C. Gee, and R. C. Atkins, "Leukocyte analysis using monoclonal antibodies in human glomerulonephritis," *Kidney Int*, vol. 31, pp. 964–72, Apr 1987.
- [12] C. Kurts, F. Heymann, V. Lukacs-Kornek, P. Boor, and J. Floege, "Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology," *Semin Immunopathol*, vol. 29, pp. 317–35, Nov 2007.
- [13] X. R. Huang, S. R. Holdsworth, and P. G. Tipping, "Evidence for delayed-type hypersensitivity mechanisms in glomerular crescent formation," *Kidney Int*, vol. 46, pp. 69–78, Jul 1994.
- [14] I. Mellman and R. M. Steinman, "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines," *Cell*, vol. 106, pp. 255–8, Aug 2001.
- [15] T. Krüger, D. Benke, F. Eitner, A. Lang, M. Wirtz, E. E. Hamilton-Williams, D. Engel, B. Giese, G. Müller-Newen, J. Floege, and C. Kurts, "Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis," *J Am Soc Nephrol*, vol. 15, pp. 613–21, Mar 2004.
- [16] J. Scholz, V. Lukacs-Kornek, D. R. Engel, S. Specht, E. Kiss, F. Eitner, J. Floege, H.-J. Groene, and C. Kurts, "Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis," *J Am Soc Nephrol*, vol. 19, pp. 527–37, Mar 2008.
- [17] K. Hochheiser, D. R. Engel, L. Hammerich, F. Heymann, P. A. Knolle, U. Panzer, and C. Kurts, "Kidney Dendritic Cells Become Pathogenic during Crescentic Glomerulonephritis with Proteinuria," *J Am Soc Nephrol*, vol. 22, pp. 306–16, Feb 2011.
- [18] X. R. Huang, P. G. Tipping, J. Apostolopoulos, C. Oettinger, M. D'Souza, G. Milton, and S. R. Holdsworth, "Mechanisms of T cell-induced glomerular injury in anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in rats," *Clin Exp Immunol*, vol. 109, pp. 134–42, Jul 1997.
- [19] X. R. Huang, P. G. Tipping, L. Shuo, and S. R. Holdsworth, "Th1 responsiveness to nephritogenic antigens determines susceptibility to crescentic glomerulonephritis in mice," *Kidney Int*, vol. 51, pp. 94–103, Jan 1997.
- [20] A. R. Kitching, S. R. Holdsworth, and P. G. Tipping, "IFN-gamma mediates crescent formation and cell-mediated immune injury in murine glomerulonephritis," *J Am Soc Nephrol*, vol. 10, pp. 752–9, Apr 1999.

- [21] J. R. Timoshanko, S. R. Holdsworth, A. R. Kitching, and P. G. Tipping, "IFN-gamma production by intrinsic renal cells and bone marrow-derived cells is required for full expression of crescentic glomerulonephritis in mice," *J Immunol*, vol. 168, pp. 4135–41, Apr 2002.
- [22] J. S. Duffield, P. G. Tipping, T. Kipari, J.-F. Cailhier, S. Clay, R. Lang, J. V. Bonventre, and J. Hughes, "Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis," *Am J Pathol*, vol. 167, pp. 1207–19, Nov 2005.
- [23] S. R. Holdsworth, A. R. Kitching, and P. G. Tipping, "Th1 and Th2 T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis," *Kidney Int*, vol. 55, pp. 1198–216, Apr 1999.
- [24] H.-J. Paust, J.-E. Turner, O. M. Steinmetz, A. Peters, F. Heymann, C. Hölscher, G. Wolf, C. Kurts, H.-W. Mittrücker, R. A. K. Stahl, and U. Panzer, "The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis," *J Am Soc Nephrol*, vol. 20, pp. 969–79, May 2009.
- [25] 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, and U. Panzer, "Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis," *Kidney Int*, vol. 82, pp. 72–83, Jul 2012.
- [26] E. Bettelli, M. Dastrange, and M. Oukka, "Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, pp. 5138–43, Apr 2005.
- [27] W. Chen, W. Jin, N. Hardegen, K.-J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl, "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3," *J Exp Med*, vol. 198, pp. 1875–86, Dec 2003.
- [28] J. C. Marie, J. J. Letterio, M. Gavin, and A. Y. Rudensky, "TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells," *J Exp Med*, vol. 201, pp. 1061–7, Apr 2005.
- [29] J. D. Fontenot, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky, "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells," *Nat Immunol*, vol. 4, pp. 330–6, Apr 2003.
- [30] E. M. Shevach, R. A. DiPaolo, J. Andersson, D.-M. Zhao, G. L. Stephens, and A. M. Thorn-

