

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin
III. Medizinische Klinik und Poliklinik
Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

**Die Rolle der Prostaglandinrezeptoren EP2 und EP4 bei
Foxp3-positiven T-regulatorischen Zellen
in der nephrotoxischen Serumnephritis
der Maus**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Julia Berliner
aus Buchholz in der Nordheide

Hamburg 2012

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.05.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. G. Zahner

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. J. Oh

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

Meinen Eltern, die mich
unterstützen, was auch immer
ich tue

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
1. Einleitung	10
1.1. Die Niere und Glomerulonephritis	11
1.2. Der Prostanoid-Metabolismus	12
1.3. Das NTN-Modell, Th-Zellen und Tregs	19
1.4. Arbeitshypothese und Fragestellung	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Tabellen	
➤ Chemikalien und Enzyme	25
➤ Puffer und Lösungen	26
➤ Verbrauchsmaterial	28
➤ Kits und gebrauchsfertige Reaktionssysteme	29
➤ Geräte	30
➤ Primer	31
2.2. Tierhaltung	33
2.3. Herstellung des Antikörperserums	33
2.4. Induktion der Nephrotoxischen Serum Nephritis (NTN)	33
2.5. Urin-, Plasma- und Organgewinnung	34
2.6. Albumin ELISA	35
2.7. Gewinnung genomischer DNA	37
2.8. Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung	37
2.9. Quantitative Real-Time PCR	39
2.10. Histologien, PAS-Score und immunhistologische Auszählung	43
2.11. Statistik	44

	Seite
3. Ergebnisse	45
3.1. Transgene Tiere	46
3.2. Genotypisierung	48
3.3. Experimentelles Layout	52
3.4. Bindung von Schaf IgG im Glomerulum	53
3.5. Vergleich Wildtyp mit Foxp3 Cre	
3.5.1. Nierenfunktion	55
3.5.2. Glomerulärer Schaden	57
3.5.3. Tubulo-interstitieller Zellinflux	58
3.5.4. mRNA-Expression proinflammatorischer Marker	59
3.6. Nierenfunktion in der NTN	
3.6.1. Albumin/Kreatinin Ratio	62
3.6.2. BUN	63
3.7. Schädigung der Glomeruli	
3.7.1. PAS-Score	64
3.7.2. Halbmondbildung	66
3.8. Infiltrationsverhalten verschiedener Immunzellen	
3.8.1. CD3 positive Zellen	67
3.8.2. F4/80 positive Zellen	69
3.8.3. Foxp3 positive Zellen	71
3.9. mRNA-Expression der Entzündungsmediatoren	
3.9.1. CCL2	73
3.9.2. Cox2	74
3.9.3. TNF α	75
3.9.4. IL-6	76
4. Diskussion	77
4.1. Nierenfunktion und Schaden	78
4.2. Infiltration von Immunzellen und mRNA-Expression	79
4.3. Ausblick	83

	Seite
Zusammenfassung in deutscher und englischer Sprache	86
Literaturverzeichnis	88
Danksagung	91
Lebenslauf	92
Eidesstattliche Erklärung	93

Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
Aqua dest.	Destilliertes Wasser

B

β -SH	β -Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
BUN	Blood Urea Nitrogen (Stickstoffanteil des Harnstoffes im Blut)
bzw.	beziehungsweise

C

$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CCL2	CysCys-Chemokin 2 (ehemals MCP-1 / Monocyte Chemoattractant Protein 1)
CD3	Cluster of differentiation Rezeptor 3
CD4	Cluster of differentiation Rezeptor 4
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
cm	Zentimeter
Cox1	Cyclooxygenase 1
Cox2	Cyclooxygenase 2
Cre	Cyclization recombinase
CT	Cycle Treshold

D

DAG	Diacylglycerol
DC	Dendritische Zelle
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

E

EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
EGF	Epidermal Growth Factor = Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EP1	Prostaglandin E Rezeptor 1
EP2	Prostaglandin E Rezeptor 2
EP3	Prostaglandin E Rezeptor 3
EP4	Prostaglandin E Rezeptor 4

F

F4/80	Murines Protein, das von Makrophagen auf der Zelloberfläche exprimiert wird
Foxp3	Forkhead box Protein 3

G

g	Gramm
g (X)	Gravity / Schwerkraft, universelle Konstante, repräsentiert die Erdanziehungskraft. Die relative Zentrifugalkraft (rcf / relative centrifugal force / g-force) wird in dieser Arbeit als Vielfaches von g angegeben
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GN	Glomerulonephritis

H

h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
hpf	High-Power-Field
HRP	Horseradish peroxidase

I

IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
INF γ	Interferon γ
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat

K

Kon	Kontrolle
-----	-----------

L

L	Liter
lpf	Low-Power-Field

M

M	Molarität
mA	Milliampere
MDB	Membrane Desalting Buffer
mg	Milligramm
MHC II	Major Histocompatibility Complex II = Haupthistokompatibilitätskomplex II
min	Minute(n)
ml	Milliliter
M-MLV	Moloney Mäuse Leukämie Virus
MPGN	Membranoproliferative Glomerulonephritis
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure

N

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Natriumhydrogenphosphat
NH_4	Ammonium
nm	Nanometer
NTN	Nephrotoxische Serum Nephritis
NTS	Nephrotoxisches Serum

P

p.A.	pro analysi (analytischer Reinheitsgrad)
PAS	Periodic acid Schiff stain
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PG	Prostaglandin/e
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PIP_2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PLA_2	Phospholipase A_2
PGD_2	Prostaglandin D_2
PGE_2	Prostaglandin E_2
$\text{PGF}_{2\alpha}$	Prostaglandin $F_{2\alpha}$
PGH_2	Prostaglandin H_2
PGI_2	Prostaglandin I_2
PGK-neo	Phosphoglycerin Kinase - Neomycin

Q

qRT-PCR	quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion
---------	--

R

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPGN	Rasch Progressive Glomerulonephritis
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur

S

sec	Sekunden
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler

T

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAG	Triacylglycerin
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF β	Tumor Growth Factor β = Tumor Wachstumsfaktor β
Th1	T-Helferzelle 1
Th2	T-Helferzelle 2
Th17	T-Helferzelle 17
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF α	Tumor Nekrosefaktor α
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Treg	T-regulatorische Zelle
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurate
TXA ₂	Thromboxan A ₂

U

U	Unit, Einheit
μ g	Mikrogramm

μ l Mikroliter

V

V Volt

W

WT Wildtyp (C57BL6/J)

Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abb. 1	Schematische Darstellung der Prostaglandinsynthese	13
Abb. 2	Schematische Darstellung der PGE ₂ -Rezeptoren und ihrer Signalwege	15
Abb. 3	Schematische Darstellung der Th1- und Th17-Differenzierung unter dem Einfluss von PGE ₂	18
Abb. 4	Schematische Darstellung der Differenzierung verschiedener T-Zellsubtypen aus der naiven T-Zelle	20
Abb. 5	Sandwich-ELISA	35
Abb. 6	Schematische Darstellung des Cre/loxP Systems	47
Abb. 7	Beispiel einer Foxp3 Cre PCR	49
Abb. 8	Beispiel einer EP2ko PCR	50
Abb. 9	Beispiel einer EP4 flox PCR	51
Abb. 10	Experimentelles Layout	52
Abb. 11	Exemplarische Schaf IgG-Färbungen aller Tiergruppen	54
Abb. 12	Vergleich WT mit Foxp3 Cre: Nierenfunktionsparameter	56
Abb. 13	Vergleich WT mit Foxp3 Cre: Glomerulärer Schaden	57
Abb. 14	Vergleich WT mit Foxp3 Cre: Tubulo-interstitieller Zellinflux	58
Abb. 15	Vergleich WT mit Foxp3 Cre: mRNA-Expression von Entzündungsmarkern	60
Abb. 16	Nierenfunktion: Albumin/Kreatinin Ratio an Tag 3 und Tag 9	62
Abb. 17	Nierenfunktion: BUN an Tag 10	63
Abb. 18	Glomeruläre Schädigung: Arbiträrer PAS-Score an Tag 10	64
Abb. 19	Exemplarische PAS-Färbungen aller Tiergruppen	65

		Seite
Abb. 20	Glomeruläre Schädigung: Halbmondbildung an Tag 10	66
Abb. 21	Influx CD3-positiver Zellen an Tag 10	67
Abb. 22	Exemplarische CD3-Färbungen aller Tiergruppen	68
Abb. 23	Influx F4/80-positiver Zellen an Tag 10	69
Abb. 24	Exemplarische F4/80-Färbungen aller Tiergruppen	70
Abb. 25	Influx Foxp3-positiver Zellen an Tag 10	71
Abb. 26	Exemplarische Foxp3-Färbungen aller Tiergruppen	72
Abb. 27	mRNA-Expression CCL2	73
Abb. 28	mRNA-Expression Cox2	74
Abb. 29	mRNA-Expression TNF α	75
Abb. 30	mRNA-Expression IL-6	76

Tabellenverzeichnis

	Seite	
Tab. 1	Verwendete Chemikalien und Enzyme	25
Tab. 2	Puffer und Lösungen	26
Tab. 3	Verbrauchsmaterial	28
Tab. 4	Kits und gebrauchsfertige Reaktionssysteme	29
Tab. 5	Geräte	30
Tab. 6	Primer	31
Tab. 7	Spritzschema NTN-Serum	34
Tab. 8	Urinverdünnung	36
Tab. 9	PCR-Programme	38
Tab. 10	Mastermix-Ansätze für die cDNA Synthese	41
Tab. 11	RNA-Targets und Mastermix-Ansatz für die qRT-PCR	42
Tab. 12	Programm für die qRT-PCR	43
Tab. 13	Bewertungsschema PAS-Score	44
Tab. 14	Die genetischen Eigenschaften der Versuchstiere	48

1. Einleitung

1.1. Die Niere und Glomerulonephritis

1.2. Der Prostanoid-Metabolismus

- Synthese,
- Subtypen
- Rezeptoren
- PGs in der Niere: Physiologisch und in der Entzündung

1.3. Das NTN-Modell, Th-Zellen und Tregs

1.4. Arbeitshypothese und Fragestellung

1.1. Die Niere und Glomerulonephritis

Die Niere erfüllt vielfältige Aufgaben im Körper. Dazu gehören die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, die Homöostase von Elektrolyt- und Mineralhaushalt, die langfristige Blutdruckregulation, der Metabolismus von Proteinen, Hormonen und Gluconeogenese und die Hormonbildung z.B. von Calcitriol, Erythropoetin und Angiotensin (1). Um diese Funktionen zu gewährleisten, wird die Niere mit 1,2 L/min Blut versorgt, und ist damit eines der am meisten durchbluteten Organe des Körpers.

Das Nephron ist die funktionelle Einheit der Niere, in der das Blut filtriert, harnpflichtige Substanzen ausgeschieden und wichtige Bestandteile rückresorbiert werden. Eine Untereinheit des Nephrons ist das Glomerulum, in dem in vielen Gefäßschleifen über gefensterte Kapillaren, die Basalmembran und die Schlitzmembran 180 L/d Primärharn abfiltriert werden. Die komplexe Struktur dieses glomerulären Filters erlaubt die starke Filterleistung, die das Blut effektiv reinigt, aber keine Proteinverluste zulässt.

Schäden in diesem System ziehen schwere Erkrankungen bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz nach sich. Glomerulonephritiden sind mit 15 % die zweithäufigste Ursache für terminale Niereninsuffizienz (2). Die Mehrheit der verschiedenen Arten von Glomerulonephritis (GN) sind immun vermittelte Erkrankungen durch Selbst- oder Fremdartigene. Die verschiedenen Antigene sind sehr heterogen, was die große Vielfalt der Arten der GN erklärt. Sie rufen eine lokale Entzündung hervor, die das Nierengewebe beschädigt oder gar zerstört. Dabei hängt die Art der Immunantwort auf die Antigene von Stärke und Art der T-Zell Reaktion ab.

Es gibt Arten der GN, die besonders durch eine T-helfer1-Zellantwort (Th1) geprägt sind und klinisch schwere Verläufe zeigen. Dazu gehören die Membranproliferative GN (MPGN) und die Rasch Progressive GN (RPGN) (3). Die RPGN wird nach Antigen und Ablagerungsart in drei Subtypen unterschieden: Die Immunkomplex-GN, die ANCA-assoziierte Vaskulitis und die Anti-glomeruläre Basalmembran GN (Anti-GBM GN) (2).

Klinisch äußern sich diese Formen der GN durch einen raschen Beginn und Fortschreiten der Erkrankung mit hohem Blutdruck, starker Proteinurie und Nierenversagen bis zur Dialysepflichtigkeit innerhalb von Wochen. Die humane Anti-GBM RPGN ist immunpathologisch das Korrelat zu dem in dieser Arbeit verwendeten murinen Nephrotoxischen Nephritis-Modell (NTN-Modell).

1.2. Der Prostanoid-Metabolismus

Prostaglandine (PG) sind Gewebshormone, die ubiquitär im Körper vorkommen. Aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit werden PG lokal produziert und wirken auch lokal. PG werden aus Arachidonsäure gebildet, die ausschließlich in membrangebundenen Phospholipiden vorkommt. Um die Arachidonsäure aus dieser Esterbindung zu lösen, wird vor allem die zytosolische Phospholipase A₂ (PLA₂) aktiv. Da Arachidonsäure lipophil und damit schwer zu speichern ist, darf sie erst bei Bedarf freigesetzt werden. Daher ist die Aktivität der PLA₂ reguliert. Stimuliert wird sie durch verschiedene Hormone, z.B. Bradykinin und Angiotensin II (Blutdruckregulation) oder Wachstumsfaktoren (EGF). Auch entzündungsfördernde Zytokine wie IL-1 β erhöhen die Aktivität und die Neusynthese von PLA₂ (4, 5).

Die dann frei vorliegende Arachidonsäure wird durch die Cyclooxygenasen 1 oder 2 (Cox1, Cox2) in das Zwischenprodukt Prostaglandin H₂ (PGH₂) umgewandelt. Ob dies durch Cox1 oder Cox2 geschieht, hängt von Ort und Gewebezustand ab. Man nimmt an, dass Cox1 ein konstitutives Enzym ist und in den meisten Körpergeweben vorkommt, während Cox2 ein induzierbares Enzym ist und hauptsächlich im entzündeten Gewebe vorkommt (6). Stimuli für die Induktion können von Immunzellen produzierte Zytokine oder Zellwandbestandteile von Gram-negativen Bakterien sein.

Das Zwischenprodukt PGH₂ wird dann von verschiedenen Synthasen zu den unterschiedlichen PG-Subtypen prozessiert. Zu diesen Subtypen gehören unter anderem die Prostaglandine D₂, E₂, F_{2 α} und I₂, siehe **Abb. 1**. Ferner wird Thromboxan A₂ (TXA₂) gebildet, das vor allem in Thrombozyten vorkommt und bei der Plättchenaggregation eine Rolle spielt (5).

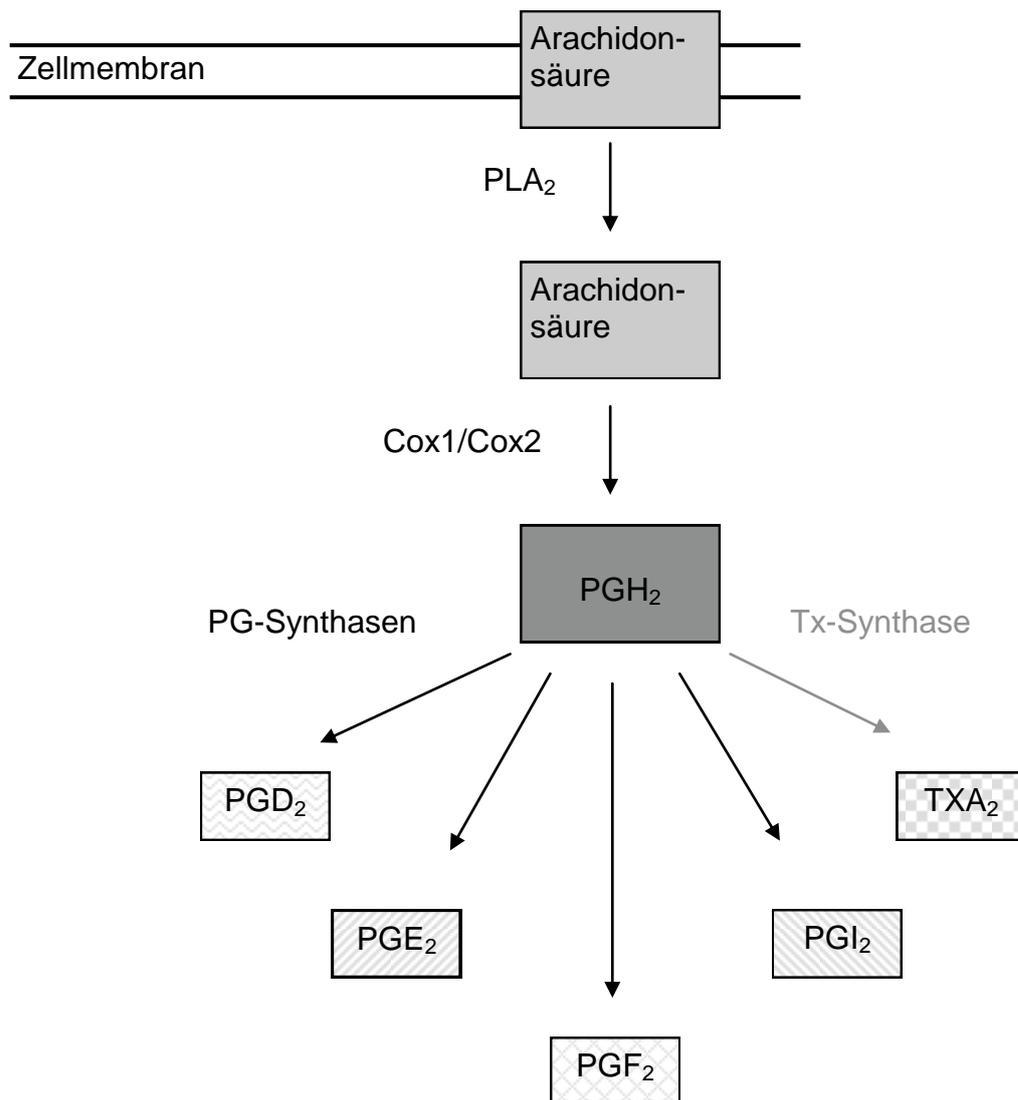


Abb. 1: Schematische Darstellung der Prostanoidsynthese

Die Ausgangssubstanz Arachidonsäure wird von der Phospholipase A₂ (PLA₂) aus der Membran gelöst. Die Cyclooxygenase 1 oder 2 formt das Zwischenprodukt Prostaglandin H₂ (PGH₂), woraus durch verschiedene Enzyme u.a. die Prostaglandin-Subtypen D₂, E₂, F_{2α} und I₂ sowie Thromboxan A₂ (TXA₂) gebildet werden.

PG weisen eine extrem vielfältige biologische Aktivität auf. Sie vermitteln beispielsweise An- und Entspannung glatter Muskulatur, Hemmung und Steigerung der Neurotransmitterfreisetzung, Hemmung der Lipolyse und Hemmung der Magensäurefreisetzung. Für diese Arbeit von Bedeutung ist im Wesentlichen die PG-vermittelte Hemmung der Entzündungsmediatorfreisetzung, die Hemmung der Immunglobulin-Expression und damit die Immunoregulation (7).

Dieses extrem vielfältige Wirkungsschema, bei dem teilweise sogar bei gleichem Stimulus unterschiedliche oder gar antagonistische Reaktionen hervorgerufen werden, scheint zunächst unerklärlich. Es wird nicht nur durch die verschiedenen PG-Subtypen ermöglicht, sondern vor allem durch eine große Anzahl unterschiedlicher Rezeptoren. Jede PG-Gruppe hat ihren eigenen Rezeptortyp (7). Die meisten dieser Sieben-Transmembran-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und nutzen den Signalweg einer cAMP-Konzentrationsänderung.

Besonders komplex ist die Signaltransduktion im Falle der für diese Arbeit relevanten PGE₂-Rezeptoren EP1-EP4. Der EP3 Rezeptor weist bei der Maus außerdem drei Unterformen, α , β und γ , auf. Beim Menschen sind es sogar sieben Spleißvarianten. Je nach Subtyp aktivieren oder inhibieren EP-Rezeptoren die Adenylatzyklase, erhöhen die zytosolische Ca²⁺-Konzentration oder nutzen den Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) Signalweg, siehe **Abb. 2**. Diese verschiedenartigen Signalwege, ein Zelltyp-spezifisches Expressionsmuster der Rezeptoren und Regulationsmechanismen zur vermehrten oder verminderten Rezeptorexpression ermöglicht die vielfältige Wirkungsweise (4, 5).

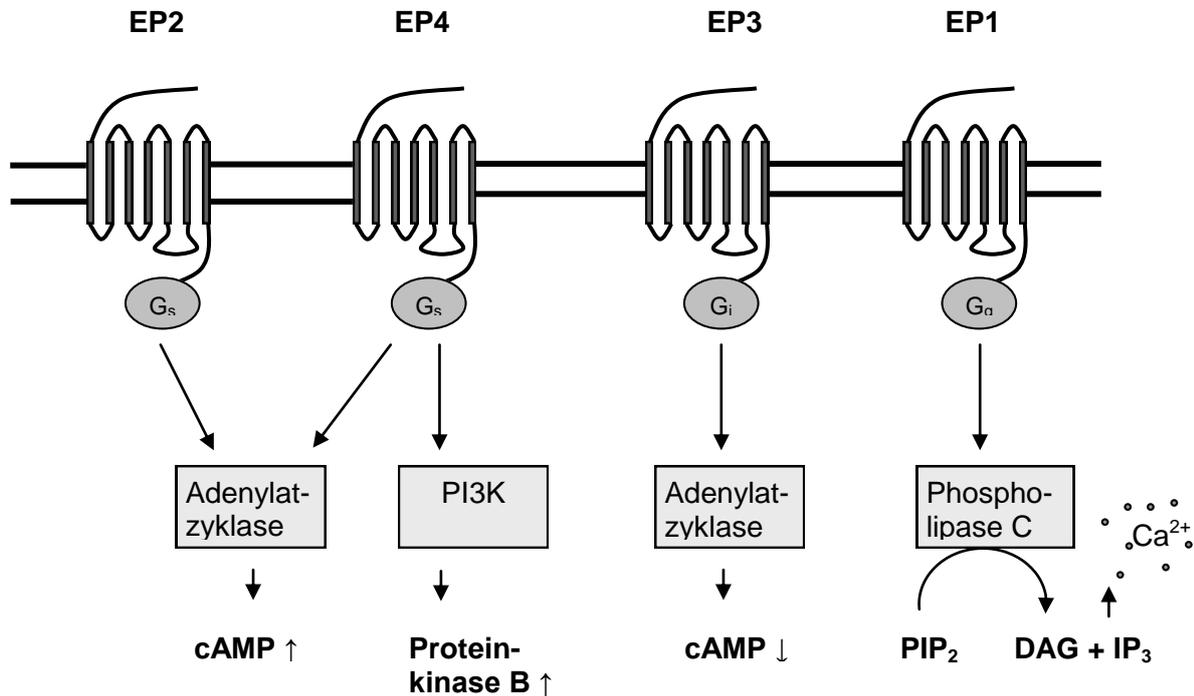


Abb. 2: Schematische Darstellung der PGE₂-Rezeptoren und ihrer Signalwege

Die Rezeptoren EP1 – EP4 sind G-Protein gekoppelt. EP2 und EP4 bewirken eine Stimulation der Adenylatzyklase, EP3 eine Hemmung. Die Adenylatzyklase synthetisiert cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP). EP4 kann zusätzlich den PI3K-Signalweg aktivieren. EP1 bewirkt eine Ca²⁺-Freisetzung mithilfe der Phospholipase C. Diese setzt Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) um. IP₃ öffnet Ca²⁺-Kanäle im Endoplasmatischen Retikulum und erhöht so seine Konzentration im Zytoplasma.