- ton, "The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells," *Immunol Rev*, vol. 212, pp. 60–73, Aug 2006.
- [31] S. Sakaguchi, M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, and T. Nomura, "Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease," *Immunol Rev*, vol. 212, pp. 8–27, Aug 2006.
- [32] C. L. Bennett, J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs, "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3," *Nat Genet*, vol. 27, pp. 20–1, Jan 2001.
- [33] V. L. Godfrey, J. E. Wilkinson, and L. B. Russell, "X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse," *Am J Pathol*, vol. 138, pp. 1379–1387, Jun 1991.
- [34] D. Wolf, K. Hochegger, A. M. Wolf, H. F. Rumpold, G. Gastl, H. Tilg, G. Mayer, E. Gunsilius, and A. R. Rosenkranz, "CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice," *J Am Soc Nephrol*, vol. 16, pp. 1360–70, May 2005.
- [35] J. D. Ooi, S. L. Snelgrove, D. R. Engel, K. Hochheiser, I. Ludwig-Portugall, Y. Nozaki, K. M. O'Sullivan, M. J. Hickey, S. R. Holdsworth, C. Kurts, and A. R. Kitching, "Endogenous foxp3(+) T-regulatory cells suppress anti-glomerular basement membrane nephritis," *Kidney Int*, vol. 79, pp. 977–86, May 2011.
- [36] H.-J. Paust, A. Ostmann, A. Erhardt, J.-E. Turner, J. Velden, H.-W. Mittrücker, T. Sparwasser, U. Panzer, and G. Tiegs, "Regulatory T cells control the Th1 immune response in murine crescentic glomerulonephritis," *Kidney Int*, vol. 80, pp. 154–64, Jul 2011.
- [37] G. Bonizzi and M. Karin, "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity," *Trends Immunol*, vol. 25, pp. 280–8, Jun 2004.
- [38] S. L. Eck, N. D. Perkins, D. P. Carr, and G. J. Nabel, "Inhibition of phorbol ester-induced cellular adhesion by competitive binding of NF-kappa B in vivo," *Mol Cell Biol*, vol. 13, pp. 6530–6, Oct 1993.
- [39] T. Lawrence, D. W. Gilroy, P. R. Colville-Nash, and D. A. Willoughby, "Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation," *Nat Med*, vol. 7, pp. 1291–7, Dec 2001.