Abbildung modifiziert nach: Legler et al (44)

Selbst mit der Vielfalt an PG-Rezeptoren, ihrem Expressionsmuster und ihren unterschiedlichen Signalwegen konnten nicht alle beobachteten Phänomene der PGE₂-Wirkung erklärt werden. Viele *in vitro* Versuche legten die Annahme nahe, dass PGE₂ einen immunsuppressiven Effekt hat (19). Doch diese Annahme ließ sich *in vivo* nicht immer eindeutig bestätigen. Hier wurde auch ein immunaktivierender Effekt gezeigt (8, 9). Laut Sakata et al (9) ist dies auf den Einfluss des T-Zell Rezeptors (TCR) zurückzuführen. Möglicherweise sind noch weitere Einflussfaktoren unentdeckt. Der PGE₂-Signalweg ist also nicht isoliert zu betrachten, sondern als Teil eines Wirkungssystems.

PGE₂ spielt physiologisch eine wichtige Rolle in der Niere. Das Nierenmark gehört zu den am meisten PG produzierenden Geweben des Körpers. Innerhalb der Niere gibt es starke Unterschiede in Quantität und Expressionsmuster der PG-Produktion. Beispielsweise wurde die Prostaglandin-Synthase in den Endothelzellen der Arterien und Arteriolen nachgewiesen, nicht aber in Kapillaren und Venen (10). Auch mesangiale Zellen (11), interstitielle Zellen (12) und die Zellen der Sammel tubuli (13) produzieren PG.

Es gilt als erwiesen, dass PG in der Niere durch Vasodilatation den renalen Blutfluss und damit die glomeruläre Filtration reguliert. Auch die Renin- und Erythropoetin-Freisetzung und die Urin-Aufkonzentrierung sowie die Elektrolyt-Rückresorption werden mit PG in Verbindung gebracht (1, 14).

Diesen Befunden entsprechend, wurden auch in diesen Regionen EP-Rezeptoren nachgewiesen. In der humanen Niere haben *Breyer et al* den EP1- und EP3-Rezeptor in den Sammel tubuli nachgewiesen. Der EP4-Rezeptor fand sich in den Glomeruli. EP2-Rezeptoren konnten auf Nierenzellen nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (15).

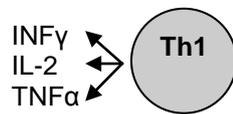
Auch pathophysiologisch spielen die PG eine wichtige Rolle in der Niere. Als Vasodilatoren haben sie beispielsweise einen hohen Stellenwert im Erhalt des renalen Blutflusses im Falle eines starken Blutdruckabfalls. Auch bei Bluthochdruck wird eine Beteiligung diskutiert, wobei unklar ist, ob PG hier primär oder sekundär erhöht sind (16).

Wie bereits erwähnt, spielen die PG auch eine wesentliche Rolle im Entzündungsgeschehen und der Immunantwort. Im entzündeten Gewebe herrschen andere Bedingungen als im Gesunden. Beispielsweise ändern sich der pH-Wert und das Verhältnis der Cyclooxygenasen. Es wird vermehrt Cox2 und PGE-Synthetase gebildet (17). Die Produktion der PG ändert sich in Quantität und Expressionsmuster. Auch die EP-Rezeptorexpression ist induzierbar durch Entzündungsreize (18). Eine vermehrte Produktion der PG im entzündeten Gewebe ist vor allem auf die Produktion der eingewanderten Immunzellen zurückzuführen (5).

T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen exprimieren EP1-, EP2- und EP4-Rezeptoren. Der EP3-Rezeptor war nur auf B-Zellen und Makrophagen, nicht aber auf T-Zellen nachzuweisen (19). Immunzellen produzieren PG und Zytokine, um die Art und Stärke ihrer Immunantwort zu dirigieren und regulieren. Die Ausdifferenzierung der CD4 positiven T-Helferzellen (CD4+ Th-Zellen) in ihre Subtypen ist ein wichtiges Beispiel hierfür. Die zur Zeit bekannten und charakterisierten Subtypen, die sich aus einer naiven CD4+ Th-Zelle entwickeln können, sind Th1, Th2, Th17 und T-regulatorische Zellen (Treg). Jeder dieser Subtypen braucht zur Ausdifferenzierung verschiedene Stimuli. Es handelt sich dabei um ein komplexes Gemisch aus Zytokinen und Rezeptorwechselwirkungen. Diese werden von umliegenden Immunzellen generiert bzw. der T-Zell Rezeptor (TCR) stimuliert. Die entstandenen Subtypen haben wiederum ein eigenes Expressionsmuster verschiedener Faktoren, die regulierend wirken. Beispielsweise produzieren Th1-Zellen Zytokine, die die Differenzierung von Th2-Zellen unterdrücken und somit eine weitere Förderung einer Th1-Zellantwort bewirken. Auch die Differenzierung von Th17-Zellen und Tregs verhält sich reziprok (20, 21), siehe **Abb. 3**.

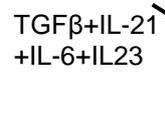
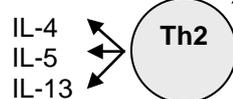
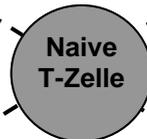
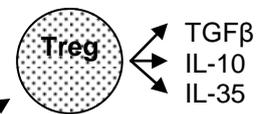
Aktivierung und Differenzierung

➤ **Makrophagen**



Regulation und Hemmung

➤ **Th-Zellen**



Aktivierung und Differenzierung

➤ **B-Zellen**
 ➤ **Mastzellen**
 ➤ **Basophile und Eosinophile Granulozyten**

Rekrutierung

➤ **Neutrophile Zellen**

Abb. 3: Schematische Abbildung der Differenzierung verschiedener T-Zellsubtypen aus der naiven T-Zelle

Diese Abbildung zeigt die wesentlichen zur Ausdifferenzierung notwendigen Faktoren und die daraufhin gebildeten Zytokine. Nicht gezeigt sind Einflüsse durch verschiedene Rezeptorstimulationen durch bspw. Dendritische Zellen am TCR oder PGE2 via EP-Rezeptoren.

Modifiziert nach: Zhu et al (45)

1.3. Das NTN-Modell, Th-Zellen und Tregs

Eine ausgeprägte Th1- und Th17-Zellantwort spielt in der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen eine bedeutende Rolle (22, 23). Auch Glomerulonephritiden gehören dazu. In dieser Arbeit wurde zur Simulation einer GN ein NTN-Modell verwendet, das in den neunziger Jahren von Tipping und Holdsworth in Australien entwickelt wurde (24). Zur Induktion der GN wurde das Serum eines zuvor gegen Maus-GBM immunisierten Schafes in die Bauchhöhle der Versuchsmaus gespritzt. Die enthaltenen Antikörper erkennen die glomeruläre Basalmembran der Maus und rufen eine Entzündungsreaktion hervor. Die hierfür verwendeten C57BL/6-Mäuse haben die Eigenschaft, im Wesentlichen eine Th1-Immunantwort zu entwickeln. Diese Mäuse erkrankten daher besonders stark an der Th1-zellgesteuerten GN (3).

In den letzten Jahren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen der Einfluss der EP-Rezeptoren auf die Immunzell-Differenzierung untersucht. Yao *et al* fanden eine Förderung der Th1 Differenzierung und eine Th17 Expansion und Stabilisierung durch EP4-Stimulation über den PI3K-Signalweg. Sie betonen den Einfluss des TCR, der zusätzlich zur PGE₂-Stimulierung notwendig ist (8). Auch Boniface *et al* (22) fanden eine starke PGE₂ bedingte Abhängigkeit der Th17-Reifung und Stabilisierung, die über eine Aktivierung von EP2- und EP4-Rezeptoren vermittelt wird, siehe **Abb. 4**. Th1- und Th17-Zellen wirken dabei proinflammatorisch und vermitteln den Gewebeschaden in der GN.

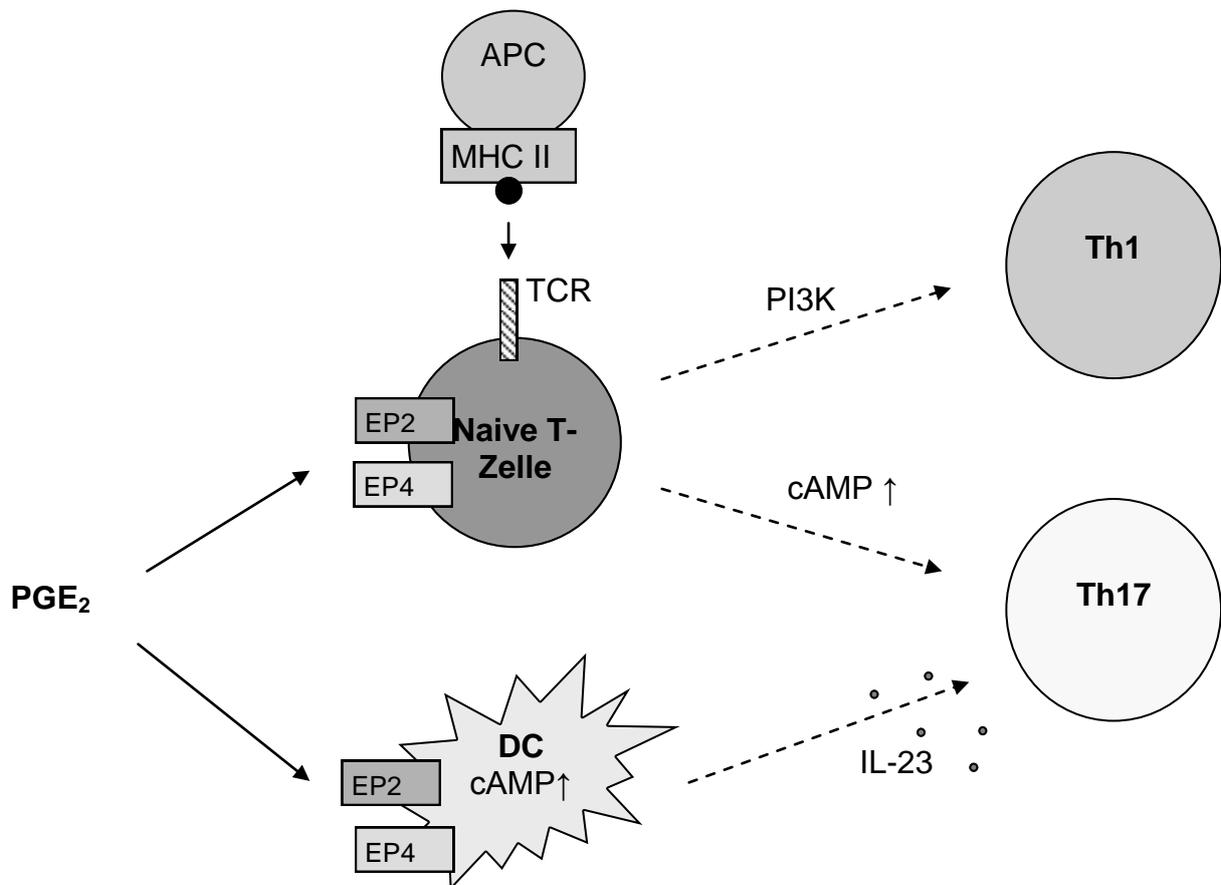


Abb. 4: Schematische Darstellung der Th1- und Th17-Differenzierung unter dem Einfluss von PGE₂.

PGE₂ bewirkt dies über eine EP2/EP4 Rezeptorantwort, die den cAMP- und den PI3K-Signalweg aktiviert. Eine gleichzeitige Stimulation des T-Zell Rezeptors (TCR) ist notwendig. Die Dendritische Zelle (DC) setzt IL-23 frei, die zur Induktion der Th17-Differenzierung benötigt wird. Weitere notwendige Zytokine sind der Übersicht halber nicht dargestellt. Abbildung frei erstellt nach den Erkenntnissen von: Yao et al (8)

Dennoch ist damit die Hypothese, PGE₂ wirke immunsuppressiv, nicht widerlegt. Es gibt viele Studien, die einen antiproliferativen Effekt auf T-Zellen feststellen (19). In verschiedenen Arbeitsgruppen wurde eine protektive Rolle im Bezug auf den glomerulären Schaden von PG der Gruppe E festgestellt. Sie erklärten dies mit einer Verminderung der Ausdifferenzierung von Immunzellen, einer Verminderung der Infiltration und der Ablagerungen im Gewebe (25, 26, 27).

Auch die Differenzierung der Tregs, welche antiinflammatorisch wirken, ist maßgeblich von PGE₂ beeinflusst. *Baratelli et al* (28) wiesen eine Verstärkung des inhibitorischen Effekts der Tregs durch PGE₂ nach. Sie stellten eine verstärkte Expression des Master-Regulators Foxp3 bei Tregs und sogar eine Induktion der Foxp3-Expression bei naiven T-Zellen fest.

Das Forkhead box Protein 3 (Foxp3) ist ein Transkriptionsfaktor und Master-Regulator der Tregs. Es wird als verlässlichster Marker für Tregs angesehen, da es ausschließlich von diesen Zellen exprimiert wird. Physiologisch kommen Tregs vor allem in Lymphorganen vor. Sie haben vielfältige Funktionen: Sie vermitteln die Selbsttoleranz des Körpers und vermindern Allergien und Asthma. Sie ermöglichen orale Toleranz bei Lebensmittelaufnahme und die mütterliche Toleranz des Fötus (29). Ein defektes Foxp3-Gen führt zu einer letalen Immundysregulation (30).

Die genaue Funktionsweise des Foxp3-Proteins ist unklar. Es bindet an eine Promotorregion von 700 bis 1100 Genen, viele davon sind mit dem TCR assoziiert. Es kann sowohl als Transkriptionsaktivator als auch als –repressor wirken. Es ist davon auszugehen, dass Foxp3 nicht allein für die suppressive Kapazität verantwortlich ist. Es wurden auch Tregs ohne Foxp3-Expression nachgewiesen. Foxp3 ist dennoch unbestritten ein sehr wichtiger Faktor für Tregs. Dies lässt sich herleiten aus der Tatsache, dass man mithilfe von retroviralem Gentransfer naive T-Zellen zu Tregs umwandeln kann (29, 31).

Tregs vermitteln ihre antiinflammatorische Wirkung über die Ausschüttung bestimmter Zytokine, z.B. Interleukin-10 (IL-10), IL-35 und TGFβ. Diese Zytokine wirken hemmend auf Th1- und Th17-Zellen. Es wird davon ausgegangen, dass Tregs ihren regulierenden Effekt erst verzögert nach Beginn der Erkrankung ausprägen. Sowohl *Ooi et al* (20) als auch *Paust et al* (32) fanden eine Infiltration ins Nierengewebe zwischen dem fünften und siebten Tag. Tregs treten lokal erst dann in Aktion, wenn der Schaden durch die Effektor T-Zellen entstanden ist. Ebenso stellten beide Gruppen fest, dass Tregs ihre Funktion nicht nur lokal im infiltrierten Gewebe

entfalten, sondern auch systemisch. Scheinbar regulieren sie die Immunantwort auch von den Lymphknoten aus, indem sie schon hier die Immunzellen modifizieren. Treg-defiziente Mäuse weisen systemisch höhere Spiegel von IFN γ und IgG auf. Eine Ausschaltung der Tregs sowohl nur in der heterologen als auch nur in der autologen Phase der experimentellen GN hatte lediglich einen geringen Effekt auf den Schaden. Dauerhaft Treg-defiziente Mäuse entwickelten dagegen einen deutlich schwereren Verlauf der GN. Dies wird zurückgeführt auf eine verstärkte Th1- und Th17-Zellantwort.

Dass Tregs eine entzündungsabmildernde Funktion haben und diese sowohl lokal als auch in sekundären Lymphorganen vermitteln, fanden auch *Turner et al* (33). Durch eine CCR6-Defizienz hemmten sie die Infiltration von Tregs und Th17-Zellen in das Nierengewebe, nicht aber die der Th1 Zellen. Dadurch verschlimmerte sich der Schaden deutlich. Dieser konnte aber durch den Transfer von Wildtyp-Tregs abgemildert werden. Es zeigt sich also in Übereinstimmung mehrerer Arbeitsgruppen, dass Tregs einen antiinflammatorischen Effekt und somit eine immunregulierende Funktion haben.

Foxp3 unterliegt, ebenso wie die Transkriptionsfaktoren der anderen T-Zellen, verschiedenen Regulationsmechanismen. Interessant ist hier auch der Befund von *Ooi et al* (20), dass Tregs nach einem Immunstimulus eine erhöhte suppressive Kapazität aufweisen.

Insgesamt scheint die gesamte Th-Zellpopulation sehr wandelbar. Jede ausdifferenzierte Zelle benötigt zu ihrem Fortbestehen stabilisierende Faktoren. Eine Transdifferenzierung bei entsprechenden komplex interagierenden Stimuli aus der Umgebung scheint fast immer möglich zu sein. Allerdings fanden *Holdsworth et al* (3), dass bei chronischer Immunstimulation die Th-Zellen zunehmend und sogar irreversibel polarisiert werden.

1.4. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Forschungsergebnisse der letzten 20 Jahre zeigen eine eindeutige Beteiligung von PGE₂ und seinen Rezeptoren am Verlauf der immunvermittelten GN. Es gibt viele widersprüchliche Befunde im Bezug auf die Art des Einflusses von PGE₂. Auch in welchem Ausmaß dies über welche Rezeptor-Subtypen geschieht, ist nach wie vor Gegenstand der Forschung.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist der Vergleich von drei Mausstämmen in Verlauf und Stärke der experimentellen GN. Die drei Mausstämme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer EP2- und EP4-Rezeptor Expression.

Zur Objektivierung des Erkrankungsverlaufs werden Parameter für Nierenfunktion, glomerulären Schaden, Immunzell-Influx in die Niere und der Expression von proinflammatorischen Markern verwendet.

Es werden Mäuse, die konstitutiv EP2-Rezeptordefizient sind, verglichen mit Mäusen, die entweder nur oder zusätzlich EP4-Rezeptordefizient auf Foxp3+ Tregs sind. Es soll also untersucht werden, welchen Einfluss PGE₂ via EP2- und EP4-Rezeptoren auf die Funktion der Tregs und somit auf den Verlauf der experimentellen GN hat.

2. Material und Methoden

2.1. Tabellen:

- Chemikalien und Enzyme
- Puffer und Lösungen
- Verbrauchsmaterial
- Kits und gebrauchsfertige Reaktionssysteme
- Geräte
- Primer

2.2. Tierhaltung

2.3. Herstellung des Antikörperserums

2.4. Induktion der Nephrotoxischen Serum Nephritis (NTN)

2.5. Urin-, Plasma- und Organgewinnung

2.6. Albumin ELISA

2.7. Gewinnung genomischer DNA

2.8. Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung

2.9. Quantitative Real-Time PCR

2.10. Histologien, PAS-Score und immunhistologische Auszählung

2.11. Statistik

2.1. Tabellen

Tab. 1: Verwendete Chemikalien und Enzyme

Chemikalie/Enzym	Hersteller, Ort
Agarose	Life Technologies, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Braun, Deutschland
β -Mercaptoethanol (99% p.A.)	Carl Roth GmbH, Deutschland
Chloroform	J.T.Baker, Niederlande
DNase I	Machery-Nagel, Deutschland
dNTP	Life Technologies, Deutschland
Ethanol 70%	J.T.Baker, Niederlande
Ethanol 80%	J.T.Baker, Niederlande
Ethidium-Bromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fomalin 37%	Merck, Deutschland
Isopropanol	Merck, Deutschland
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck, Deutschland
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, Deutschland
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Deutschland
Reverse Transkriptase „ <i>RevertAid</i> “	Fermentas, Deutschland
RNase freies H_2O	Machery-Nagel, Deutschland
SYBR-Green	Eurogentec, Deutschland
Taq-Polymerase „ <i>DreamTaq</i> “	Fermentas, Deutschland
Trizol	Life Technologies, Deutschland

Tab. 2: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Hersteller	Zusammensetzung
<u>DreamTaq Puffer (PCR)</u>	Fermentas, Deutschland	KCl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ MgCl_2 20 nM Tracking dye blue Migrationsgeschwindigkeit wie 3-5 kb DNA Tracking dye yellow schneller als 10 bp DNA Density reagent
<u>M-MuLV RT-Buffer</u>	Fermentas, Deutschland	Tris-HCl (pH 8,3) 250 mM KCl 250 mM MgCl_2 20 mM DTT 50 mM
<u>HBSS</u>	Life Technologies, Deutschland	KCl 400 mg/L KH_2PO_4 60 mg/L NaHCO_3 350 mg/L NaCl 8000 mg/L Na_2HPO_4 48 mg/L Dextrose 1000 mg/L Phenol Rot 10 mg/L
<u>PBS</u>	Lonza, Belgien	KH_2PO_4 144 mg/L NaCl 9,000 mg/L Na_2HPO_4 795 mg/L

→ **Tab. 2: Puffer und Lösungen**

<u>Sörensen Puffer (1 Liter)</u>	Merck, Deutschland	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	3,03g
		Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	14,14g
		vor dem Auffüllen auf 1 L mit 2 M HCl auf pH 7,4 einstellen	
<u>Fomalin Lösung in Sörensen Puffer</u>	Merck, Deutschland	37% Fomalin	111 ml
		Sörensen Puffer	889 ml
<u>TAE-Laufpuffer</u>	Sigma-Aldrich, USA	Tris-Acetat	90 mM
		EDTA	2 mM
<u>Agarosegel 1,5%</u>	Life Technologies, Deutschland	Agarose	3 g
		TAE-Laufpuffer	200 ml
	Carl Roth, Deutschland	Ethidium-Bromid	4 µl
<u>Lösungen für ELISA</u>			
Coating Buffer	Bethyl Laboratories, USA	Carbonat-Bicarbonat Lösung	0,05 M
Waschlösung	Bethyl Laboratories, USA	Tris pH 8,0	50 mM
	Sigma-Aldrich, USA	Tween 20	0,05 %
		destilliertes H ₂ O	1 L
Postcoat Buffer	Bethyl Laboratories, USA	Tris pH 8,0	50 mM
	Sigma-Aldrich, USA	BSA	0,10 %
		destilliertes H ₂ O	1 L
Sample/Conjugate Diluent	Sigma-Aldrich, USA	Tween 20	0,05 %
		Postcoat Buffer	100 ml
Enzym Substratlösung	Kirkegaard & Perry, USA	TMB substrate	1:1 nach Bedarf
		Solution B	

Tab. 3: Verbrauchsmaterial

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller, Ort</u>
Bechergläser	Schott, Deutschland
CryoPure Gefäß 1 ml weiß	Sarstedt, Deutschland
Einmal-Injektions-Kanüle Gr. 16	Braun, Deutschland
Multipipette 8 Kanal	Brand, Deutschland
Multistix (Teststreifen Harnanalyse)	Siemens, USA
NH4-Heparin Monovette	Sarstedt, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Deutschland
Pinzetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipetten: 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Gilson, Frankreich
Pipettenspitzen: 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen(RNase frei): 1000 µl – 10µl	Sarstedt, Deutschland
Pistill	Bel Art Products, USA
Reaktionsgefäße: 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml	Sarstedt, Deutschland
Röhre 10 ml	Sarstedt, Deutschland
Skalpell	Braun, Deutschland
Trockenfutter	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland
Tubes, 50 ml	Greiner, Deutschland
Spritze "Omnifix -F"	Braun, Deutschland
96-Well-Platte	Sarstedt, Deutschland

Tab. 4: Kits und gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Kit	Hersteller
NucleoSpin RNA II Kit	Machery & Nagel, Deutschland
Filtersäulen	
RNase freie Eppendorfcups 1,5ml	
RNase freies H ₂ O	
RA1 Puffer	
RA2 Puffer	
RA3 Puffer	
MDB Puffer	
DNase I	
DNase Puffer	
ELISA Kit E101	Bethyl Laboratories, USA
Microtiter Wells: 96 well plates, 8 well strips	
Coating Buffer (Kapseln)	
Wash Solution (Pulver)	
Postcoat Solution (Pulver)	
Sample/Conjugate Diluent	
Enzym Substrat	
DirectPCR tail reagent	Peqlab

Tab. 5: Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller, Ort</u>
Analysenwaage		Sartorius, Deutschland
Elektrophoresekammer		PeqLab, Deutschland
Elektrophorese Netzgerät	EPS 200	Pharmacia Biotech
ELISA Reader	Microplate Reader MRX II	Dynatech Laboratories, USA
Gefrierschrank -20°C		Privileg, Deutschland
Gefrierschrank -80°C		Heraeus, Deutschland
Geldokumentationsanlage	BioDoc II	Biometra, Deutschland
Kühlschrank		Liebherr, Deutschland
Kühlzentrifuge	5417 R	Eppendorf, Deutschland
Mikroskop	Axioskop	Zeiss, Deutschland
Heizschrank		Memmert, Deutschland
PCR Maschine	T3 Thermocycler	Biometra, Deutschland
Photometer	GeneQuant pro	Amersham Biotech, Schweden
Real-Time PCR Maschine	StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystem, USA
Schüttler	WT 17	Biometra, Deutschland
Tischzentrifuge	5415 D	Eppendorf, Deutschland
Vakuumzentrifuge	Speed Vac SVC 100	Savant, Deutschland
Vortex	Relax top	Heidolph, Deutschland
Werkbank	Tec-Onomic AZ 1500	CP, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 1S-R	Heraeus, Deutschland

Tab. 6: Primer

Primer	Sequenz 5' zu 3'	Hersteller
<u>PCR</u> (Genotypisierung)		
		alle von Life Technologies, Deutschland
Foxp3 cre/Wt		
Cre Sense	AGG ATG TGA GGG ACT ACC TCC TGT A	
Cre Antisense	TCC TTC ACT CTG ATT CTG GCA ATT T	
WT Sense	TGG ACC GTA GAT GAA TTT GAG TT	
WT Antisense	CCA GAT GTT GTG GGT GAG TG	
EP2 ko/Wt		
oIMR 1100	GCT ATC AGG ACA TAG CGT TGG	
oIMR 1789	CTG GTA ACG GAA TTG GTG CT	
oIMR 1790	TAA TGG CCA GGA GAA TGA GG	
EP4 flox		
Sense	GTT AGA TGG GGG GAG GGG ACA ACT	
Antisense	CGC ACT CTC TCT CTC CCA AGG AA	
<u>cDNA Synthese</u>		
Random Primer	pd(N)6: Alle möglichen hexamerischen Sequenzen	Life Technologies, Deutschland

→ **Tab. 6: Primer**

Primer	Sequenz 5' zu 3'	Hersteller
<u>Quantitative Real-Time-PCR</u>		
		alle von Life Technologies, Deutschland
18S (pan)		
Sense	CAC GGC CGG TAC AGT GAA AC	
Antisense	AGA GGA GCG AGC GAC CAA A	
CCL2 (murin)		
Sense	GGC TCA GCC AGA TGC AGT TAA	
Antisense	CCT ACT CAT TGG GAT CAT CTT GCT	
Cox2 (murin)		
Sense	TAA GCG AGG ACC TGG GTT CA	
Antisense	TGT CCA GAG TTT CAC CAT AAA TGT G	
IL-6 (murin)		
Sense	TGG GAA ACT GTG GAA ATG AGA	
Antisense	AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA	
TNFα (murin)		
Sense	AAA TGG CCT CCC TCT CAT CAG T	
Antisense	GCT TGT CAC TCG AAT TTT GAG AAG	

2.2. Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten 20 bis 25 Gramm schwere, 8 bis 12 Wochen alte männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 der Zucht der Zentralen Versuchstierhaltung des „Campus Forschung“ des UKE. Die artgerechte Haltung der Tiere wurde durch das Fachpersonal der Versuchstierhaltung entsprechend dem Tierschutzgesetz und der EU-Richtlinien durchgeführt. Die Experimente wurden durch die Ethikkommission der *Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz* genehmigt (GZ 10/09).

Den Standards entsprechend wurden die Tiere bei 25 °C und einem Hell-Dunkel-Zyklus von zwölf Stunden unter reinen Bedingungen gehalten. Freier Zugang zu Trinkwasser, Trockenpellets und Nestbaumaterial war gewährleistet.

2.3. Herstellung des Antikörperserums

Zur Induktion der Nephrotoxischen Nephritis wurde ein Antiserum gegen die glomeruläre Basalmembran der Maus verwendet. Eine entsprechende Präparation aus dem Schaf 14 wurde mir durch PD Dr. Zahner zur Verfügung gestellt.

2.4. Induktion der Nephrotoxischen Serum Nephritis (NTN)

Um eine NTN bei den Versuchstieren zu induzieren, wurde den Tieren gewichtsadaptiert eine in Vorversuchen ermittelte Menge des Antikörperserums intraperitoneal gespritzt, siehe **Tab. 7**. Hierzu wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert. In den folgenden zwei bis drei Tagen wurde der gesundheitliche Zustand der Tiere regelmäßig kontrolliert. Im Allgemeinen war die Proteinurie bis zu diesem Zeitpunkt am stärksten ausgeprägt und ging dann langsam zurück.

Tab. 7: Spritzschema des NTN-Serums

Das Serum wurde 1:2 mit 0,9% Kochsalzlösung verdünnt

Gewicht der Maus	Menge an gespritztem Serum
25 g - schwerer	500 µl
23,1 g - 25 g	475 µl
21,1 g - 23 g	450 µl
19,1 g - 21 g	425 µl
17,1 g - 19 g	400 µl
17 g - leichter	375 µl

2.5. Urin-, Plasma- und Organgewinnung

Am zweiten oder dritten Tag und am neunten oder zehnten Tag nach Gabe des NTN-Serums wurde über einen Zeitraum von sechs Stunden Urin gesammelt. Hierzu wurde jede Maus auf eine 96-Well Platte gesetzt, Trinkwasser stand zur Verfügung. Nach sechs Stunden wurde der Urin aus den Wells in ein Eppendorfcup zusammen pipettiert und gründlich gemischt. Sofort im Anschluss wurde der Urin auf einen Urinteststreifen gegeben und die Proteinkonzentration abgelesen. Es konnten Proteinkonzentrationen zwischen „Spur“ und „+“ bis „++++“ angegeben werden. Der übrige Urin wurde bei 4 °C gelagert. Zur Analyse der Kreatininwerte wurden 120 µl des Urins in das Zentrallabor des Uniklinikums Eppendorf gegeben. Der Albumingehalt wurde per ELISA bestimmt.

Am Tag nach der letzten Uringewinnung wurden die Mäuse mit Isoflouran betäubt. Der Bauchraum wurde eröffnet und Blut aus der abdominalen Aorta abgenommen und sofort in eine NH₄-Heparin Monovette überführt. Anschließend wurde beide Nieren entnommen, das Nierenhäutchen entfernt, und in 1 ml HBSS gegeben. Schließlich wurde ein Genickbruch vollzogen, um den Tod sicherzustellen. Die Mäuse wurden Vorschriftsmäßig durch die Tierhaltung des Campus Forschung entsorgt.

Um das Plasma aus dem Blut zu gewinnen, wurde es in der Monovette 10 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Plasma konnte nun abpipettiert und in ein neues Eppendorfcup gegeben werden. Auch die Harnstoff- und Kreatininbestimmung im Plasma erfolgte im Zentrallabor des UKE.

2.6. Albumin-ELISA

Mithilfe des Albumin-ELISA Kits wurde der Gehalt an Albumin im Urin quantitativ bestimmt. Das zugrundeliegende Prinzip des Sandwich-ELISAs ist die Detektion des Albumins mithilfe eines Primär-Antikörpers, mit dem die Wells gecoatet werden, und eines Sekundär-Antikörpers, der mit HRP (Horse-Radish-Peroxidase, ein Marker-Enzym das die zugegebene Substratlösung umsetzt und somit eine bei einer Wellenlänge von 450 nm messbare Farbreaktion hervorruft) gekoppelt ist, siehe **Abb. 5**. Je nach Menge des gebundenen Albumins ist auch die Farbreaktion proportional mehr oder weniger stark.

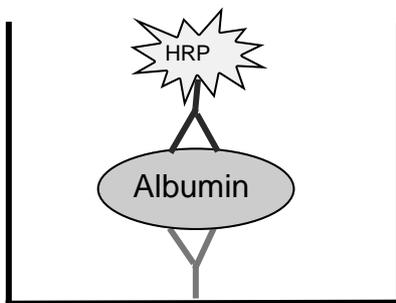


Abb. 5: Sandwich-ELISA

Der an das Well gebundene Primärantikörper bindet Albumin. Dieses wird wiederum von einem Sekundärantikörper gebunden, der an Horse-Radish-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist

Nach Gewinnung des Urins wurde er bei 4 °C gelagert und direkt vor der Verarbeitung gevortext und zentrifugiert (13000 rpm für 10 sec), um mögliche Verunreinigungen zu minimieren. Um im Messbereich zu bleiben, wurden die Urine entsprechend der **Tab. 8** mit Sample/Conjugate Diluent verdünnt.

Tab. 8: Urinverdünnung

Ergebnis U-Stix	Verdünnungsfaktor
negativ/Spur	1:100
+	1:1000
++	1:10 000
+++	1:50 000
++++	1:200 000 - 1:800 000

Zum Coaten der 96-Well-Platte wurde der Maus-Albumin-Antikörper 1:100 mit Sample/Conjugate Diluent verdünnt und 100 µl pro Well eingegeben. Mit Folie abgeklebt wurde die Platte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurden dann freie Bindungsstellen auf der Platte mithilfe des Postcoat-Buffers 30 min geblockt. In dieser Zeit konnte eine Standardreihe mit Maus-Referenz-Serum angesetzt werden, die den Maßstab für die Messung bildet.

Nach einem weiteren Waschschrtritt konnten die Standardreihe und die Proben mit 100 µl pro Well auf die Platte gegeben und eine Stunde bei RT inkubiert werden. Um das gebundene Albumin dann mit dem HRP-konjugierten Detektionsantikörper zu verbinden, musste dieser zunächst je nach Erfahrungswerten 1:5000-1:40000 mit Sample/Conjugate Diluent verdünnt und nach einem erneuten Waschschrtritt auf die Platte gegeben werden. In einer weiteren Stunde Inkubationszeit wurde bereits die Substratlösung angesetzt und 30 min im Dunkeln stehen gelassen. Diese wurde nach einem erneuten Waschschrtritt ebenfalls mit je 100 µl dazu gegeben. Nach ca. 15 min Farbreaktion im Dunkeln wurde diese durch die Zugabe von 100 µl Phosphorsäure 1 M abgestoppt. Nun konnte die Farbbintensität im ELISA-Gerät bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Alle Messwerte wurden per Doppelbestimmung und anschließender Mittelwertbildung bestimmt.

2.7. Gewinnung genomischer DNA

Um gDNA für die genetische Charakterisierung der Mäuse zu erhalten, wurden von der Tierhaltung des UKE Campus Forschung Mausschwanzbiopsien genommen. Diese wurden bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Um die DNA aus den Zellen zu lösen wurde eine Lyse mit Proteinase K durchgeführt. Dafür wurde folgende Lösung angesetzt: 0,3 mg Proteinase K wurde pro Milliliter Extraktionspuffer zugegeben und gründlich gevortext. Pro Eppendorfcup, welches die Biopsie enthielt, wurden 150 µl zur Lyse verwendet. Um ideale Lysebedingungen zu schaffen, wurden die Proben nun über Nacht bei 55 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde dann die Proteinase K durch Erhitzen auf 85 °C für 45 min zerstört und somit der Lysevorgang gestoppt.

2.8. Polymerase Kettenreaktion zur Genotypisierung

Mithilfe der Polymerasen Kettenreaktion (PCR) ist es möglich eine Genotypisierung der verwendeten Mäuse durchzuführen. Um spezifische Gene zu detektieren, wurden speziell dazu passende Sense- und Antisense-Primer konzipiert und von der Firma Life Technologies hergestellt. Diese binden dann am Gen und werden durch die hitzebeständige Taq-Polymerase in einer definierten Anzahl von Zyklen so oft verlängert, dass in einem Agarose Gel eine gut sichtbare Bande entsteht. Je nachdem, ob das Gen vorhanden ist, entsteht eine Bande oder nicht. Auch die entsprechende Wildtypsequenz kann detektiert und durch eine Bande dargestellt werden. Daher ist es auch möglich eine Aussage über Homo- oder Heterozygotie zu treffen.

Die gDNA als Ausgangsmaterial wurde durch eine Schwanzbiopsie gewonnen, und bis zur Verarbeitung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Der Mastermix bestand jeweils aus:

2,0 µl	10x Dream Taq Buffer
0,4 µl	dNTP Gemisch
1,0 µl	Sense Primer
1,0 µl	Antisense Primer
0,1 µl	Dream Taq Polymerase
15,0 µl	H ₂ O

Pro Eppendorf-Cup (0,5 ml) wurden 19,5 µl des Mastermix eingegeben, dazu wurden jeweils 0,5 µl der jeweiligen gDNA pipettiert. In der PCR Maschine wurden die Abläufe entsprechend der **Tab. 9** programmiert.

Tab. 9: PCR-Programme

<u>Foxp3 Cre PCR</u>			
Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	38
Primeranlagerung	64°C	30 sec	
Verlängerung	72°C	30 sec	
Finale Verlängerung	72°C	3 min	1
<u>EP2 PCR</u>			
Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	36
Primeranlagerung	66°C	1 min	
Verlängerung	72°C	1 min	
Finale Verlängerung	72°C	3 min	1

→ **Tab. 9: PCR-Programme**

EP4flox PCR			
Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	38
Primeranlagerung	61°C	30 sec	
Verlängerung	72°C	30 sec	
Finale Verlängerung	72°C	7 min	1

Nach Ablauf des jeweiligen PCR-Programmes wurde ein 1,5 prozentiges Agarose-Gel gegossen und pro Tasche 10 µl der Probe eingegeben. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für 30 min durchgeführt. Anschließend wurde mit der Geldokumentationsanlage ein Foto gemacht und die Ergebnisse ausgewertet. Auf diese Weise wurde jedes Tier vor Beginn des Experiments charakterisiert.

2.9. Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR dient zur mengenmäßigen Detektion von mRNA. In diesem Fall handelt es sich um mRNA, die für bestimmte Zytokine der Entzündungsreaktion in der Niere kodiert. Zunächst muss also die RNA aus der Niere gewonnen und so weit aufgereinigt werden, dass die möglichst reine RNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Dieser Schritt ist erforderlich, da die in der RT-PCR verwendete Taq-Polymerase nur von DNA ausgehend die Amplifikate synthetisieren kann. Die Menge dieser Amplifikate wird über die Zeit durch photometrische Messung die Intensität der Fluoreszenz bestimmt. So kann zu einem definierten Zeitpunkt, zu dem eine definierte Anzahl an Replikationszyklen (CT-Wert, **Cycle Threshold**) abgelaufen ist, die RNA Menge unter den verschiedenen Proben verglichen werden. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden beschrieben.

Die Nieren der Versuchstiere wurden direkt nach Entnahme in HBSS auf Eis gelagert. Vor der weiteren Verarbeitung wurde mit einem Skalpell das Nierenhäutchen entfernt und ein Teil der Nierenrinde (ca. 1/6) abgeschnitten und in ein mit 200 µl Trizol befülltes 1,5 ml Eppendorfcup gegeben. Nach gründlicher Homogenisierung mit einem Pistil wurden weitere 800 µl Trizol zugegeben und gevortext. Zehn Minuten später wurden 200 µl Chloroform zur Unterstützung der Auftrennung der drei Phasen hinzugefügt. Die Auftrennung erfolgte in der Zentrifugation bei 10.000 x g, 4 °C 15 min lang. Nun konnten 400 µl des wässrigen Überstandes in ein neues Eppendorfcup gegeben werden, der Rest wurde den Richtlinien entsprechend entsorgt. Der Ansatz wurde mit 400 µl Isopropanol 30 min bei Raumtemperatur ausgefällt. Anschließend setzte sich durch 15 minütige Zentrifugation bei 12.000 x g ein weißliches RNA-Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes ab.

Zur weiteren Aufreinigung der RNA wurde das NucleoSpin RNAII Kit von Marchery & Nagel nach den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Das gewonnene RNA-Pellet wurde dreifach mit 80 prozentigem Alkohol gewaschen und jeweils 5 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Trocknung des Pellets in einer Vakuum-Zentrifuge wurde es 30 min in 50 µl RNase freiem H₂O gelöst. Zugabe von 300 µl RA1 Puffer (enthält 140 mM β-SH) lösten nun die Proteine von der RNA. Weitere 350 µl 70 prozentigen Ethanol entzogen dann das dipolige H₂O und erlaubten so eine Bindung der RNA an die polarisierte Filtersäule. 700 µl dieses Gemisches wurden auf die Säule gegeben und, genau wie alle weiteren Zentrifugationen, bei Raumtemperatur und 11.000 x g abzentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, die RNA war nun an die Säulenmembran gebunden und wurde durch 350 µl MDB (Membrane desalting buffer) entsalzen, der Überstand abzentrifugiert und wiederum verworfen. Um ebenfalls an die Membran gebundene DNA zu lösen, wurden 10 µl DNase I mit 90 µl DNase Puffer versetzt und je 95 µl für 15 min auf der Säule inkubiert. Um die DNase wieder abzustoppen wurden 200 µl RA2 zugegeben. Nach einer 30 sekundigen Zentrifugation wurde zweimal (600 µl und 250 µl) mit RA3 gewaschen. Zu allerletzt wurde die RNA mithilfe von 50 µl RNase freiem H₂O 5 min

von der Membran gelöst und abzentrifugiert. Um die gewonnene Konzentration an RNA bestimmen zu können, musste diese nun 1:100 verdünnt werden. Gemessen wurde UV-photometrisch gegen dH₂O bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und 280 nm, dem Absorptionsmaximum für Proteine, gemessen. Der Quotient 260/280 wurde zur Einschätzung der Reinheit herangezogen und hat zwischen 1,5 -1,9 gelegen.

Anhand der gemessenen Konzentrationen wurde die RNA mit RNase freiem Wasser so verdünnt, dass immer eine Konzentration von 100 ng/μl erreicht wurde. 10 μl des ersten Mastermix „M I“ wurden in ein 0,5 ml Eppendorfcup vorgelegt, und 2 μl (also 200 ng) der RNA dazu gegeben. Alles wurde auf Eis pipettiert. Dieser Ansatz wurde bei 65 °C 5 min inkubiert, um RNA Stränge, die sich möglicherweise aneinandergelagert hatten zu trennen. Nun konnten auch 8 μl des Mastermix „M II“ dazugegeben werden, siehe **Tab. 10**. In 10 min bei 25 °C konnten sich die Primer anlagern, bei 42 °C hatte die Reverse Transkriptase 60 min Zeit die RNA in cDNA umzuschreiben. Abschließend wurde das Enzym dann bei 70 °C 10 min denaturiert und somit gestoppt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Tab. 10: Mastermix-Ansätze für die cDNA Synthese

<u>Mastermix MI</u>		<u>Mastermix MII</u>	
H ₂ O (RNase frei)	8,00 μl	M-MuLV RT Buffer	4,00 μl
Hexamer Primer (100 ng/μl)	1,00 μl	H ₂ O	3,00 μl
dNTPs (10 mM)	1,00 μl	RevertAid RT	1,00 μl

Zur Quantifizierung der RNA-Targets wurde eine 96-Well-Platte mit je 11 µl des Mastmix und 1,5 µl der RNA-Probe pro Loch eingegeben, siehe **Tab. 11**. Die Messung wurde im Real-Time PCR Gerät vorgenommen, siehe **Tab. 12**. Zur Analyse wurde die *StepOne Software v2.0* verwendet.

Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung, deren Mittelwert gebildet wurde. Als Negativkontrolle wurden 1,5 µl H₂O verwendet. Die gemessenen Werte wurden ins Verhältnis gesetzt zu 18S RNA. Hierbei handelt es sich um einen so genannten Housekeeper, dessen Expression durch die Entzündungsreaktion nicht beeinflusst wird. So kann der RNA-Gehalt und somit die Qualität der cDNA überprüft werden. 18S RNA, die für eine Untereinheit des Ribosoms kodiert, wird derart stark exprimiert, dass eine 1:500 Verdünnung der cDNA notwendig ist.

Zur Auswertung wurde der Mittelwert der CT-Werte jeder Probe verwendet. Je niedriger er war, desto mehr RNA wurde detektiert (pro Zykluszahl 2^1 mal mehr RNA). Von diesem Wert wurde der zugehörige 18S-Mittelwert abgezogen. Nun konnte die relative Expression errechnet werden im Verhältnis zum Basalwert jeder Tiergruppe. Dieser ergab sich aus der RNA-Expression der IgG-behandelten Tiere.

Tab. 11: RNA-Targets und Mastermix-Ansatz für die qRT-PCR

<u>RNA-Targets</u>	<u>qRT-PCR Mastermix</u>	
Cox2	Sybr Green	6,25 µl
CCL2	H ₂ O	2,25 µl
TNFα	Forward Primer	1,25 µl
IL-6	Reverse Primer	1,25 µl

Tab. 12: Programm für die qRT-PCR

<u>qRT-PCR Programm</u>			
	Zeit	Temp.	Zyklen
Aktivierung Taq-Polymerase	10 min	95°C	1
Denaturierung 'DNA'	15 sec	95°C	40
Hybridisierung und Elongation	1 min	60°C	
Schmelzkurve	30 min	60-95°C	1

2.10. Histologien, PAS-Score und immunhistologische Auszählung

Aus dem mittleren Drittel der Nieren wurden verschiedene histologische Schnitte angefärbt. Es wurde je eine PAS-Färbung angefertigt, mit welcher der Schaden nach einem arbiträren Score bewertet wurde. Des Weiteren wurde jeweils eine immunhistologische Färbung für CD3 (alle T-Zell Typen), F4/80 (Makrophagen) und Foxp3 (Tregs) angefertigt. Für die Färbungen aller Schnitte danke ich Melanie Schaper und Olga Ilin.

PAS-Score

Um dem glomerulären Schaden quantifizieren zu können, wurde ein arbiträrer Score angewendet. Beurteilte Parameter waren vor allem die Verteilung der Zellkerne im Glomerulum und diffuse Verdickungen der extrazellulären Matrix. Diese waren erkennbar durch eine vermehrte Anfärbung PAS-postiver Kollagene und Proteine. Es wurden pro Schnitt 30 Glomeruli bei 400facher Vergrößerung im Lichtmikroskop beurteilt und gemittelt. Entsprechend der **Tab. 13** wurden die Punkte vergeben.

Tab. 13: Bewertungsschema PAS-Score

0	Keine Schädigung
1	Anreicherung PAS-positiven Materials
2	1/4 bis < 1/2 des Glomerulums ohne Zellkerne
3	1/2 bis 3/4 ohne Zellkerne
4	Vollkommene Zerstörung der Strukturen

Immunhistologische Auszählung

Sowohl die CD3- als auch die F4/80 Färbungen wurden ebenfalls bei 400facher Vergrößerung im Lichtmikroskop begutachtet. Die Foxp3 Färbung wurde aufgrund der wesentlich geringeren Zellzahl in der 200 fachen Vergrößerung beurteilt. Dies erfolgte innerhalb einer Woche nach Anfärbung. Gezählt wurde jede Zelle, bei der ein Zellkern zu sehen war. Es wurden jeweils 15 High-Power-Fields (hpf) bzw. Low-Power-Fields (lpf) ausgezählt.

2.11. Statistik

Von allen gesammelten Daten wurden der Mittelwert und der Standardfehler (SE) bestimmt. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ferner kam der Zweistichproben-t-Test zur Bestimmung der Signifikanz zur Anwendung. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert kleiner als 0,05 definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Transgene Tiere

3.2. Genotypisierung

3.3. Experimentelles Layout

3.4. Bindung von Schaf IgG im Glomerulum

3.5. Vergleich Wildtyp mit Foxp3 Cre

3.5.1. Nierenfunktion

3.5.2. Glomerulärer Schaden

3.5.3. Tubulo-interstitieller Zellaufbau

3.5.4. RNA-Expression proinflammatorischer Marker

3.6. Nierenfunktion in der NTN

3.6.1. Albumin/Kreatinin Ratio

3.6.2. BUN

3.7. Schädigung der Glomeruli

3.7.1. PAS-Score

3.7.2. Halbmondbildung

3.8. Immunhistochemie: Infiltrationsverhalten verschiedener Immunzellen

3.8.1. CD3 positive Zellen,

3.8.2. F4/80 positive Zellen

3.8.3. Foxp3 positive Zellen

3.9. mRNA der Entzündungsmediatoren

3.9.1. CCL2

3.9.2. Cox2

3.9.3. TNF α

3.9.4. IL-6

3.1. Transgene Tiere

Es wurden fünf verschiedene Tiergenotypen den Experimenten unterzogen: Wildtyp (*WT*), *Foxp3 Cre*, *Foxp3 EP4*, *Foxp3 EP2 EP4* und *EP2ko*. Als *WT* dienten *C57BL/6* Tiere. Alle weiteren Tiergruppen wurden aus dem *C57BL/6*-Stamm gezüchtet.

Vertreter der *Foxp3 Cre* Gruppe verfügen zusätzlich über das Cre-Rekombinase Gen unter Kontrolle des *Foxp3*-Promotors. Das Cre-Gen wird nur aktiviert, wenn der *Foxp3*-Promotor aktiv ist. Dieses Cre-Gen ermöglicht bei *Foxp3 EP4* Tieren eine Ausschaltung des EP4-Rezeptors bei allen *Foxp3*-positiven Zellen. Die Ausschaltung wird möglich durch das Herausschneiden von Exon 2 und Intron 2 des EP4-Rezeptor-Gens aus der gDNA. Ansatzpunkt für das Ausschneiden sind die Erkennungssequenzen „loxP“ vor und nach dem herauszuschneidenden Genabschnitt, siehe **Abb. 6**. Tiere mit solchen loxP-Loci werden „gefloxt“ genannt (34). Um den EP4-Rezeptor auszuschalten ist es folglich notwendig, dass es sich um gefloxt Tiere mit Cre-Gen handelt. Die vom *Foxp3*-Promotor gesteuerte Cre-Rekombinase schneidet an den loxP-Erkennungssequenzen das EP4-Gen heraus.

Zu den *Foxp3*-positiven Zellen zählen im Wesentlichen die Tregs. Bei *Foxp3 EP4* Tieren sind also alle Tregs EP4-Rezeptor defizient.

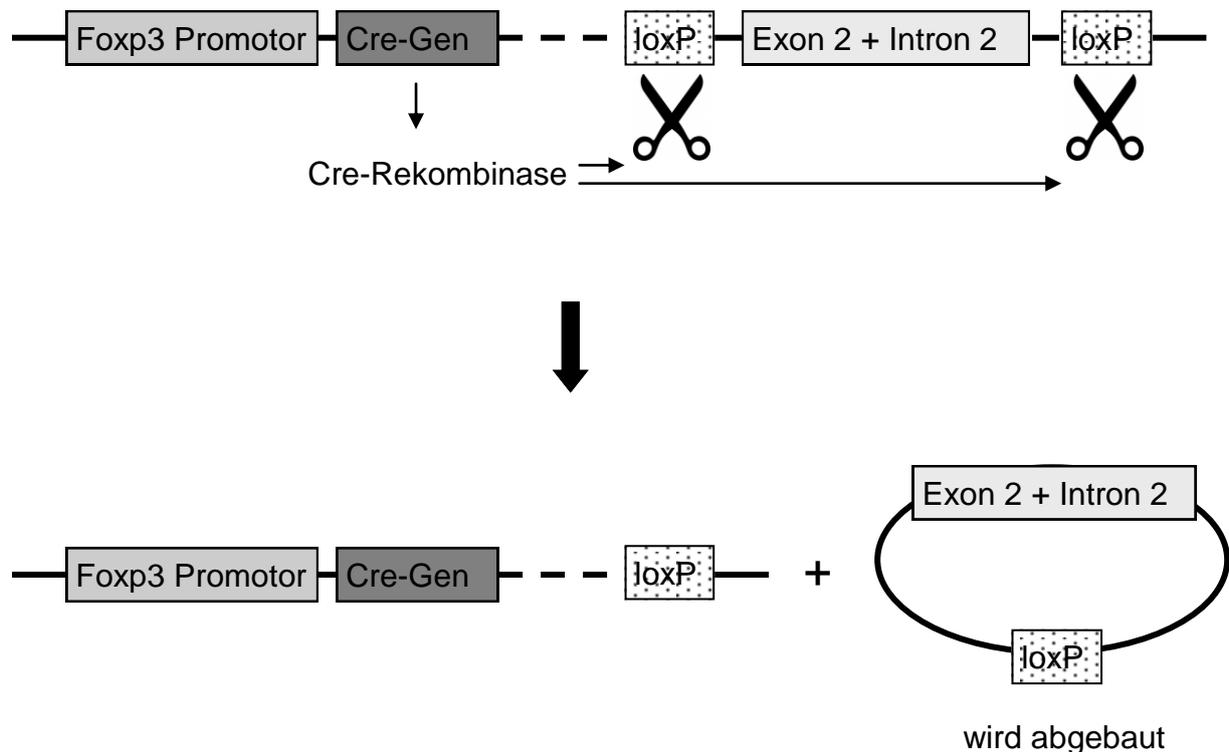


Abb. 6: Schematische Darstellung des Cre/loxP-Systems

Die vom Foyp3-Promotor gesteuerte Cre-Rekombinase schneidet an den loxP-Erkennungssequenzen das Exon 2 und das Intron 2 des EP4-Gens heraus.

In der Gruppe der *Foyp3 EP2 EP4* Tiere ist zusätzlich der EP2-Rezeptor konstitutiv auf allen körpereigenen Zellen ausgeschaltet. Dies geschieht durch homologe Rekombination des EP2-Locus. Die essentielle N-terminale Kodierungssequenz des EP2-Gens wird durch das Einbringen einer PGK-neo Sequenz (Phosphoglycerin Kinase - Neomycin) unterbrochen, sodass das EP2-Gen nicht mehr exprimiert werden kann (35). *Foyp3 EP2 EP4* Tiere haben also keinen EP4-Rezeptor auf den Tregs und keinen EP2-Rezeptor auf allen körpereigenen Zellen.

Im Unterschied dazu hatten die *EP2ko* Tiere nur eine EP2-Defizienz auf allen Zellen, jedoch kein Cre-Gen im Foyp3-Promotor und somit keine EP4-Defizienz, siehe **Tab. 14**.

Tab. 14: Die genetischen Eigenschaften der Versuchstiere

	Cre-Rekombinase in Foxp3-positiven Zellen	EP4-defizient auf Foxp3- positiven Zellen	EP2-defizient auf allen Zellen
Wildtyp			
Foxp3 Cre	X		
Foxp3 EP4	X	X	
Foxp3 EP2 EP4	X	X	X
EP2ko			X

Um den Einfluss von EP2- und EP4-Rezeptor Defizienz beurteilen zu können, mussten die genmanipulierten Tiere mit einer Kontrolle verglichen werden. Es sollte nur der Einfluss der Rezeptordefizienz, nicht aber des Cre-Rekombinase Gens, untersucht werden. Daher musste eine Beeinflussung durch die Präsenz des Cre-Gens ausgeschlossen werden (Siehe Abschnitt „Vergleich WT mit Foxp3 Cre“), bzw. im Vergleich berücksichtigt werden. Als valide Kontrolle wird deshalb für die Gruppen Foxp3 EP4 und Foxp3 EP2 EP4 die Foxp3 Cre-Gruppe verwendet. Für die EP2ko-Tiere wird die WT-Gruppe verwendet, da sie kein Cre-Gen exprimiert.

3.2. Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde gDNA aus Schwanzbiopsien verwendet, die erst lysiert und dann per PCR analysiert wurden. Pro analysiertem genetischem Merkmal wurden zwei spezifischer Primer verwandt, sowohl für die Wildtyp- als auch die für modifizierte Form. Es wurde auf die veränderten Genloci der Prostaglandinrezeptoren EP2 und EP4 sowie die Präsenz der Cre-Rekombinase getestet.

Foxp3 Cre PCR

Die Tiere der Gruppen *Foxp3 Cre*, *Foxp3 EP4* und *Foxp3 EP2 EP4* verfügen über das Cre-Rekombinase-Gen. Da nur homozygote Elterntiere verwendet wurden, waren die getesteten Tiere im Allgemeinen ebenfalls homozygot Foxp3-Cre positiv, siehe **Abb. 7**.

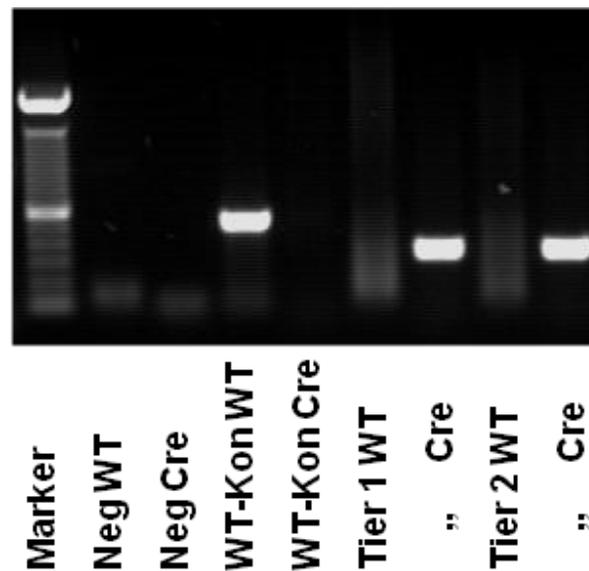


Abb. 7: Beispiel einer Foxp3 Cre PCR.

Die korrespondierenden WT- und Cre-PCR sind nebeneinander aufgetragen. Verwendet wurde ein 100 bp Marker, die Negativkontrollen wurden mit H₂O anstatt gDNA durchgeführt. Die WT-Kontrollen ohne Cre-Gen zeigen ausschließlich die WT-Bande bei 500 bp, während homozygot Cre tragende Tiere die Cre-Bande bei 346 bp zeigen. Alle hier getesteten Tiere haben den Genotyp Cre/Cre.

EP2ko PCR

Tiere der Gruppen *Foxp3 EP2 EP4* und *EP2ko* waren konstitutiv EP2 defizient, also auf allen körpereigenen Zellen. Um heterozygote oder WT-Tiere identifizieren und eliminieren zu können, war eine PCR nötig. Die **Abb. 8** zeigt beispielhaft die möglichen Ergebnisse EP2-defizienter (-/-), heterozygoter (+/-) oder WT-Mäuse (+/+).

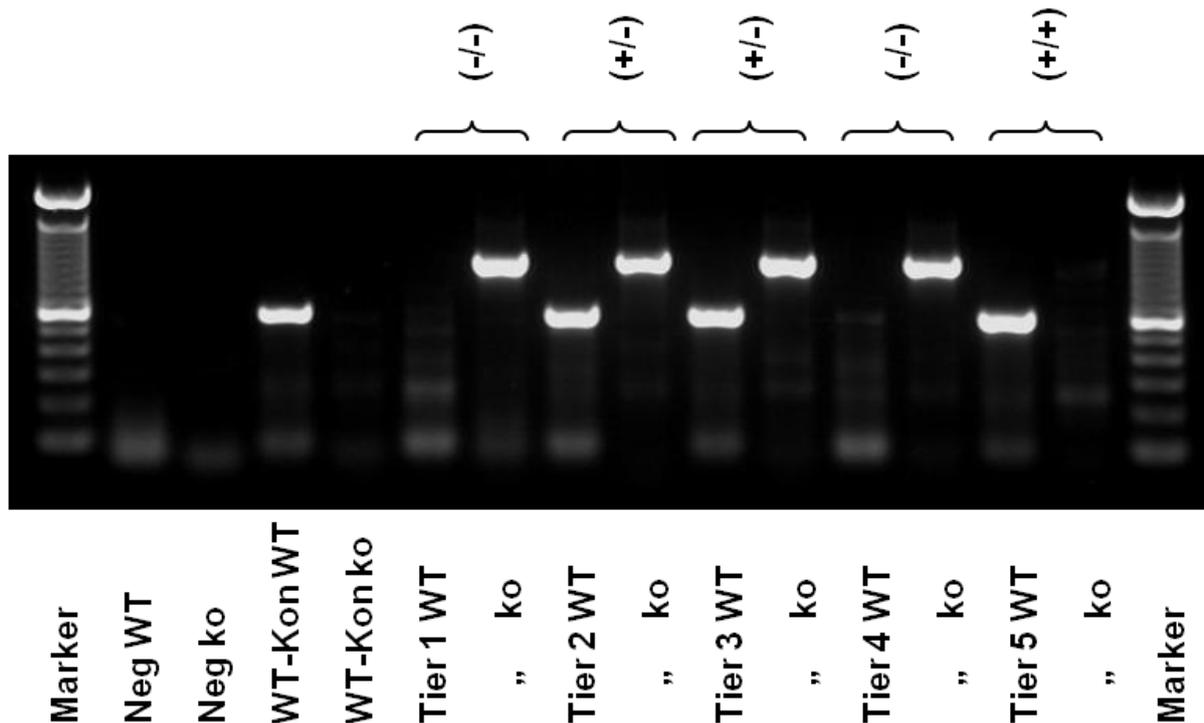


Abb. 8: Beispiel einer EP2ko PCR

Die korrespondierenden WT- und ko-PCR sind nebeneinander aufgetragen. Verwendet wurde ein 100 bp Marker, die Negativkontrollen wurden mit H₂O anstatt gDNA durchgeführt. Eine WT-Kontroll-PCR dient zur weiteren Validierung der Genotypisierung. Die Bande des WT-Primers liegt bei 575 bp, die des ko-Primers bei 1100 bp. Alle möglichen Genotypkombinationen sind vertreten, EP2-defizient (-/-), heterozygot (+/-) und WT (+/+).

EP4 flox PCR

Tiere der Gruppen *Foxp3* *EP2* *EP4* und *Foxp3* *EP4* waren nur auf den Foxp3-positiven Treg-Zellen EP4 defizient, da konstitutiv EP4 defiziente Tiere aufgrund des fehlenden Verschlusses des Ductus botalli nach der Geburt nicht überlebensfähig sind (36). Daher war der verwendete Primer komplementär zu den transgenen loxP-Loci vor und nach dem EP4-Gen. Diese loxP-Loci sind Ansatzpunkte der Cre-Rekombinase, die in den Foxp3-Cre positiven Treg-Zellen exprimiert wird. So kann die Cre-Rekombinase spezifisch nur in den Foxp3-positiven Zellen den geflochten Teil des EP4-Gens entfernen. Da nur homozygote Elterntiere verwendet wurden, waren im Allgemeinen alle getesteten Tiere homozygot EP4 geflocht, siehe **Abb. 9**.

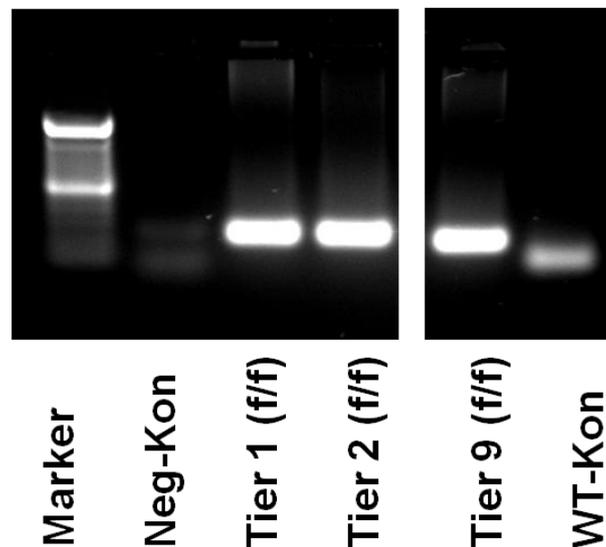


Abb. 9: Beispiel einer EP4 flox PCR.

Demselben Ansatz wurden sowohl die WT-Primer als auch die Flox-Primer zugefügt. Die Negativkontrolle wurde mit H₂O anstatt gDNA durchgeführt. Eine WT-Kontroll-PCR dient zur weiteren Validierung der Genotypisierung. Die WT-Bande liegt bei 127 bp, die Flox-Bande bei 231 bp. Alle hier getesteten Tiere sind EP4-geflocht (f/f).

3.3. Experimentelles Layout

Alle Mäuse wurden nach dem gleichen Schema behandelt, siehe **Abb. 10**. An Tag 0 wurden gewichtsadaptiert (siehe Tab. 7 auf Seite 34) Nephrotoxisches Serum (NTS) intraperitoneal injiziert. Drei und neun Tage später wurde der Sechs-Stunden-Sammelurin auf Albumin und Kreatinin untersucht, um anhand der Albumin/Kreatinin Ratio die Albuminurie eines Tieres zu bestimmen. Am zehnten Tag wurden die Tiere getötet und Blut und Nieren entnommen. Das Blut wurde zur Harnstoffbestimmung, die Nieren für histologische Färbungen und zur RNA-Gewinnung weiterverarbeitet. Einige Tiere wurden bereits an Tag vier getötet, um in den Nieren die Bindung von Schaf-IgG nachzuweisen.