- [40] C. H. Y. Fong, M. Bebie, A. Didierlaurent, R. Nebauer, T. Hussell, D. Broide, M. Karin, and T. Lawrence, "An antiinflammatory role for IKKbeta through the inhibition of "classical"macrophage activation," *J Exp Med*, vol. 205, pp. 1269–76, Jun 2008.
- [41] B. Lin, C. Williams-Skipp, Y. Tao, M. S. Schleicher, L. L. Cano, R. C. Duke, and R. I. Scheinman, "NF-kappaB functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type," *Cell Death Differ*, vol. 6, pp. 570–82, Jun 1999.
- [42] K. W. McIntyre, D. J. Shuster, K. M. Gillooly, D. M. Dambach, M. A. Pattoli, P. Lu, X.-D. Zhou, Y. Qiu, F. C. Zusi, and J. R. Burke, "A highly selective inhibitor of I kappa B kinase, BMS-345541, blocks both joint inflammation and destruction in collagen-induced arthritis in mice," *Arthritis Rheum*, vol. 48, pp. 2652–9, Sep 2003.
- [43] S. Rajendrasozhan, J.-W. Hwang, H. Yao, N. Kishore, and I. Rahman, "Anti-inflammatory effect of a selective IkappaB kinase-beta inhibitor in rat lung in response to LPS and cigarette smoke," *Pulm Pharmacol Ther*, vol. 23, pp. 172–81, Jun 2010.
- [44] K. Ziegelbauer, F. Gantner, N. W. Lukacs, A. Berlin, K. Fuchikami, T. Niki, K. Sakai, H. Inbe, K. Takeshita, M. Ishimori, H. Komura, T. Murata, T. Lowinger, and K. B. Bacon, "A selective novel low-molecular-weight inhibitor of IkappaB kinase-beta (IKK-beta) prevents pulmonary inflammation and shows broad anti-inflammatory activity," *Br J Pharmacol*, vol. 145, pp. 178–92, May 2005.
- [45] S. Uota, M. Zahidunnabi Dewan, Y. Saitoh, S. Muto, A. Itai, A. Utsunomiya, T. Watanabe, N. Yamamoto, and S. Yamaoka, "An κ B kinase 2 inhibitor IMD-0354 suppresses the survival of adult T-cell leukemia cells," *Cancer Sci*, vol. 103, pp. 100–6, Jan 2012.
- [46] G. Xu, Y.-C. Lo, Q. Li, G. Napolitano, X. Wu, X. Jiang, M. Dreano, M. Karin, and H. Wu, "Crystal structure of inhibitor of κ B kinase β ," *Nature*, vol. 472, pp. 325–30, Apr 2011.
- [47] K. J. Assmann, M. M. Tangelder, W. P. Lange, T. M. Tadema, and R. A. Koene, "Membranous glomerulonephritis in the mouse," *Kidney Int*, vol. 24, pp. 303–12, Sep 1983.
- [48] P. G. Tipping and S. R. Holdsworth, "T cells in crescentic glomerulonephritis," *J Am Soc Nephrol*, vol. 17, pp. 1253–63, May 2006.
- [49] J. Hiscott, J. Marois, J. Garoufalos, M. D'Addario, A. Roulston, I. Kwan, N. Pepin, J. Lacoste, H. Nguyen, and G. Bensi, "Characterization of a functional NF-kappa B site in the human

- interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop," *Mol Cell Biol*, vol. 13, pp. 6231–6240, Oct 1993.
- [50] A. Sica, T. H. Tan, N. Rice, M. Kretzschmar, P. Ghosh, and H. A. Young, "The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF-kappa B binds to the intronic region of the human interferon-gamma gene at a site related to an interferon-stimulable response element," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, pp. 1740–1744, Mar 1992.
- [51] K. Hirota, H. Yoshitomi, M. Hashimoto, S. Maeda, S. Teradaira, N. Sugimoto, T. Yamaguchi, T. Nomura, H. Ito, T. Nakamura, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi, "Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model," *J Exp Med*, vol. 204, pp. 2803–2812, Nov 2007.
- [52] J. M. Kim and A. Rudensky, "The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells," *Immunol Rev*, vol. 212, pp. 86–98, Aug 2006.
- [53] O. W. Seo, J. H. Kim, K. S. Lee, K. S. Lee, J. H. Kim, M. H. Won, K. S. Ha, Y. G. Kwon, and Y. M. Kim, "Kurarione promotes TRAIL-induced apoptosis by inhibiting NF- κ B-dependent cFLIP expression in HeLa cells," *Exp Mol Med*, Aug 2012.
- [54] P. B. Thippogowda, V. Singh, P. C. Sundivakkam, J. Xue, A. B. Malik, and C. Tiruppathi, "Ca²⁺ influx via TRPC channels induces NF-kappaB-dependent A20 expression to prevent thrombin-induced apoptosis in endothelial cells," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 298, pp. C656–64, Mar 2010.
- [55] M. Schmidt-Supprian, G. Courtois, J. Tian, A. J. Coyle, A. Israël, K. Rajewsky, and M. Pasparakis, "Mature T cells depend on signaling through the IKK complex," *Immunity*, vol. 19, pp. 377–89, Sep 2003.
- [56] S. A. Summers, O. M. Steinmetz, M. Li, J. Y. Kausman, T. Semple, K. L. Edgton, D.-B. Borza, H. Braley, S. R. Holdsworth, and A. R. Kitching, "Th1 and Th17 cells induce proliferative glomerulonephritis," *J Am Soc Nephrol*, vol. 20, pp. 2518–24, Dec 2009.
- [57] Y. Zheng, M. Vig, J. Lyons, L. Van Parijs, and A. A. Beg, "Combined deficiency of p50 and cRel in CD4⁺ T cells reveals an essential requirement for nuclear factor kappaB in regulating mature T cell survival and in vivo function," *J Exp Med*, vol. 197, pp. 861–74, Apr 2003.

- [58] U. Senftleben, Z. W. Li, V. Baud, and M. Karin, "IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis," *Immunity*, vol. 14, pp. 217–230, Mar 2001.
- [59] J. W. Pierce, R. Schoenleber, G. Jesmok, J. Best, S. A. Moore, T. Collins, and M. E. Gerritsen, "Novel inhibitors of cytokine-induced I kappa Balpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo," *J Biol Chem*, vol. 272, pp. 21096–21103, Aug 1997.
- [60] J. E. Turner, H. J. Paust, O. M. Steinmetz, A. Peters, C. Meyer-Schwesinger, F. Heymann, U. Helmchen, S. Fehr, R. Horuk, U. Wenzel, C. Kurts, H. W. Mittrücker, R. A. Stahl, and U. Panzer, "CCR5 deficiency aggravates crescentic glomerulonephritis in mice," *J Immunol*, vol. 181, pp. 6546–6556, Nov 2008.
- [61] H. L. Pahl, "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors," *Oncogene*, vol. 18, pp. 6853–6866, Nov 1999.
- [62] U. Panzer, O. M. Steinmetz, J. E. Turner, C. Meyer-Schwesinger, C. von Ruffer, T. N. Meyer, G. Zahner, C. Gómez-Guerrero, R. M. Schmid, U. Helmchen, G. W. Moeckel, G. Wolf, R. A. Stahl, and F. Thaiss, "Resolution of renal inflammation: a new role for NF-kappaB1 (p50) in inflammatory kidney diseases," *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 297, pp. 429–439, Aug 2009.
- [63] L. W. Chen, L. Egan, Z. W. Li, F. R. Greten, M. F. Kagnoff, and M. Karin, "The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion," *Nat Med*, vol. 9, pp. 575–581, May 2003.
- [64] H. Lewis, W. Kaszubska, J. F. DeLamarter, and J. Whelan, "Cooperativity between two NF-kappa B complexes, mediated by high-mobility-group protein I(Y), is essential for cytokine-induced expression of the E-selectin promoter," *Mol Cell Biol*, vol. 14, pp. 5701–5709, Sep 1994.
- [65] M. Schmidt-Suppran, J. Tian, H. Ji, C. Terhorst, A. K. Bhan, E. P. Grant, M. Pasparakis, S. Casola, A. J. Coyle, and K. Rajewsky, "I kappa B kinase 2 deficiency in T cells leads to defects in priming, B cell help, germinal center reactions, and homeostatic expansion," *J Immunol*, vol. 173, pp. 1612–1619, Aug 2004.
- [66] U. Schatzmann, C. Haas, and M. Le Hir, "A Th1 response is essential for induction of

- crescentic glomerulonephritis in mice," *Kidney Blood Press Res*, vol. 22, no. 3, pp. 135–139, 1999.
- [67] I. Isomura, S. Palmer, R. J. Grumont, K. Bunting, G. Hoyne, N. Wilkinson, A. Banerjee, A. Proietto, R. Gugasyan, L. Wu, W. Li, A. McNally, R. J. Steptoe, R. Thomas, M. F. Shannon, and S. Gerondakis, "c-Rel is required for the development of thymic Foxp3⁺ CD4 regulatory T cells," *J Exp Med*, vol. 206, pp. 3001–14, Dec 2009.
- [68] A. Visekruna, M. Huber, A. Hellhund, E. Bothur, K. Reinhard, N. Bollig, N. Schmidt, T. Joeris, M. Lohoff, and U. Steinhoff, "c-Rel is crucial for the induction of Foxp3(+) regulatory CD4(+) T cells but not T(H)17 cells," *Eur J Immunol*, vol. 40, pp. 671–6, Mar 2010.
- [69] Q. Ruan, V. Kameswaran, Y. Tone, L. Li, H.-C. Liou, M. I. Greene, M. Tone, and Y. H. Chen, "Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome," *Immunity*, vol. 31, pp. 932–40, Dec 2009.
- [70] L. M. Williams and A. Y. Rudensky, "Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3," *Nat Immunol*, vol. 8, pp. 277–84, Mar 2007.
- [71] K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi, "CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function," *Science*, vol. 322, pp. 271–275, Oct 2008.
- [72] K. Hochheiser, D. R. Engel, L. Hammerich, F. Heymann, P. A. Knolle, U. Panzer, and C. Kurts, "Kidney Dendritic Cells Become Pathogenic during Crescentic Glomerulonephritis with Proteinuria," *J Am Soc Nephrol*, vol. 22, pp. 306–316, Feb 2011.
- [73] D. J. Campbell and M. A. Koch, "Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells," *Nat Rev Immunol*, vol. 11, pp. 119–30, Feb 2011.
- [74] S. Sakaguchi, K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, and T. Yamaguchi, "Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?," *Int Immunol*, vol. 21, pp. 1105–1111, Oct 2009.
- [75] S. Gerondakis and U. Siebenlist, "Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 2, p. a000182, May 2010.
- [76] M. Schmidt-Supprian, J. Tian, E. P. Grant, M. Pasparakis, R. Maehr, H. Ovaa, H. L. Ploegh,