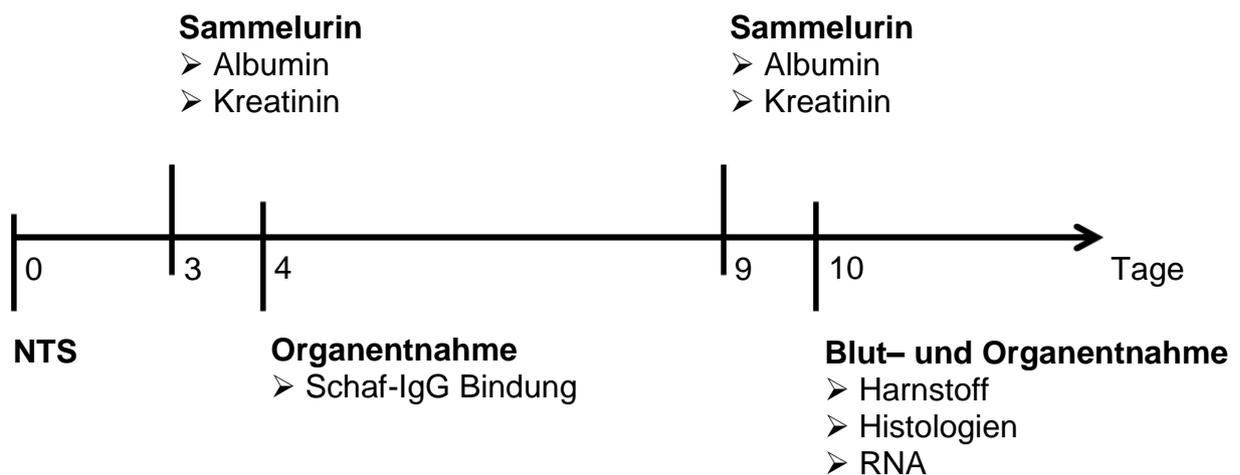


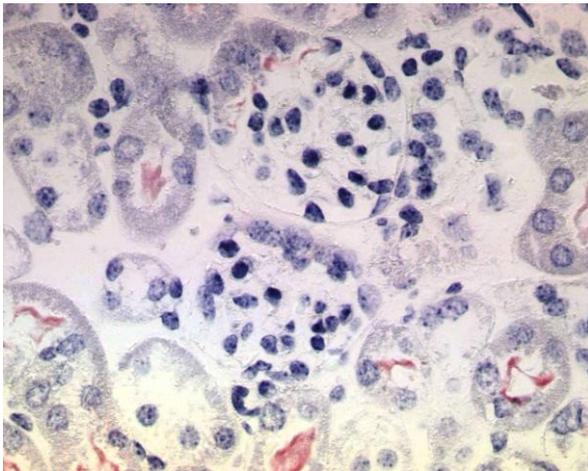
Abb. 10: Experimentelles Layout

3.4. Bindung von Schaf IgG im Glomerulum

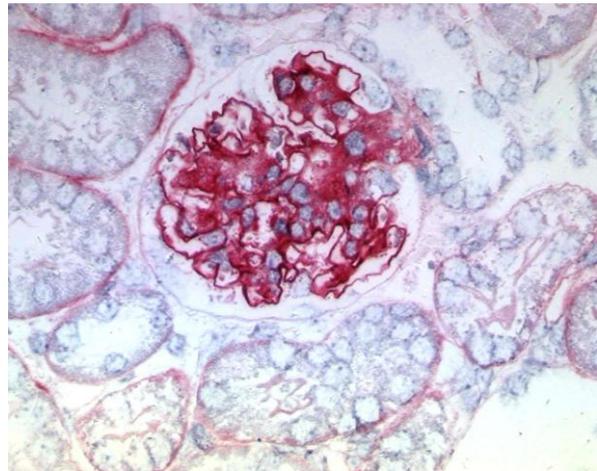
Zum Beleg, dass das Schaf-IgG tatsächlich im Glomerulum bindet, wurde an Tag vier eine Nachweis-Färbung angefertigt. Die Nierenschnitte aller Tiergruppen wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen Schaf-IgG gefärbt. Eine vergleichbare Schaf-IgG Bindung bei allen Tiergruppen weist auf eine vergleichbare Induktion der experimentellen Erkrankung hin. Exemplarische Ausschnitte sind in **Abb. 11** zu sehen.

Schaf IgG Bindung

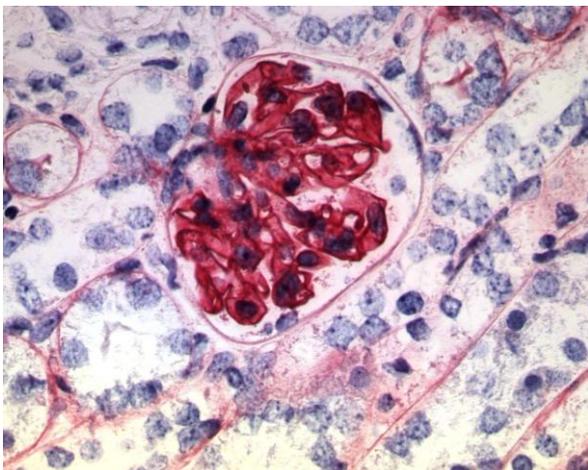
Foxp3 Cre Kontrolle



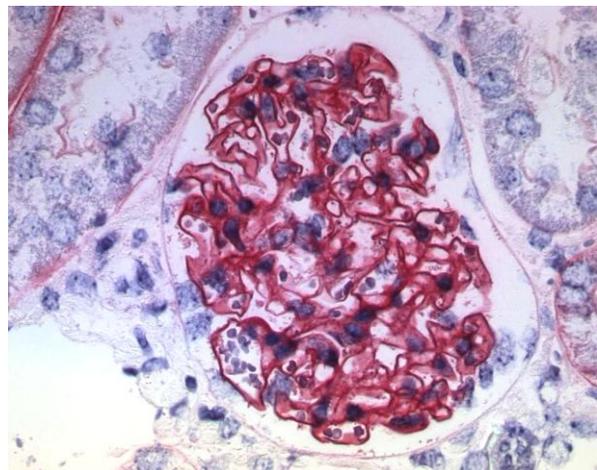
Foxp3 Cre NTN 4 d



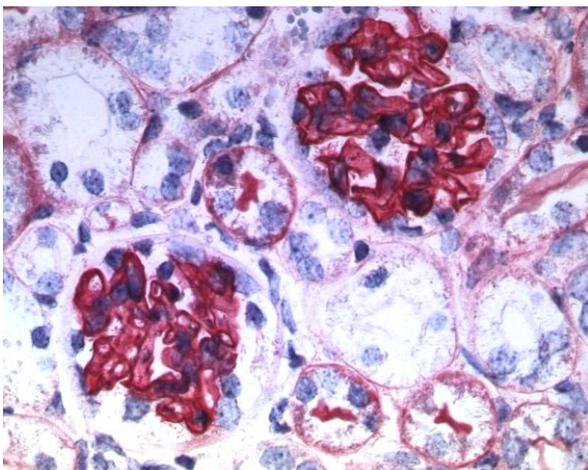
WT NTN 4 d



Foxp3 EP4 NTN 4 d



EP2ko NTN 4 d



Foxp3 EP2 EP4 NTN 4 d

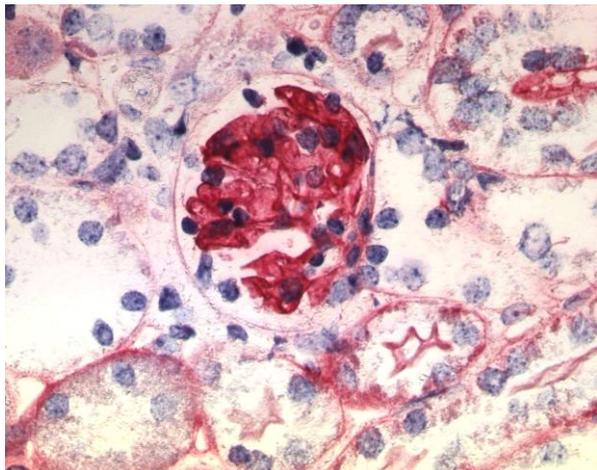


Abb. 11: Exemplarische Schaf IgG-Färbungen aller Tiergruppen

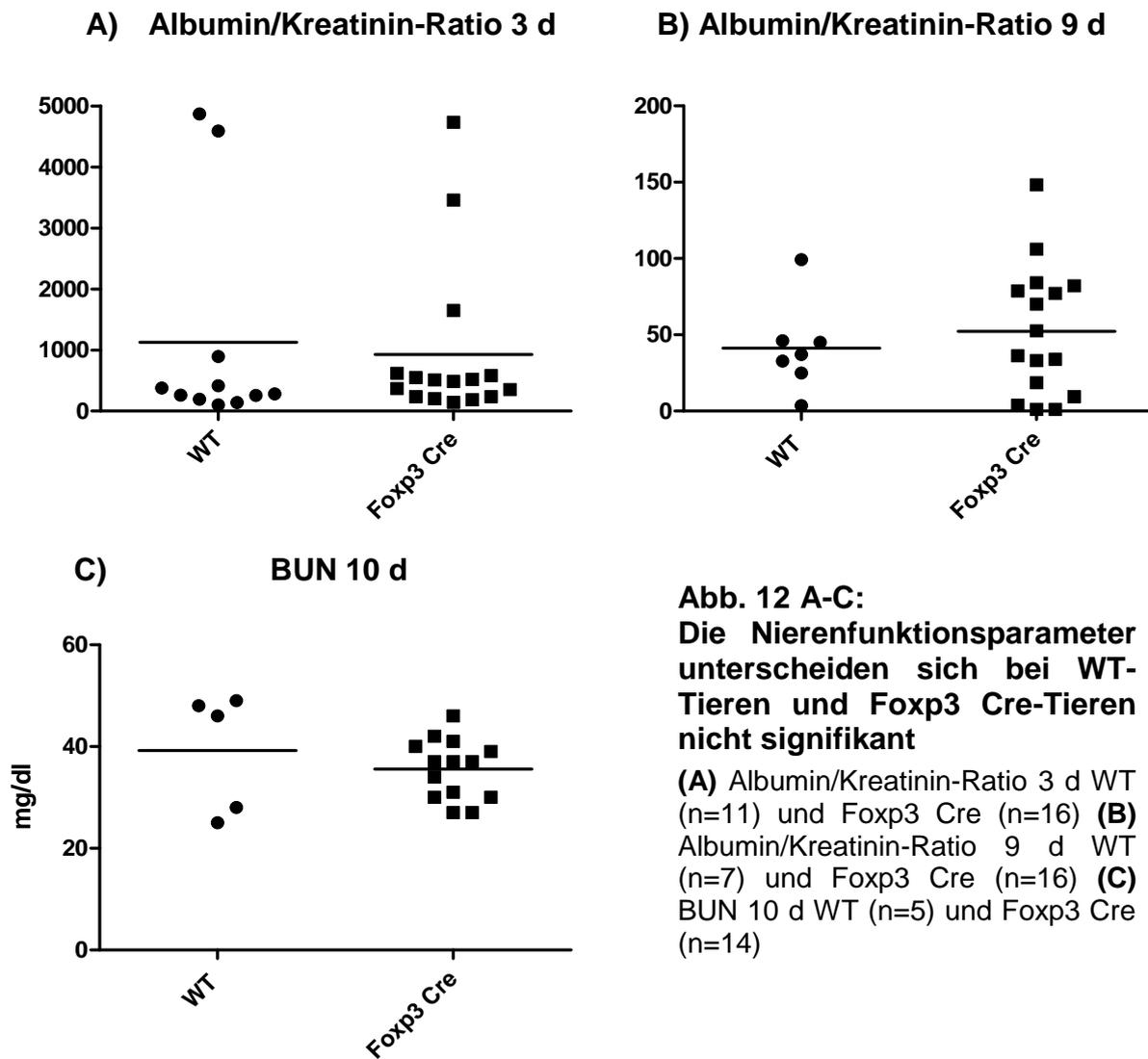
In Originalvergrößerung 400fach, die Foxp3 Cre Kontrolle ist vergleichbar mit der WT-Kontrolle (nicht gezeigt)

3.5. Vergleich Wildtyp mit *Foxp3 Cre*

Wie bereits im Abschnitt „Transgene Tiere“ erwähnt, muss für eine sinnvolle Beurteilung der Ergebnisse immer eine valide Kontrolle herangezogen werden. Notwendigerweise müssen die Gruppen *Foxp3 EP4* und *Foxp3 EP2 EP4* mit Tieren der *Foxp3 Cre* Gruppe verglichen werden, da in diesen Tieren die Cre-Rekombinase in den Tregs exprimiert wird. Daher wird im Folgenden dargestellt, dass die *Foxp3 Cre* Gruppe eine valide Kontrolle darstellt, und das Cre-Gen an sich keinen Einfluss auf den Verlauf der NTN hat. Die *Foxp3 Cre* Gruppe muss sich also ähnlich verhalten wie die *WT*-Tiere.

3.5.1. Nierenfunktion

Die zur Quantifizierung der Nierenfunktion herangezogenen Parameter waren die Albumin/Kreatinin-Ratio an Tag 3 und Tag 9, sowie der BUN-Wert an Tag 10. Die Albumin/Kreatinin-Ratio an Tag 3 zeigte keinen wesentlichen Unterschied (WT: 1125 ± 541,4 n=11; *Foxp3 Cre*: 926,1 ± 326,4 n=16), siehe **Abb. 12 A**. An Tag 9 waren sich die Werte ebenso ähnlich (WT: 41,21 ± 11,09 n=7; *Foxp3 Cre*: 52,24 ± 10,64 n=16), siehe **Abb. 12 B**. Auch die BUN-Werte an Tag 10 unterschieden sich kaum (WT: 39,20 ± 5,23 mg/dl n=5; *Foxp3 Cre*: 35,57 ± 1,57 mg/dl n=14), siehe **Abb. 12 C**. Es bestand also kein signifikanter Unterschied zwischen *WT*- und *Foxp3 Cre*-Tieren bezüglich ihrer Nierenfunktion.



3.5.2. Glomerulärer Schaden

Der glomeruläre Schaden wurde am zehnten Tag anhand des arbiträren PAS-Scores und der Zählung der Halbmonde beurteilt. Halbmondbildung ist pathognomonisch für die hier untersuchte Form von Glomerulonephritis. Die zellulären Halbmonde bilden sich innerhalb der Bowman Kapsel. Sie sind mehrschichtig und bestehen vor allem aus proliferierenden parietalen Epithelzellen (37). In **Abb. 19** sind exemplarische Ausschnitte der PAS-Färbungen zu sehen, sie zeigen auch Halbmonde.

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen *WT* und *Foxp3 Cre*, sowohl beim PAS-Score (*WT*: $1,57 \pm 0,06$ $n=9$; *Foxp3 Cre*: $1,48 \pm 0,06$ $n=18$) als auch in der Halbmondzählung (*WT*: $28,83 \pm 2,21$ % $n=9$; *Foxp3 Cre*: $22,53 \pm 2,66$ % $n=17$), siehe **Abb. 13 A, B**.

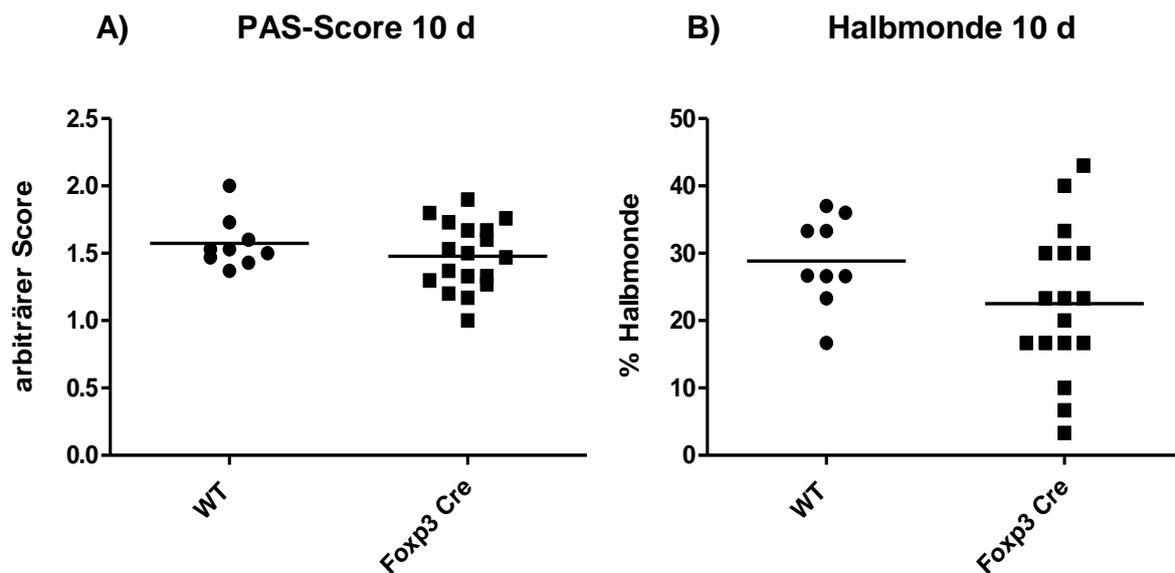


Abb. 13: Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und Foxp3-Tieren im Bezug auf den glomerulären Schaden

(A) PAS-Score 10 d WT ($n=9$) und Foxp3 Cre ($n=18$) **(B)** Halbmonde 10 d WT ($n=9$) und Foxp3 Cre ($n=17$)

3.5.3. Tubulo-interstitieller Zellinflux

Zur Differenzierung und Quantifizierung des tubulo-interstitiellen Zellinfluxes wurden drei verschiedene immunhistochemische Färbungen genutzt: Die CD3-Färbung zur Markierung aller T-Zelltypen, die F4/80-Färbung für Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen und die Foxp3-Färbung zur Zählung der Tregs. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied sowohl in der CD3-Färbung (WT: $55,01 \pm 5,03$ n=8; Foxp3 Cre: $66,67 \pm 5,63$ n=11) als auch in der F4/80-Färbung (WT: $71,94 \pm 8,73$ n=9; Foxp3 Cre: $80,44 \pm 6,09$ n=12) siehe **Abb.14 A,B**. In der Foxp3-Färbung allerdings ergab sich ein signifikanter Unterschied. Der Influx an Tregs in der *Foxp3 Cre*-Gruppe lag mehr als doppelt so hoch wie bei den *WT*-Tieren (WT: $7,48 \pm 1,06$ n=11; Foxp3 Cre: $20,57 \pm 2,16$ n=11 $p < 0,001$) **Abb. 14 C**.

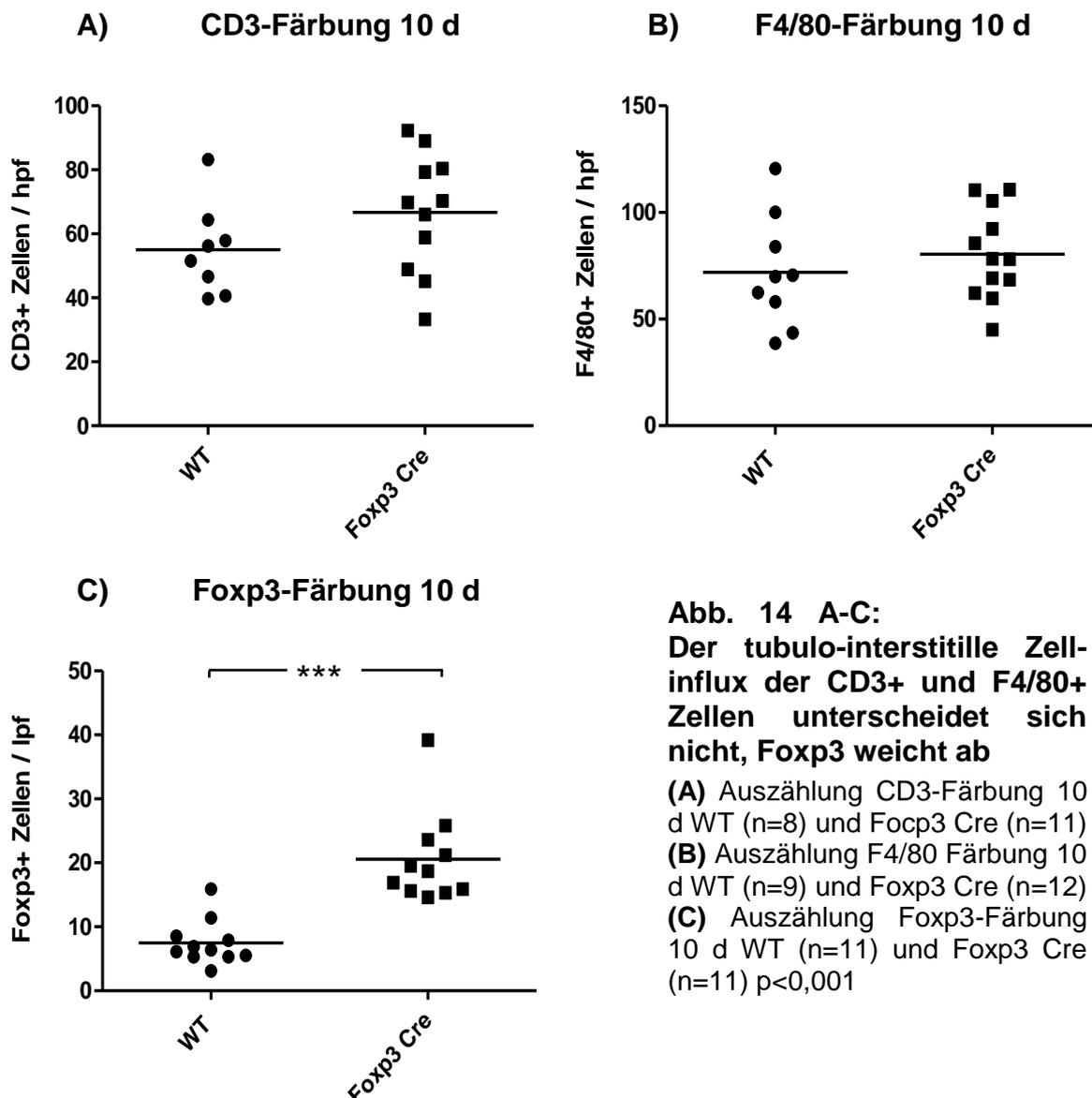


Abb. 14 A-C:
Der tubulo-interstitielle Zellinflux der CD3+ und F4/80+ Zellen unterscheidet sich nicht, Foxp3 weicht ab

(A) Auszählung CD3-Färbung 10 d WT (n=8) und Foxp3 Cre (n=11)
(B) Auszählung F4/80 Färbung 10 d WT (n=9) und Foxp3 Cre (n=12)
(C) Auszählung Foxp3-Färbung 10 d WT (n=11) und Foxp3 Cre (n=11) $p < 0,001$

3.5.4. mRNA-Expression

Es wurde die mRNA-Expression der proinflammatorischen Marker CCL2, Cox2, TNF α und IL-6 in der Nierenrinde am zehnten Tag gemessen. Das Ergebnis der Messung nephritischer Tiere wird angegeben als „x-fach im Vergleich zur gesunden Kontrolle“. Außerdem wurden zuvor alle Messwerte auf die konstitutiv exprimierte RNA des Housekeeping Gens 18S normalisiert. Es wurde errechnet, wievielfach höher die Expression der mRNA der proinflammatorischen Marker war.