- A. J. Coyle, and K. Rajewsky, "Differential dependence of CD4+CD25+ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, pp. 4566–71, Mar 2004.
- [77] L. L. Molinero, J. Yang, T. Gajewski, C. Abraham, M. A. Farrar, and M.-L. Alegre, "CARMA1 controls an early checkpoint in the thymic development of FoxP3+ regulatory T cells," *J Immunol*, vol. 182, pp. 6736–43, Jun 2009.
- [78] C.-W. J. Lio and C.-S. Hsieh, "A two-step process for thymic regulatory T cell development," *Immunity*, vol. 28, pp. 100–11, Jan 2008.
- [79] S. Z. Josefowicz and A. Rudensky, "Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance," *Immunity*, vol. 30, pp. 616–25, May 2009.
- [80] B. Salomon, D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J. A. Bluestone, "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes," *Immunity*, vol. 12, pp. 431–40, Apr 2000.
- [81] M. A. Burchill, J. Yang, K. B. Vang, and M. A. Farrar, "Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis," *Immunol Lett*, vol. 114, pp. 1–8, Nov 2007.
- [82] E. Gückel, S. Frey, M. M. Zaiss, G. Schett, S. Ghosh, and R. E. Voll, "Cell-intrinsic NF- κ B activation is critical for the development of natural regulatory T cells in mice," *PLoS One*, vol. 6, no. 5, p. e20003, 2011.
- [83] J. D. Fontenot, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky, "Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny," *J Exp Med*, vol. 202, pp. 901–6, Oct 2005.
- [84] R. Khattri, D. Kasprowicz, T. Cox, M. Mortrud, M. W. Appleby, M. E. Brunkow, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell, "The amount of scurf protein determines peripheral T cell number and responsiveness," *J Immunol*, vol. 167, pp. 6312–6320, Dec 2001.
- [85] R. Y. Lan, C. Selmi, and M. E. Gershwin, "The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2)," *J Autoimmun*, vol. 31, pp. 7–12, Aug 2008.
- [86] P. Ghosh, T. H. Tan, N. R. Rice, A. Sica, and H. A. Young, "The interleukin 2 CD28-

- responsive complex contains at least three members of the NF kappa B family: c-Rel, p50, and p65," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, pp. 1696–1700, Mar 1993.
- [87] M. E. Brunkow, E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepers, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell, "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse," *Nat Genet*, vol. 27, pp. 68–73, Jan 2001.
- [88] J. Liddle, P. Bamborough, M. D. Barker, S. Campos, R. P. C. Cousins, G. J. Cutler, H. Hobbs, D. S. Holmes, C. Ioannou, G. W. Mellor, M. A. Morse, J. J. Payne, J. M. Pritchard, K. J. Smith, D. T. Tape, C. Whitworth, and R. A. Williamson, "4-Phenyl-7-azaindoles as potent and selective IKK2 inhibitors," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 19, pp. 2504–8, May 2009.
- [89] T. Luedde, U. Assmus, T. Wüstefeld, A. Meyer zu Vilsendorf, T. Roskams, M. Schmidt-Suprian, K. Rajewsky, D. A. Brenner, M. P. Manns, M. Pasparakis, and C. Trautwein, "Deletion of IKK2 in hepatocytes does not sensitize these cells to TNF-induced apoptosis but protects from ischemia/reperfusion injury," *J Clin Invest*, vol. 115, pp. 849–859, Apr 2005.
- [90] U. Siebenlist, G. Franzoso, and K. Brown, "Structure, regulation and function of NF-kappa B," *Annu Rev Cell Biol*, vol. 10, pp. 405–455, 1994.
- [91] J. A. DiDonato, F. Mercurio, and M. Karin, "NF-κB and the link between inflammation and cancer," *Immunol Rev*, vol. 246, pp. 379–400, Mar 2012.
- [92] F. R. Greten, L. Eckmann, T. F. Greten, J. M. Park, Z. W. Li, L. J. Egan, M. F. Kagnoff, and M. Karin, "IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer," *Cell*, vol. 118, pp. 285–296, Aug 2004.
- [93] T. Hettmann, J. DiDonato, M. Karin, and J. M. Leiden, "An essential role for nuclear factor kappaB in promoting double positive thymocyte apoptosis," *J Exp Med*, vol. 189, pp. 145–58, Jan 1999.
- [94] R. H. Swanborg, "Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity," *Immunol Rev*, vol. 184, pp. 129–135, Dec 2001.

8 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A

ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AP	Alkalische Phosphatase

B

BSA	Bovine Serum Albumin
-----	----------------------

C

CD	Cluster of Differentiation
CT	cycle threshold
cpm	counts per minute
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
CO ₂	Kohlendioxid

D

d	Tag(e)
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DEPC	Diethyldicarbonat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay

ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
F	
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FW	Forward
G	
°C	Grad Celsius
g	Gramm
H	
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
h	Stunde(n)
I	
IL	Interleukin
IgG	Immunglobulin Klasse G
K	
KCl	Kaliumchlorid
L	
l	Liter
M	
mol	Mol
min	Minute(n)

Mio.	Million
ml	Milliliter (Liter x 10 ⁻³)
mg	Milligramm (Gramm x 10 ⁻³)
MMLV	Moloney murine leukemia virus
mRNA	messenger ribonucleic acid
N	
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm (Gramm x 10 ⁻⁹)
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NaIO ₃	Natriumiodat
NaNO ₂	Natriumnitrit
nmol	Nanomolar (Mol x 10 ⁻⁹)
NTN	Nephrotoxische Serum Nephritis
NP-40	Nonylphenoethoxylat MG 40
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
P	
P	Phosphor
PAS	Periodic Acid Schiff stain
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PNK	Polynucleotidkinase
pmol	Pikomol (Mol x 10 ⁻¹²)

pg	Pikogramm (Gramm x 10 ⁻¹²)
PCR	Polymerase Chain Reaction
Q	
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
R	
RNA	Ribonucleis Acid
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RV	Reverse
RT	Raumtemperatur
RPMI 1640	Zellmedium von Roswell Park Memorial Institute entwickelt
S	
s	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler
T	
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Treg	regulatorische T-Zelle (CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺)
Tresp	Responder-T-Zelle (CD4 ⁺)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TBE	Tris-Borat-EDTA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
U	
U	Umdrehungen

μg	Mikrogramm (Gramm $\times 10^{-6}$)
V	
V	Volt
W	
WT	Wildtyp
Y	
YFP	Yellow Fluorescent Protein

H&P-Sätze

β-Mercaptoethanol

H: 301-310-330-315-318-410

P: 280-273-302+352-304+340-305+351+338-309-310



DTT

H: 302-315-319

P: 302+352-305+351+338



EDTA

H: 319

P: 305+351+338



Ethanol

H: 225

P: 210



Ethidiumbromid

H: 341-330-302

P: 281-302+352-305+351+338-304+340-309-310



Formalin

H: 351-331-311-301-314-317

P: 301+310-303+361+353-305+351+338 320-361-405-501



Ionomycin

H: 302



Isofluran	H: 336 P: 304+340-312-403+233-405-501 
Perjodsäure	H: 271-314 P: 210-301+330+331-305+351+338  
PMA	H: 315 
Salzsäure	H: 314-335 P: 260-301+330+331-303+361+353 305+351+338-405-501  
Trypanblau	H: 350 P: 201-308+313 