Es zeigte sich eine Abweichung zwischen den *WT*-Tieren und der *Foxp3 Cre*-Gruppe bei den Markern CCL2 (*WT*: 25,05 \pm 2,51 n=7; *Foxp3 Cre*: 11,37 \pm 1,08 n=14, p<0,001) und Cox2 (*WT*: 5,66 \pm 0,95 n=8; *Foxp3 Cre*: 3,05 \pm 0,29 n=17, p<0,05).

In beiden Fällen war die RNA Expression der *Foxp3 Cre*-Tiere im Vergleich zu den *WT*-Tieren signifikant erniedrigt. Nicht signifikant unterschieden sich die Werte von TNF α (*WT*: 5,96 \pm 1,05 n=11; *Foxp3 Cre*: 4,31 \pm 0,26 n=15) und IL-6 (*WT*: 31,47 \pm 6,06 n=10; *Foxp3 Cre*: 16,34 \pm 1,52 n=14). Siehe **Abb. 15 A-D**.

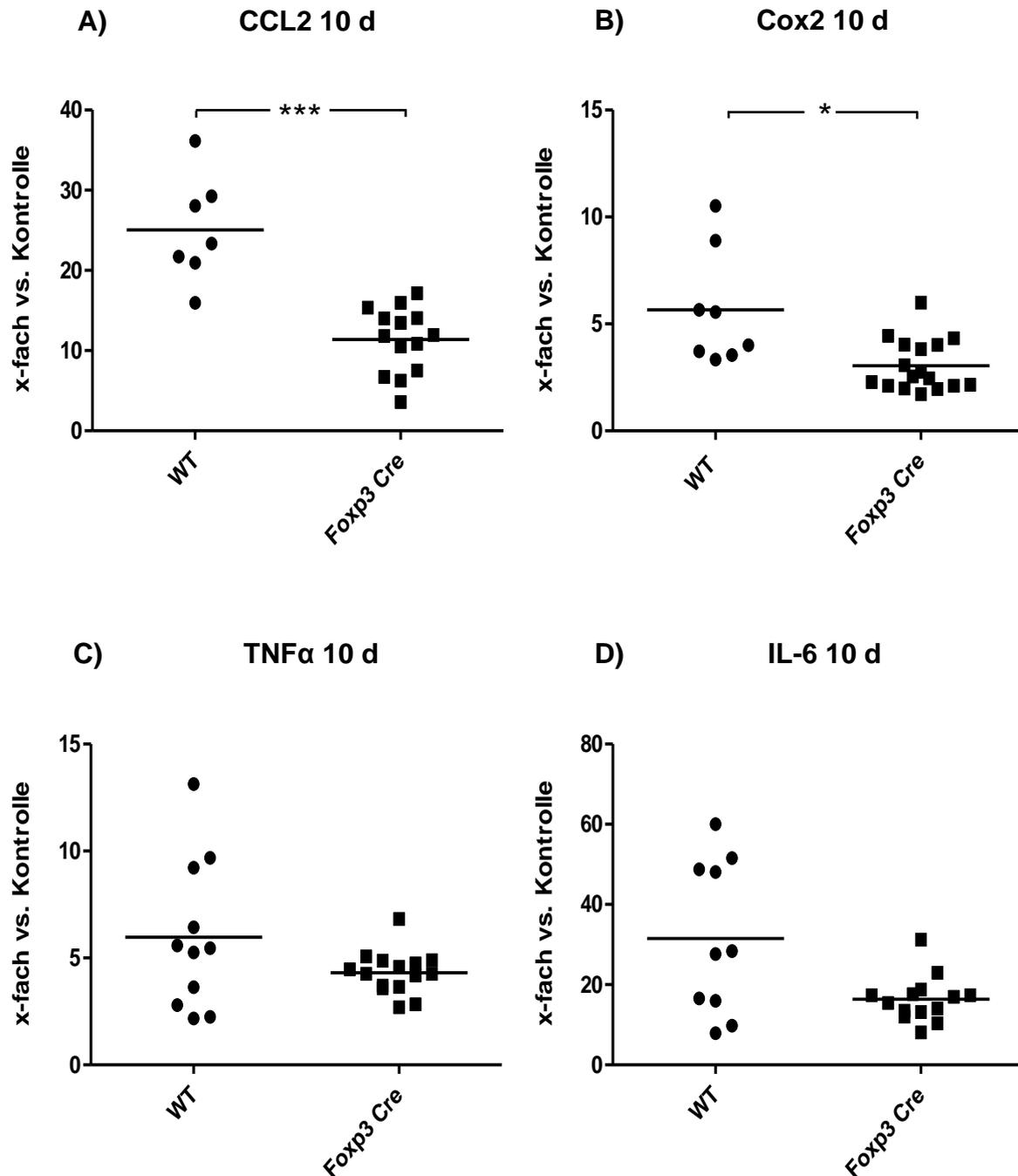


Abb. 15 A-D: Die proinflammatorischen Marker CCL2 und Cox2 weisen signifikante Unterschiede auf, TNF α und IL-6 dagegen nicht

Alle Ergebnisse werden angegeben in x-facher Veränderung nephritischer Tiere im Vergleich zu entsprechend gesunden Kontrolltieren **(A)** mRNA-Expression in der Nierenrinde von CCL2, WT (n=7) und Foxp3 Cre (n=14) $p < 0,001$ **(B)** mRNA-Expression Cox2, WT (n=8) und Foxp3 Cre (n=17) $p < 0,05$ **(C)** mRNA-Expression TNF α , WT (n=11) und Foxp3 Cre (n=15) **(D)** mRNA-Expression IL-6, WT (n=10) und Foxp3 Cre (n=14)

Bei der Betrachtung der vier Parameter Nierenfunktion, glomerulärer Schaden, Zellinflux und mRNA-Expression im Zusammenhang ist also festzustellen, dass sich zwischen den Gruppen *WT* und *Foxp3 Cre* kein essentieller Unterschied zeigt. Untermuert wird diese Annahme vor allem durch die wesentlichen Parameter glomerulärer Schaden und Zellinflux der CD3+ und F4/80+ Zellen (siehe auch **Abb. 22 und 24** auf Seite 68 und 70, Fotos der immunhistologischen Färbungen). Somit können die *Foxp3 Cre*-Tiere als Kontroll-Gruppe für *Foxp3 EP4* und *Foxp3 EP2 EP4* herangezogen werden. Als Kontroll-Gruppe für *EP2ko* werden aufgrund des nicht vorhandenen Cre-Gens die *WT*-Tiere verwendet.

3.6. Nierenfunktion in der NTN

3.6.1. Albumin/Kreatinin-Ratio

Die Albumin/Kreatinin-Ratio wurde am dritten und neunten Tag erhoben. An Tag drei lagen die Werte von *Foxp3 EP4* und *Foxp3 EP2 EP4* nahe beieinander. Die *EP2ko*-Gruppe lag signifikant niedriger als die *Foxp3 EP2 EP4*-Tiere (*Foxp3 EP4*: $1252 \pm 281,60$ $n=18$; *Foxp3 EP2 EP4*: $1736 \pm 695,30$ $n=12$; *EP2ko*: $231,60 \pm 26,76$ $n=11$, $p < 0,01$ [$\diamond\diamond$]). Aber an Tag neun unterschieden sich *Foxp3 EP4* und *Foxp3 EP2 EP4* Tiere kaum, während *Foxp3 EP4* Tiere signifikant höhere Proteinurie im Vergleich zu *Foxp3 Cre* Kontrollen aufwiesen. Die Proteinurie von *EP2ko* war der *WT*-Kontrolle vergleichbar und geringer als die der beiden anderen Gruppen (*Foxp3 EP4*: $115,80 \pm 24,69$ $n=18$ $p < 0,05$ [\circ]; *Foxp3 EP2 EP4*: $127,60 \pm 65,30$ $n=12$; *EP2ko*: $27,29 \pm 9,91$ $n=10$). Siehe **Abb. 16 A,B**.

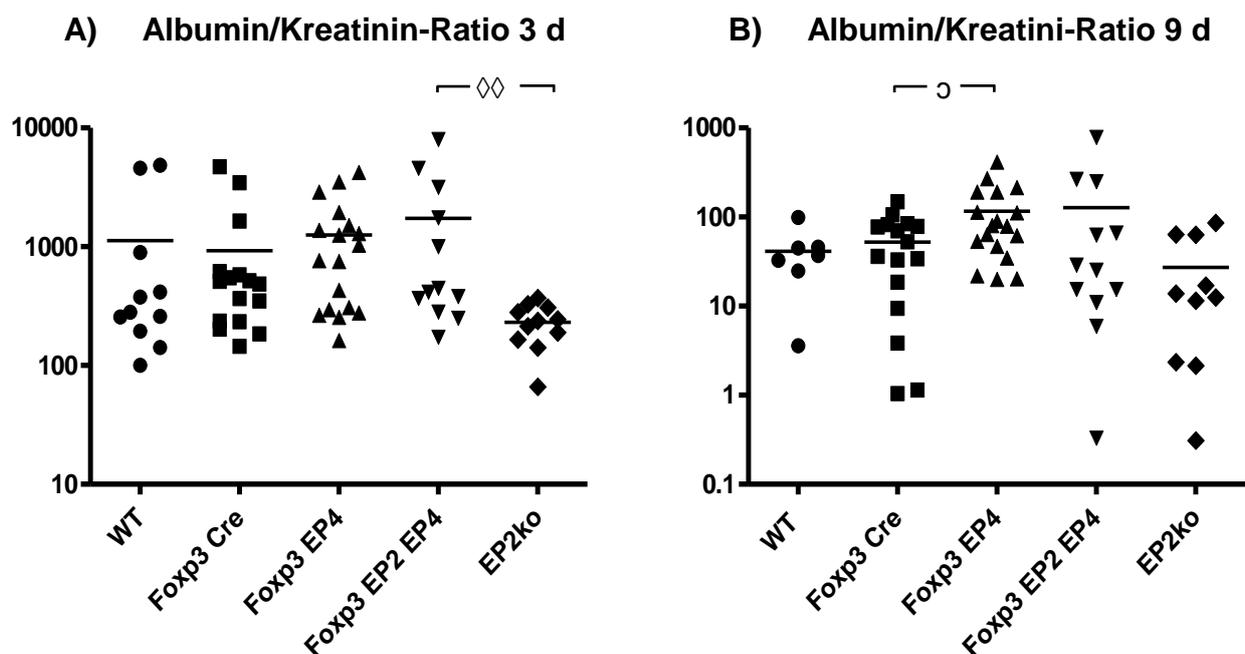


Abb. 16 A,B: Die Albumin/Kreatinin-Ratio an Tag 3 und 9 verhielt sich bei *Foxp3 EP4* und *Foxp3 EP2 EP4* ähnlich schlechter, *EP2ko* war gegenüber ihrer relevanten Kontrolltiere unverändert

(A) Albumin/Kreatinin-Ratio 3 d *Foxp3 EP4* ($n=18$), *Foxp3 EP2 EP4* ($n=12$) und *EP2ko* ($n=11$, $p < 0,01$ [$\diamond\diamond$]) **(B)** Albumin/Kreatinin-Ratio 9 d *Foxp3 EP4* ($n=18$, $p < 0,05$ [\circ]), *Foxp3 EP2 EP4* ($n=12$) und *EP2ko* ($n=10$)

3.6.2. BUN

Die BUN-Werte zeigten zwar keine signifikanten Unterschiede, aber eine absteigende Tendenz. Der Harnstoffgehalt des Serums von *Foxp3 EP4* lag auf einer Höhe mit der *Foxp3 Cre* Kontrolle, *Foxp3 EP2 EP4* war im Vergleich hierzu etwas erniedrigt. Die Werte der *EP2ko* Gruppe waren die Niedrigsten aller Gruppen (*Foxp3 EP4*: $36,21 \pm 1,63$ n=19; *Foxp3 EP2 EP4*: $32,63 \pm 2,20$ n=8; *EP2ko*: $26,25 \pm 2,06$ n=4). Siehe **Abb. 17**

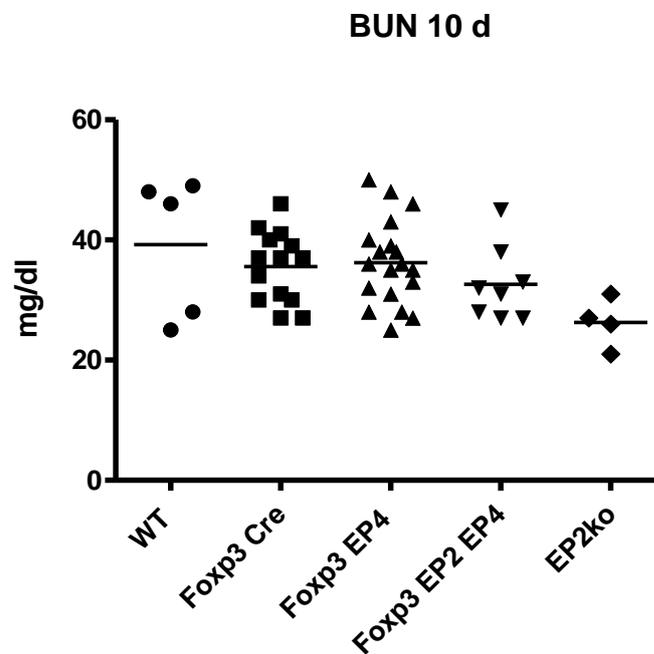


Abb. 17: Die BUN-Werte am zehnten Tag zeigen eine absteigende Tendenz
Foxp3 EP4 (n=19) Foxp3 EP2 EP4 (n=8) und EP2ko (4)

3.7. Schädigung der Glomeruli

3.7.1. PAS-Score

Der arbiträre PAS-Score zeigte eine signifikante Abnahme des glomerulären Schadens bei den Gruppen *Foxp3 EP4*, *Foxp3 EP2 EP4* und *EP2ko* im Verhältnis zu ihren Kontrollgruppen *Foxp3 Cre* bzw. *WT*. Untereinander unterschieden sie sich kaum (*Foxp3 EP4*: $1,28 \pm 0,04$ $n=18$ $p<0,05$ [◻]; *Foxp3 EP2 EP4*: $1,28 \pm 0,06$ $n=12$ $p<0,05$ [◻]; *EP2ko*: $1,22 \pm 0,03$ $n=7$ $p<0,01$ [ΔΔ]), siehe **Abb. 18**. In **Abb. 19** sind beispielhaft einige Glomeruli in der PAS-Färbung an Tag 10 der Erkrankung dargestellt. Die nicht vertretene WT-Kontrolle gleicht der *Foxp3 Cre*-Kontrolle. Ein Schaden im Glomerulum zeigt sich zum Beispiel durch eine Ansammlung PAS-positiven Materials, der Verminderung von Zellkernen, einer Verdickung der Strukturen oder der Entstehung eines Halbmondes.

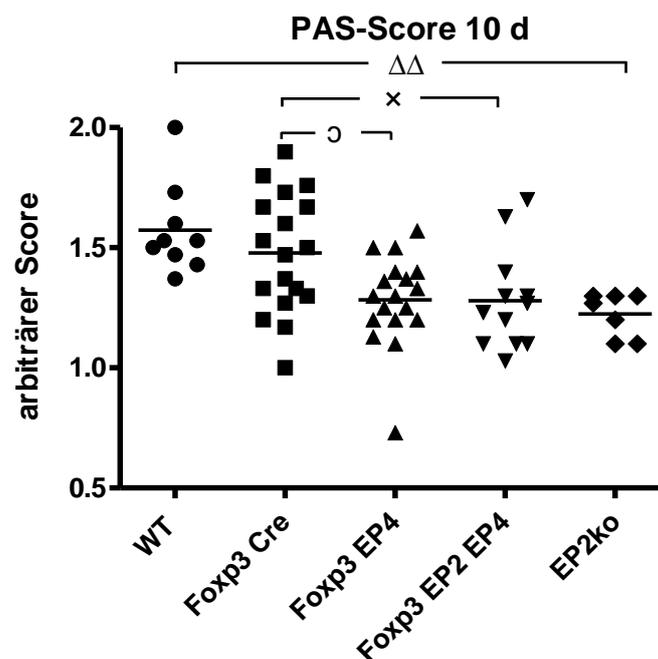
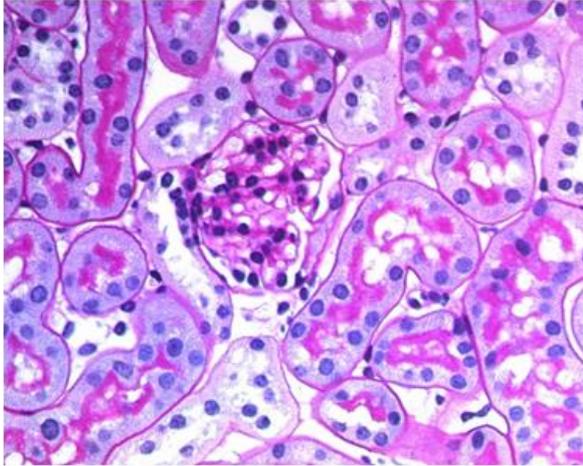
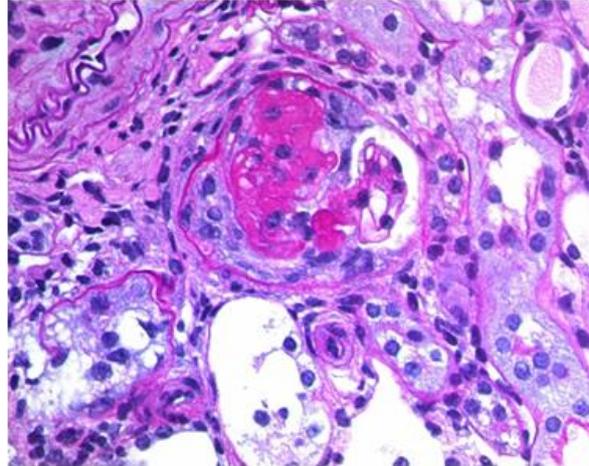
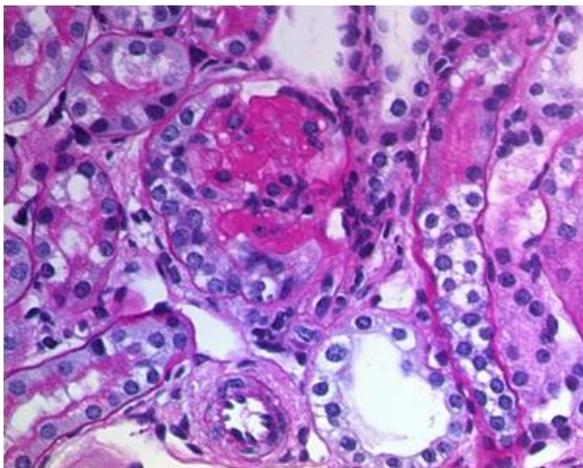
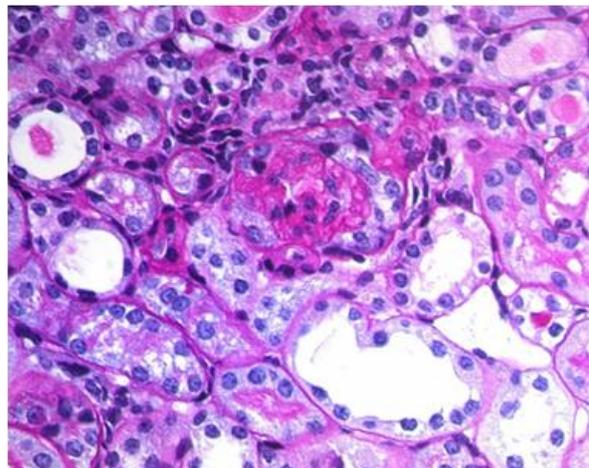
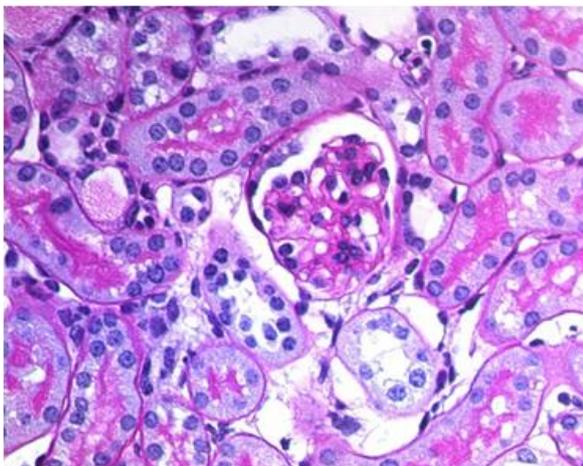
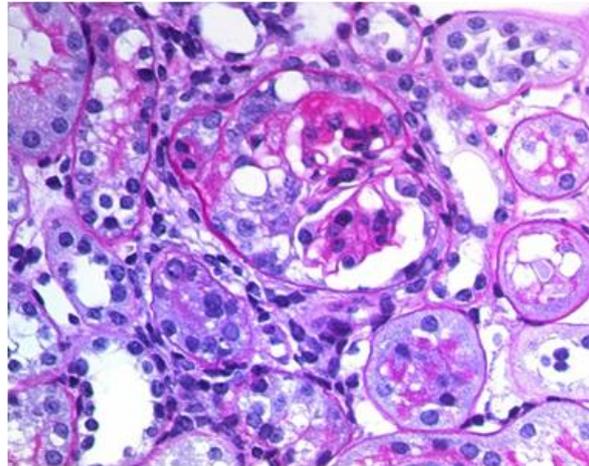


Abb. 18: Arbiträrer PAS-Score an Tag 10

Foxp3 EP4 ($n=18$ $p<0,05$ [◻]), *Foxp3 EP2 EP4* ($n=12$ $p<0,05$ [◻]) und *EP2ko* ($n=7$ $p<0,01$ [ΔΔ])

PAS-Färbungen**Foxp3 Cre Kontrolle****Foxp3 Cre NTN 10 d****WT NTN 10 d****Foxp3 EP4 NTN 10 d****EP2ko NTN 10 d****Foxp3 EP2 EP4 NTN 10 d****Abb. 19: Exemplarische PAS-Färbungen aller Tiergruppen**

In Originalvergrößerung 400fach, die Foxp3 Cre Kontrolle ist vergleichbar mit der WT-Kontrolle (nicht gezeigt)

3.7.2. Halbmondbildung

Die Quantifizierung der Halbmondbildung zeigte in allen drei Gruppen *Foxp3 EP4*, *Foxp3 EP2 EP4* und *EP2ko* eine abnehmende Tendenz. Signifikant geringer als ihre Kontrollgruppen waren *Foxp3 EP2 EP4* und *EP2ko* (*Foxp3 EP4*: $17,34 \pm 2,51$ n=18; *Foxp3 EP2 EP4*: $14,11 \pm 2,64$ n=13 $p < 0,05$ [*]; *EP2ko*: $7,62 \pm 1,75$ n=7 $p < 0,01$ [$\Delta\Delta$]), siehe **Abb. 20**.