Verwendete krebserregende, erbgutverändernde und fortpflanzungsgefährdende Stoffe (KMR-Stoffe)

Ethidiumbromid	KMR Stoff Kategorie 2
----------------	-----------------------

Lebenslauf

Eveline Christina Piotrowski, geb. Piella
geboren am 02.03.1983 in Peiskretscham
verheiratet

Beruflicher Werdegang

seit Januar 2010	Promotion in der III. Medizinischen Klinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Thema: „Die Rolle von NF- κ B in der Glomerulonephritis“, Prof. Dr. Thaiss Disputation 13. Dezember 2012
seit Mai 2008	wissenschaftliche Tätigkeit in der III. Medizinischen Klinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Februar - März 2008	Praktikum Universität Düsseldorf, Institut für Pharmakologie, Prof. Dr. Kojda
seit Februar 2008	nebenberufliche Tätigkeit in öffentlicher Apotheke

Ausbildung

Januar 2008	Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung (Note 2,0)
Mai - Oktober 2007	Pharmaziepraktikum in der Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
November 2006 - Mai 2007	Pharmaziepraktikum in der Sanavita Apotheke Oberhausen
Oktober 2002 - Oktober 2006	Pharmaziestudium an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf Zweiter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung Oktober 2006 (Note 1,4) Erster Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung August 2004 (Note 3,25)
Juni 2002	Abitur (Note 1,6)

Versicherung an Eides statt

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine andere Quelle als die angegebenen benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die vorliegende Arbeit mit dem Titel

Rolle von NF- κ B in der experimentellen Glomerulonephritis

**Einfluss einer NF- κ B-Hemmung auf infiltrierende Immunzellen in der
nephrotoxischen Nephritis**

habe ich noch keiner anderen Universität vorgelegt, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Hamburg, den 01. November 2012

Eveline Piotrowski

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Der vorgelegten Arbeit ging ein früherer Promotionsversuch voraus. Von Mai 2008 bis September 2009 hatte ich an einer Promotion in der III. Medizinischen Klinik des UKE in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Algenstaedt gearbeitet. Diese Arbeit wurde aufgrund struktureller Änderungen in der III. Medizinischen Klinik abgebrochen.

Hamburg, den 1. November 2012

Eveline Piotrowski

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thaiss möchte ich für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und die zuverlässige Zusammenarbeit sehr danken.

Herrn Prof. Dr. Duchstein danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit, sowie für die netten Doktorandentreffen.

Bei Dr. Zahner möchte ich mich für die wissenschaftlichen Austausch, die Unterstützung in der Einarbeitung und die konstruktiven Diskussionen bedanken.

Ich danke Prof. Dr. Panzer für die Integration in die Klinische Forschergruppe und die konstruktive Kritik.

Prof. Dr. Stahl danke ich für die Möglichkeit zur Promotion in der III. Medizinischen Klinik.

Ich danke Prof. Dr. Kurts, André Tittel, Janine Gotot und Martin Otte für die spannende wissenschaftliche Kooperation und den regen Austausch.

Bei Dr. Annette Erhardt möchte ich mich für die Hilfestellungen zum Suppressionsassay bedanken.

Meinen Kollegen in den Laboren der III. Medizinischen Klinik danke ich für jegliche organisatorische Hilfe und Unterstützung, sowie die nette Zusammenarbeit.

Vielen Dank an die Tierpfleger aus Barriere 104, vor allem Ivonne Deutschmann, die uns durch ihre aufmerksame Arbeit auf den Phänotyp der $\text{Foxp3}^{\text{Cre}}\text{IKK2}^{\text{fl/fl}}$ Maus hingewiesen hat und meine Arbeit an diesen Tieren zu jeder Tageszeit unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt meiner Kollegin und Freundin Anna Hermann für die perfekte Zusammenarbeit im Labor, die motivierenden Worte und die tolle gemeinsame Zeit.

Ich danke meinem Mann Robert für das kritische Lesen meiner Arbeit, die ermunternden Zeichnungen, die Hilfe bei Layout und Setzen mit $\text{\LaTeX}$ und dass er immer für mich da ist.

Ich danke von Herzen meinen Eltern Lydia und Heinrich Piella, die mir diesen Weg erst ermöglicht haben und mich in jeglicher Hinsicht uneingeschränkt unterstützen.