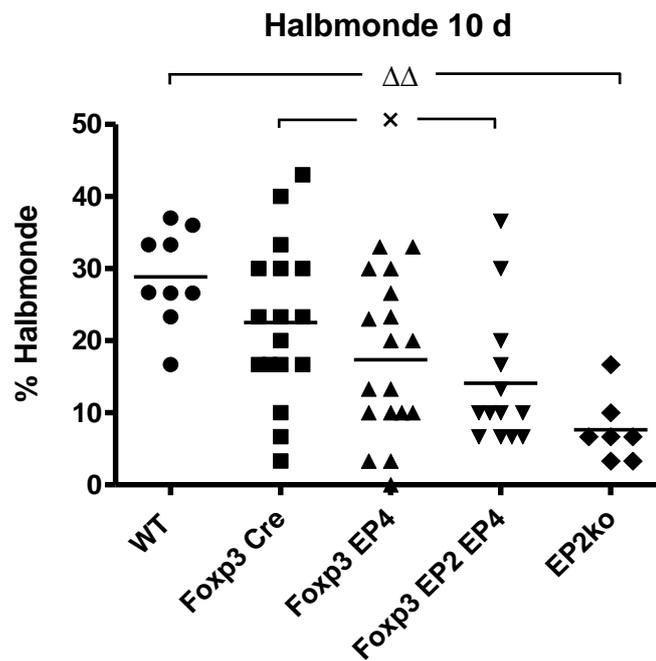


Abb. 20: Halbmondbildung an Tag 10

Foxp3 EP4 (n=18), *Foxp3 EP2 EP4* (n=13 $p < 0,05$ [*]) und *EP2ko* (n=7 $p < 0,01$ [$\Delta\Delta$])

3.8. Infiltrationsverhalten verschiedener Immunzellen

Um das Infiltrationsverhalten der verschiedenen Gruppen von Immunzellen analysieren und quantifizieren zu können, wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen der am zehnten Tag entnommenen Nierenschnitte angefertigt. Zu den CD3-positiven Zellen gehören alle T-Zellen, also sowohl CD4- als auch CD8-positive Zellen. Zellen mit dem F4/80-Marker auf der Oberfläche sind Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen. Die nukleäre Anfärbung von Foxp3 ist spezifisch für Tregs.

3.8.1. CD3 positive Zellen

Der Influx von T-Zellen in die Niere war bei den *Foxp3 EP4*-Tieren signifikant gesenkt, *Foxp3 EP2 EP4* verhielt sich ähnlich. Die *EP2ko*-Gruppe lag auf ähnlichem Niveau wie ihre *WT*-Kontrollgruppe (*Foxp3 EP4*: $44,87 \pm 5,37$ n=13 p<0,01 [∞]); *Foxp3 EP2 EP4*: $43,28 \pm 4,74$ n=11; *EP2ko*: $62,04 \pm 7,68$ n=7), siehe **Abb. 21**.

In **Abb. 22** sind exemplarisch Bilder der CD3-Färbung aller Tiergruppen dargestellt. Die nicht abgebildete *WT*-Kontrolle entspricht der *Foxp3 Cre*-Kontrolle. Bei 400facher Vergrößerung wird die periglomeruläre und peritubuläre Anhäufung der infiltrierenden CD3 positive Zellen sichtbar. Innerhalb der Glomeruli und Tubuli sind fast gar keine angefärbten Zellen zu sehen.

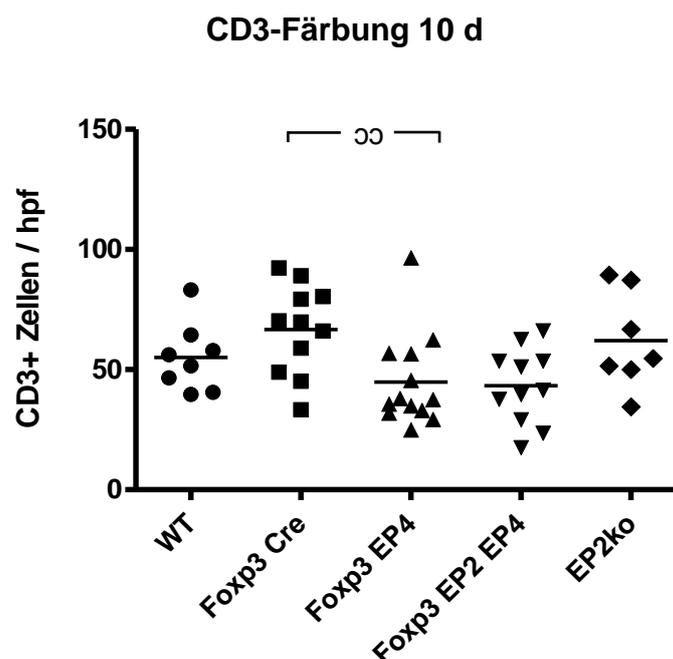
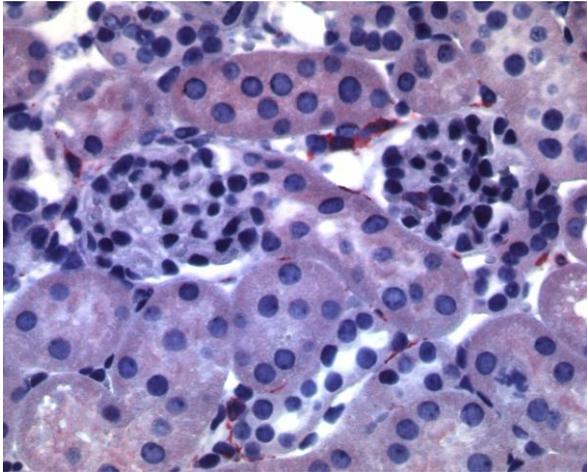
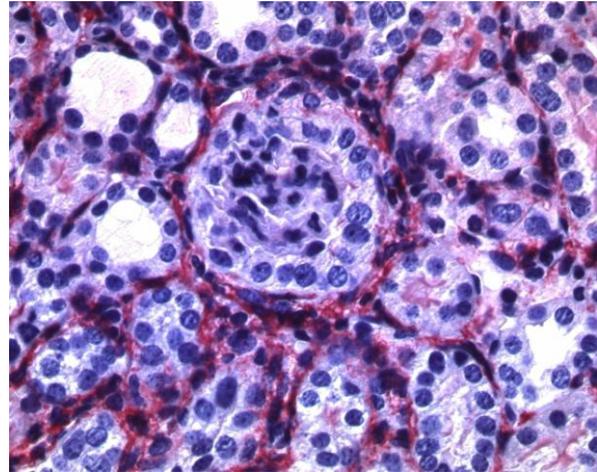
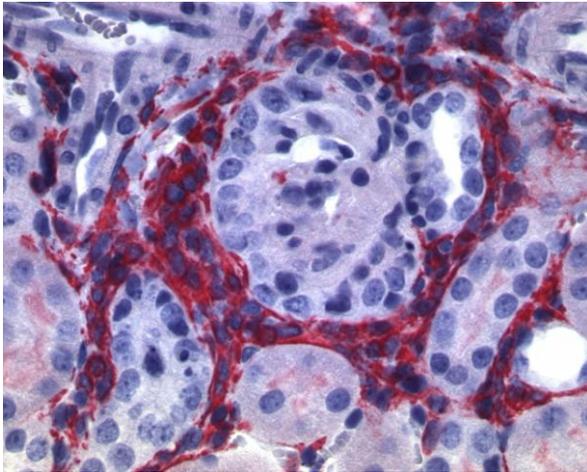
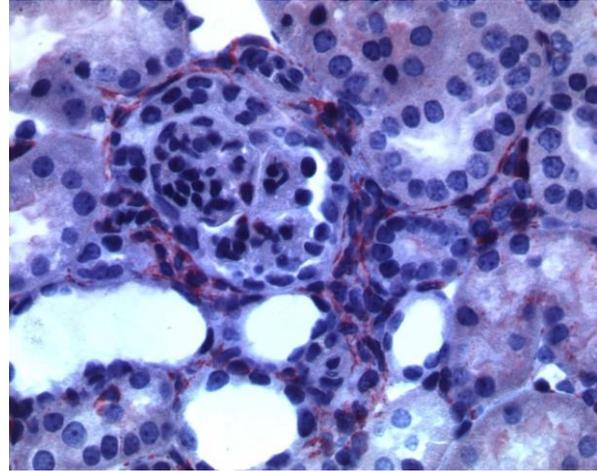
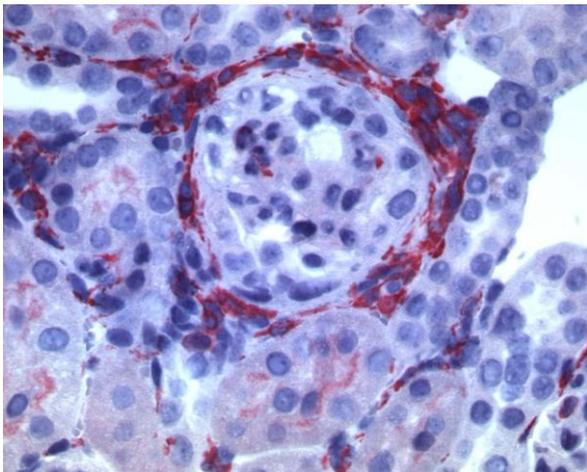
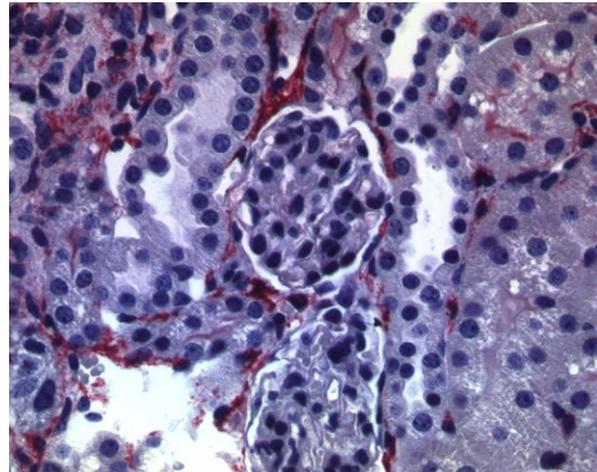


Abb. 21: Influx CD3-positiver Zellen an Tag 10

Foxp3 EP4 (n=13 p<0,01 [∞]), *Foxp3 EP2 EP4* (n=11) und *EP2ko* (n=7)

Immunhistochemische CD3-Färbungen**Foxp3 Cre Kontrolle****Foxp3 Cre NTN 10 d****WT NTN 10 d****Foxp3 EP4 NTN 10 d****EP2ko NTN 10 d****Foxp3 EP2 EP4 NTN 10 d****Abb. 22: Exemplarische CD3-Färbungen aller Tiergruppen**

In Originalvergrößerung 400fach, die Foxp3 Cre Kontrolle ist vergleichbar mit der WT-Kontrolle (nicht gezeigt)

3.8.2. F4/80 positive Zellen

Der Influx F4/80 positiver Zellen ist vergleichbar mit dem der CD3 positiven Zellen. Die Infiltration von Monozyten, Makrophagen und Dendritischer Zellen bei *Foxp3 EP4* und *Foxp3 EP2 EP4* Tieren war vermindert im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte der F4/80-Zählung der *EP2ko* Gruppe lagen etwas höher, auf demselben Niveau wie die der *WT*-Kontrollgruppe (*Foxp3 EP4*: $63,97 \pm 6,98$ n=13; *Foxp3 EP2 EP4*: $57,89 \pm 7,05$ n=10; *EP2ko*: $65,76 \pm 4,90$ n=7), siehe **Abb. 23**.

In **Abb. 24** sind exemplarisch Bilder der F4/80-Färbungen aller Tiergruppen dargestellt. Die nicht abgebildete *WT*-Kontrolle ist vergleichbar mit der *Foxp3 Cre*-Kontrolle. Auch hier war im Wesentlichen eine periglomeruläre und -tubuläre Anhäufung zu beobachten.

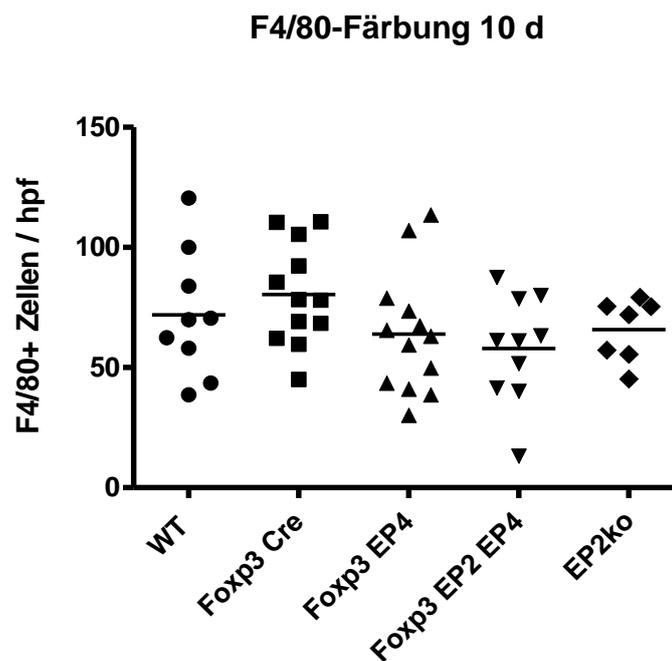
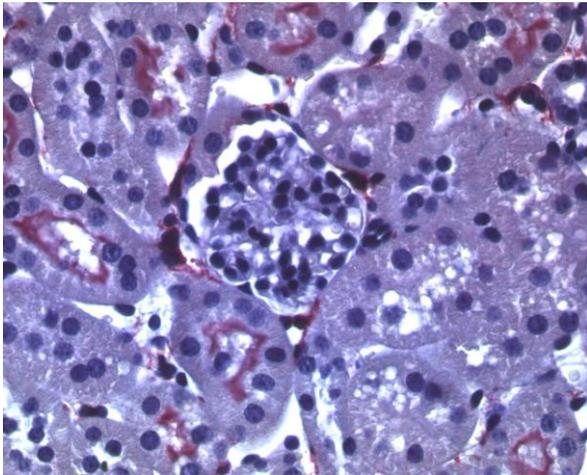
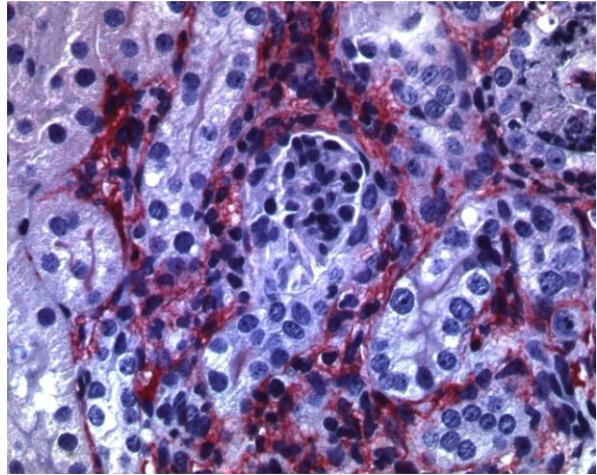
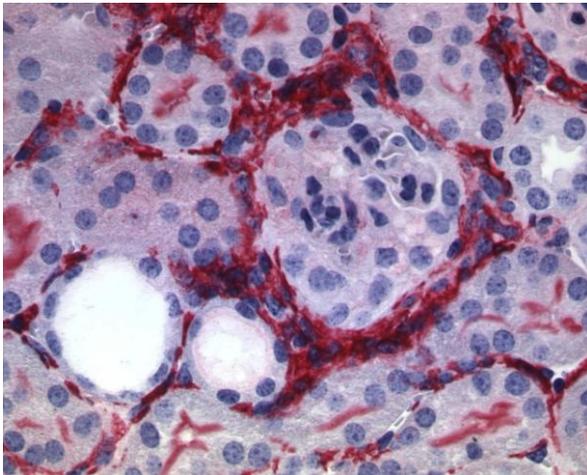
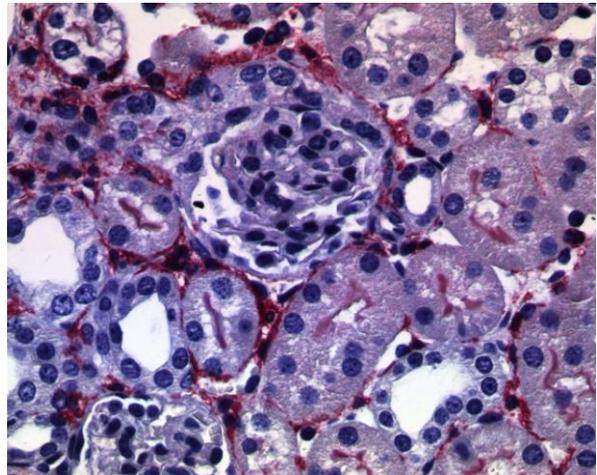
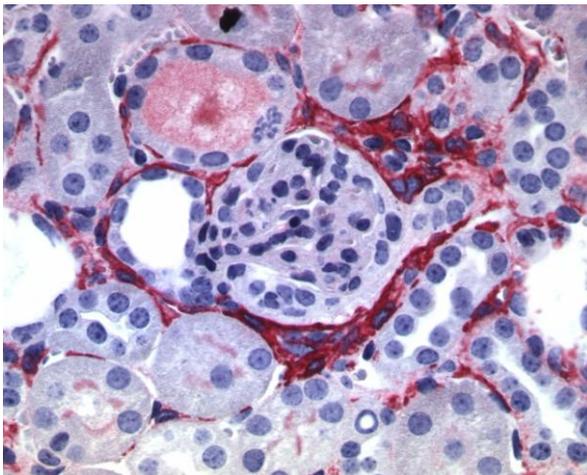
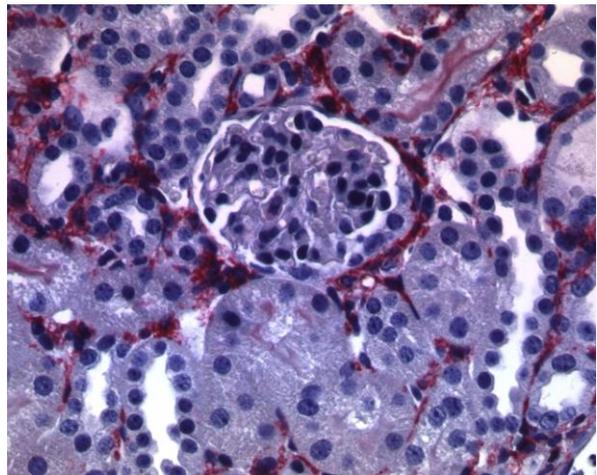


Abb. 23: Influx F4/80-positiver Zellen an Tag 10

Foxp3 EP4 (n=13), *Foxp3 EP2 EP4* (n=10) und *EP2ko* (n=7)

Immunhistochemische F4/80-Färbung**Foxp3 Cre Kontrolle****Foxp3 Cre NTN 10 d****WT NTN 10 d****Foxp3 EP4 NTN 10 d****EP2ko NTN 10 d****Foxp3 EP2 EP4 NTN 10 d****Abb. 24: Exemplarische F4/80-Färbungen aller Tiergruppen**

In Originalvergrößerung 400fach, die Foxp3 Cre Kontrolle ist vergleichbar mit der WT-Kontrolle (nicht gezeigt)

3.8.3. Foxp3 positive Zellen

Auch hier bewegten sich die Werte der Zählung Foxp3 positiver Tregs der Gruppen *Foxp3 EP4* und *Foxp3 EP2 EP4* im selben Bereich unterhalb der *Foxp3 Cre* Kontrolle. Die Treg-Infiltration bei *EP2ko* Tieren war geringer als in den anderen beiden Gruppen aber im Vergleich zur entsprechenden WT-Kontrolle erhöht. (Foxp3 EP4: $13,85 \pm 1,59$ n=12 p<0,05 [∅]; Foxp3 EP2 EP4: $14,94 \pm 3,13$ n=11; EP2ko: $9,78 \pm 1,22$ n=11), siehe **Abb. 25**. Ferner ist anzumerken, dass, wie bereits im Teil „Vergleich WT mit Foxp3 Cre“ beschrieben, ein signifikanter Unterschied zwischen WT und *Foxp3 Cre* besteht (WT: $7,48 \pm 1,06$ n=11; Foxp3 Cre: $20,57 \pm 2,16$ n=11 p<0,001).

Abb. 26 zeigt exemplarisch Foxp3-Färbungen aller Gruppen. Die nicht gezeigte WT-Kontrolle ist mit der *Foxp3 Cre*-Kontrolle vergleichbar. Insgesamt sind wesentlich weniger infiltrierende, angefärbte Zellen zu sehen, als in der CD3- und F4/80-Färbung. Die Tregs befanden sich im Gegensatz zum periglomerulären Infiltrationsmuster von T-Zellen und Monozyten/Makrophagen vor allen tubulointerstitiell.

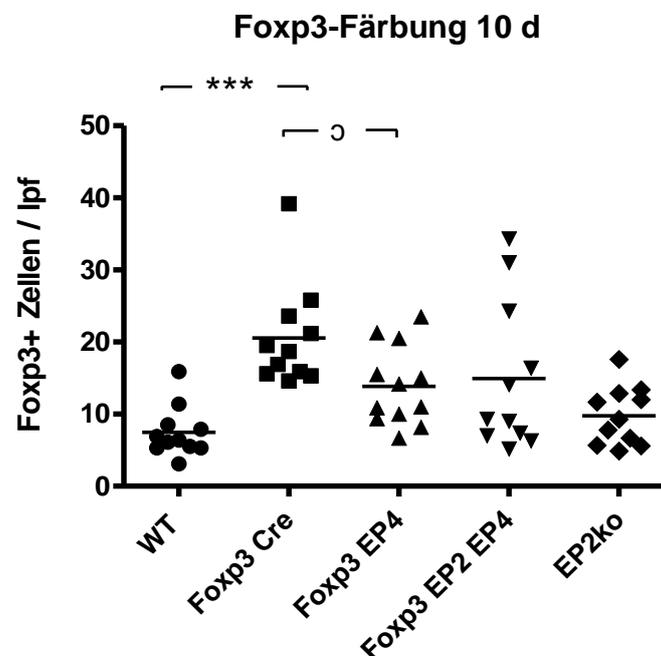
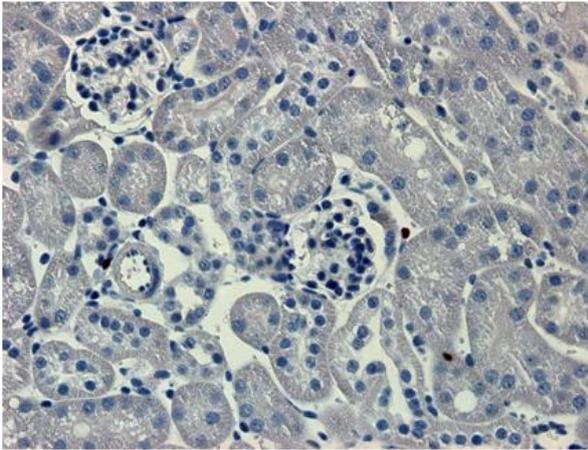
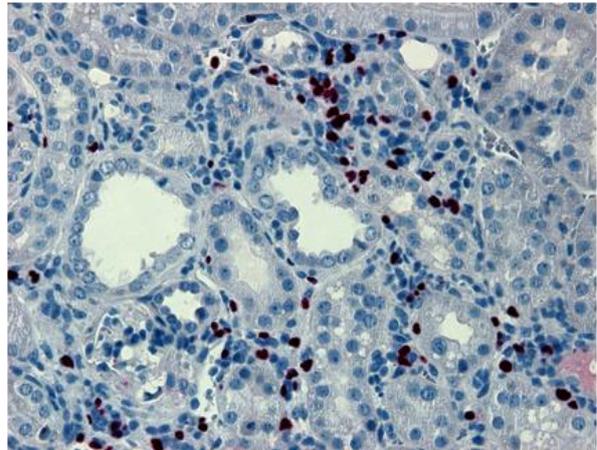
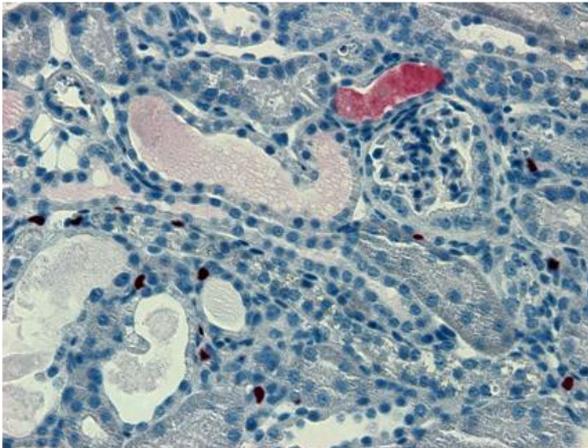
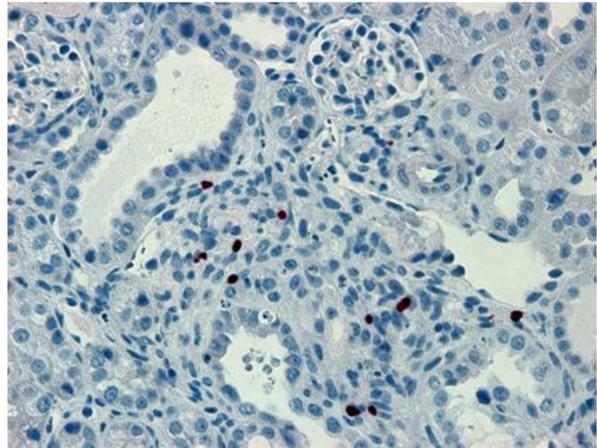
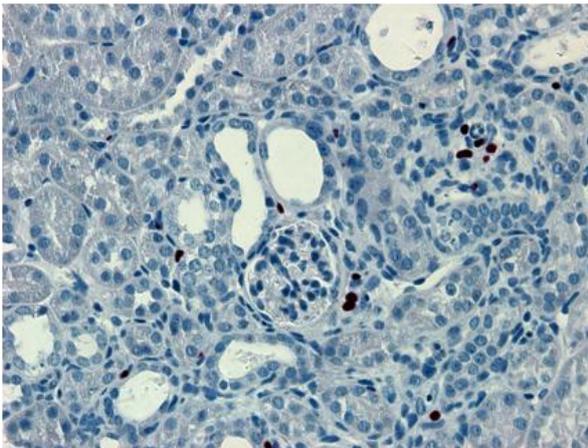
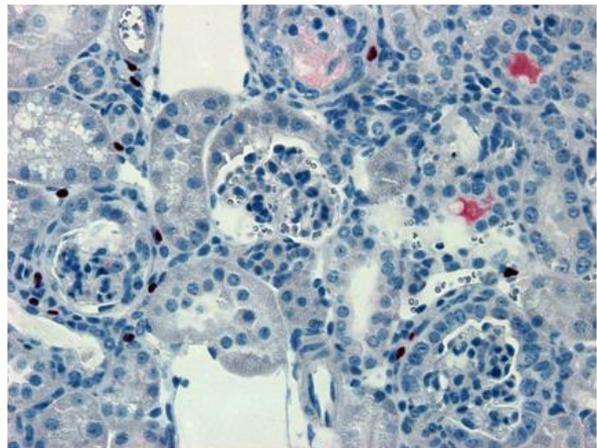


Abb. 25: Influx Foxp3-positiver Zellen an Tag 10

Foxp3 EP4 (n=12 p<0,05 [∅]), Foxp3 EP2 EP4 (n=11) und EP2ko (n=11)

Immunhistochemische Foxp3-Färbungen**Foxp3 Cre Kontrolle****Foxp3 Cre NTN 10 d****WT NTN 10 d****Foxp3 EP4 NTN 10 d****EP2ko NTN 10 d****Foxp3 EP2 EP4 NTN 10 d****Abb. 26: Exemplarische Foxp3-Färbungen aller Tiergruppen**

In Originalvergrößerung 400fach, die Foxp3 Cre Kontrolle ist vergleichbar mit der WT-Kontrolle (nicht gezeigt)

3.9. mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren

3.9.1. CCL2

Die Expression des Entzündungsmarkers CCL2 in der Nierenrinde an Tag 10 war in allen Gruppen deutlich verschieden. Zur Kontrollgruppe *Foxp3 Cre* signifikant erhöht waren die Werte der *Foxp3 EP4* Tiere (*Foxp3 EP4*: $19,33 \pm 2,03$ $n=18$ $p<0,01$ [⊃]). Deutlich geringer war die Expression dagegen bei *Foxp3 EP2 EP4* (*Foxp3 EP2 EP4*: $4,74 \pm 1,04$ $n=9$ $p<0,01$ [⊗]). Zu dieser Gruppe signifikant erhöht war *EP2ko* (*EP2ko*: $16,06 \pm 3,24$ $n=6$ $p<0,01$ [◇]), siehe **Abb. 27**

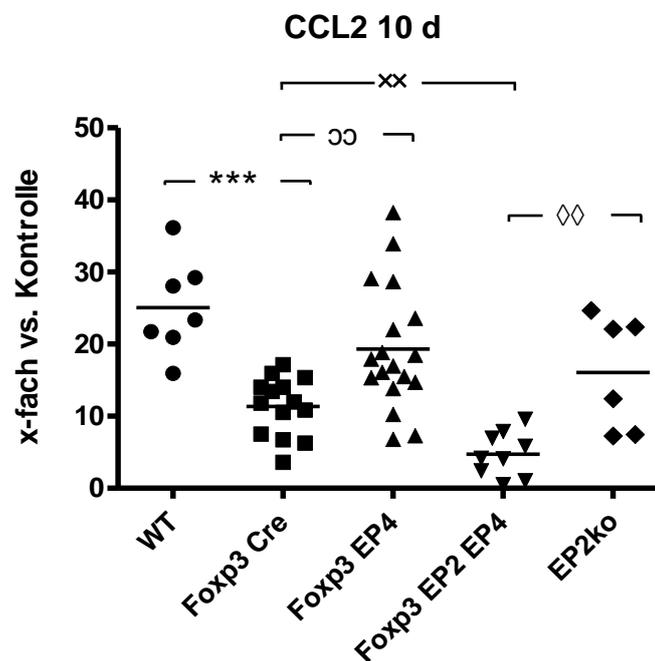


Abb. 27: Die mRNA-Expression des Entzündungsmarkers CCL2 am zehnten Tag variiert stark zwischen den Gruppen

Alle Ergebnisse werden angegeben in x-facher Veränderung nephritischer Tiere im Vergleich zu entsprechend gesunden Kontrolltieren, *Foxp3 EP4* ($n=18$ $p<0,01$ [⊃]), *Foxp3 EP2 EP4* ($n=9$ $p<0,01$ [⊗]) und *EP2ko* ($n=6$ $p<0,01$ [◇])

3.9.2. Cox2

In gleicher Tendenz wie CCL2 verhielten sich auch die Werte bei Cox2. Während die mRNA-Expression bei *Foxp3 EP4* Tieren erhöht war, lagen die Expressionswerte von *Foxp3 EP2 EP4* am niedrigsten. Die *EP2ko* Tiere lagen in ihrer Cox2 mRNA-Expression zwischen diesen beiden Gruppen (*Foxp3 EP4*: $3,95 \pm 0,34$ $n=18$ $p<0,05$; *Foxp3 EP2 EP4*: $2,31 \pm 0,32$ $n=13$; *EP2ko*: $3,19 \pm 0,94$ $n=8$ $p<0,05$), siehe **Abb. 28**.

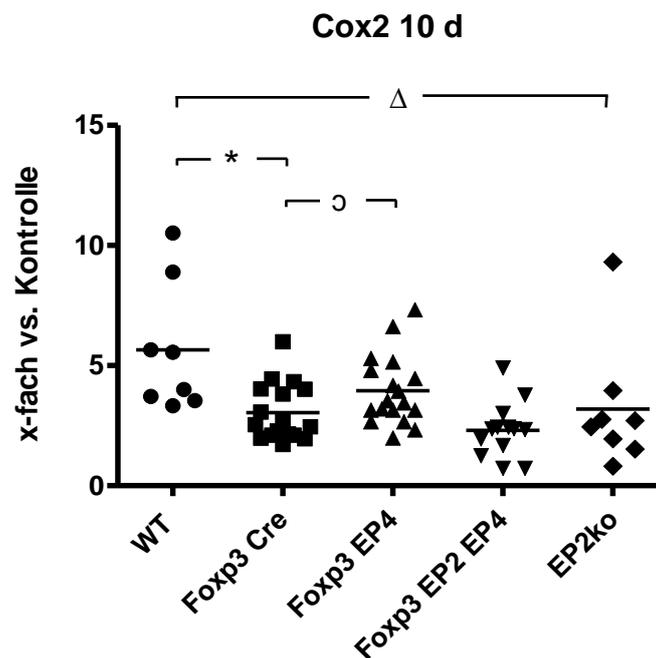


Abb. 28: Die mRNA-Expression des Entzündungsmarkers Cox2 an Tag 10

Alle Ergebnisse werden angegeben in x-facher Veränderung nephritischer Tiere im Vergleich zu entsprechend gesunden Kontrolltieren, *Foxp3 EP4* ($n=18$ $p<0,05$ [o]), *Foxp3 EP2 EP4* ($n=13$) und *EP2ko* ($n=8$ $p<0,05$ [Δ])

3.9.3. TNF α

Bei breiter Streuung lag die Expression des Markers TNF α in der *Foxp3 EP4*-Gruppe höher als bei der Kontrolle. Die Tiere der Gruppen *Foxp3 EP2 EP4* und *EP2ko* exprimierten die TNF α mRNA dagegen auf einem signifikant tieferen Niveau (*Foxp3 EP4*: $6,48 \pm 0,95$ n=15; *Foxp3 EP2 EP4*: $2,90 \pm 0,35$ n=9 p<0,01 [xx]; *EP2ko*: $2,88 \pm 0,85$ n=11 p<0,01 [$\Delta\Delta$]), siehe **Abb. 29**.

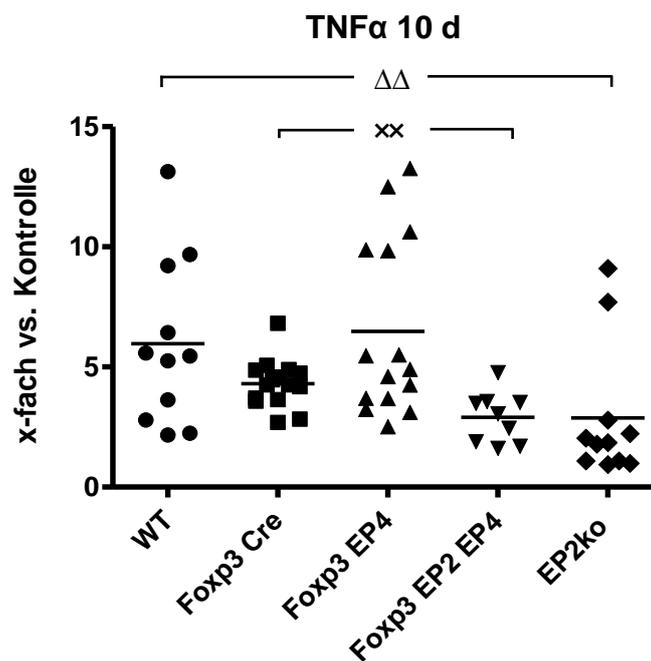


Abb. 29: Die mRNA-Expression des Entzündungsmarkers TNF α an Tag 10

Alle Ergebnisse werden angegeben in x-facher Veränderung nephritischer Tiere im Vergleich zu entsprechend gesunden Kontrolltieren, *Foxp3 EP4* (n=15), *Foxp3 EP2 EP4* (n=9 p<0,01[xx]) und *EP2ko* (n=11 p<0,01 [$\Delta\Delta$])

3.9.4. IL-6

Der Tendenz von TNF α folgend, verhielten sich auch die mRNA-Expressionswerte von IL-6. *Foxp3 EP4* zeigte auf Grund einer starken Streuung der IL-6 Expression pro Tier leicht erhöhte Werte gegenüber seiner *Foxp3 Cre* Kontrolle. Die IL-6 mRNA Expression der Gruppen *Foxp3 EP2 EP4* und *EP2ko* war gleichermaßen erniedrigt im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (*Foxp3 EP4*: $19,26 \pm 3,91$ n=18; *Foxp3 EP2 EP4*: $10,54 \pm 3,06$ n=9 p<0,05 [\times]; *EP2ko*: $7,54 \pm 2,84$ n=10 p<0,01 [$\Delta\Delta$]), siehe **Abb. 30**.

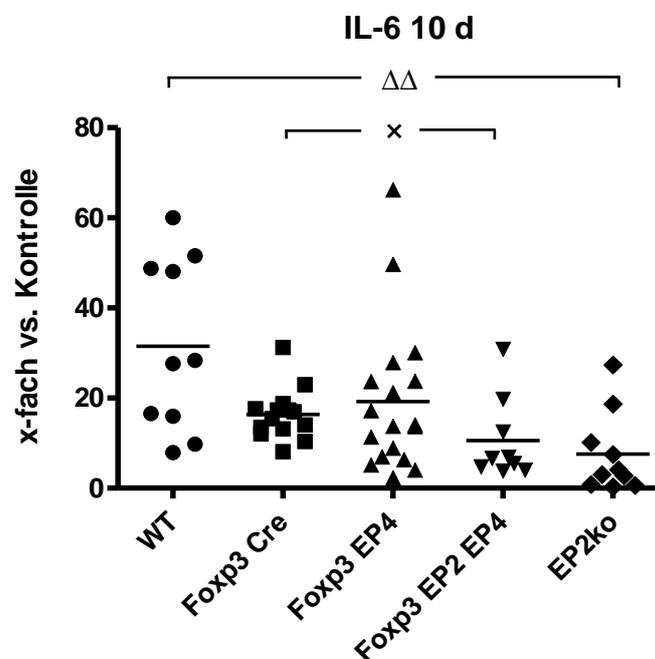


Abb. 30: Die mRNA-Expression des Entzündungsmarkers IL-6 an Tag 10

Alle Ergebnisse werden angegeben in x-facher Veränderung nephritischer Tiere im Vergleich zu entsprechend gesunden Kontrolltieren, *Foxp3 EP4* (n=18), *Foxp3 EP2 EP4* (n=9 p<0,05 [\times]) und *EP2ko* (n=10 p<0,01 [$\Delta\Delta$])

4. Diskussion

4.1. Nierenfunktion und glomerulärer Schaden

4.2. Zellinflux und RNA

4.3. Ausblick

Ziel der Arbeit war ein Vergleich der drei Mausstämme *Foxp3 EP4*, *Foxp3 EP2 EP4* und *EP2ko* in Verlauf und Stärke der experimentellen NTN. Dabei ging es besonders um den Einfluss einer einzelnen oder kombinierten EP4-Defizienz auf Tregs im Vergleich zu einer konstitutiven EP2-Defizienz.

Es mussten zwei verschiedene Kontrollgruppen herangezogen werden. Für *Foxp3 EP4* und *Foxp3 EP2 EP4* diente die *Foxp3 Cre* Gruppe als Kontrolle, für *EP2ko* dagegen wurde der C57BL/6 Wildtyp als Kontrolle herangezogen. Dieser Umstand ist bedingt durch die Tatsache, dass konstitutiv EP4-Defiziente Mäuse nicht lebensfähig sind (36). Daher war hier nur ein Ausschalten des EP4-Rezeptors auf Tregs durch das Cre/loxP-System möglich. *Foxp3 EP2 EP4* und *EP2ko* Mäuse jedoch sind auf allen Körperzellen EP2-Rezeptordefizient, bisher ist ein entsprechendes Cre/loxP-System zur Erzeugung von EP2-Defizienzen auf spezifischen Körperzellen noch nicht entwickelt. Die drei Gruppen *Foxp3 EP4*, *Foxp3 EP2 EP4* und *EP2ko* können also wegen ihrer Heterogenität nur näherungsweise miteinander verglichen werden.

Die bisherige Forschung zeigt, dass es besonders die beiden Rezeptortypen EP2 und EP4 sind, die einen Einfluss auf die Funktion und die Infiltration von Lymphozyten in das Nierengewebe haben (8, 19, 38, 22, 39). Unklar scheint jedoch, welcher der beiden Rezeptortypen welchen Einfluss hat, ob dies je nach Krankheitsstadium variiert oder auch verschiedene Teile der Immunreaktion (angeboren / adaptiv) betrifft. Daher ist ein Vergleich verschiedener Konstellationen an Rezeptordefizienz interessant.

4.1. Nierenfunktion und glomerulärer Schaden

Die eingeschränkte Nierenfunktion im Verlauf der GN ist gekoppelt an das Ausmaß des glomerulären Schadens. Daher wird hier beides zusammen betrachtet und beurteilt. Die Gruppen *Foxp3 EP4* und *Foxp3 EP2 EP4* verhielten sich in der Nierenfunktion ähnlich und waren schlechter als die Kontrollgruppe *Foxp3 Cre*. Die *EP2ko* Tiere wiesen eine eher bessere Nierenfunktion als ihre *WT*-Kontrolltiere auf.

Erfahrungsgemäß ist vor allem der Schadensparameter der Halbmondbildung valider als die Albumin/Kreatinin Ratio und BUN-Werte. Halbmonde gelten als pathognomonisch sowohl für die humane RPGN als auch für das entsprechend benannte murine NTN-Modell der „experimental crescentic glomerulonephritis“, wie Kitching und Holdsworth es beschrieben haben und hier zur Anwendung kam. Der prozentuale Anteil an Halbmonden bezogen auf die Gesamtzahl der evaluierten Glomeruli lässt einen Rückschluss auf das Ausmaß der induzierten Erkrankung zu.

Mit den Befunden der Nierenfunktion übereinstimmend ergab auch der Anteil der Halbmonde den geringsten Schaden bei *EP2ko* Tieren. Ebenfalls signifikant besser als seine Kontrollgruppe war hier allerdings auch die *Foxp3 EP2 EP4* Gruppe, auch *Foxp3 EP4* war tendenziell besser als die *Foxp3 Cre* Kontrolle. Der PAS-Score zeigte ebenfalls eine signifikante Verbesserung aller drei Gruppen im Vergleich zu ihren Kontrollen, hier unterschieden sie sich allerdings untereinander kaum.

Zusammengefasst kann man sagen, dass vor allem eine alleinige EP2-Defizienz eine deutliche Verbesserung im Krankheitsbild bringt. Eine alleinige EP4-Defizienz dagegen zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Dies ist allerdings auch bedingt durch eine sehr starke Streuung des Halbmondanteils in dieser Gruppe. Eine Tendenz zu einem verbesserten Schaden ist dennoch deutlich sichtbar. Jedoch ist zu bemerken, dass hier ein Vergleich nur eingeschränkt möglich ist, da wie erwähnt zwei verschiedene Kontrollgruppen herangezogen wurden. Insgesamt zeigten sich wenige Unterschiede zwischen diesen Kontrollgruppen. Allerdings war die Ausprägung der Halbmonde in der *Foxp3 Cre* Kontrollgruppe sowohl insgesamt geringer als auch weiter gestreut als in der *WT* Kontrollgruppe. Ein tendenzieller Unterschied im pathophysiologischen Ablauf der Erkrankung ist also nicht ganz ausgeschlossen.

Eine kombinierte Defizienz ist zwischen diesen Gruppen angesiedelt, auch hier ist im Vergleich zu *EP2ko* eine deutlich stärkere Streuung der Ergebnisse zu berücksichtigen. Es ist keine so starke Verbesserung zu sehen wie bei einer reinen EP2-Defizienz, es zeigt sich aber ein milderer Schaden im Vergleich zur Kontrolle.

Eine EP4-Defizienz auf Tregs könnte also dem Effekt einer EP2-Defizienz auf allen Zellen entgegenwirken und ihn abschwächen, was an eine antiinflammatorischen Wirkung von PGE₂ via EP4 Rezeptoren denken ließe. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass dieser Effekt lediglich aufgrund der verschiedenartigen Expressionsmuster (EP4 *Foxp3* spezifische Defizienz vs. EP2 konstitutive Defizienz) zustande gekommen ist, welches für einen möglicherweise unterschiedlichen glomerulären Schaden sorgt.

4.2. Zellinflux und RNA

In der Zählung des Zellinflux von T-Zellen (CD3-Färbung), Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (F4/80-Färbung) und Tregs (*Foxp3*-Färbung) zeigten sich überwiegend Tendenzen. In der F4/80-Färbung ergaben sich durch die Streuung keine Signifikanzen. In der CD3- und *Foxp3*-Färbung zeigte sich lediglich ein signifikant geringerer Influx bei *Foxp3 EP4* Tieren im Vergleich zur *Foxp3 Cre* Kontrolle. Eine entsprechende Signifikanz der Werte der *Foxp3 EP2 EP4* Gruppe ist durch eine etwas breitere Streuung nicht zustande gekommen.

Doch die sich abzeichnenden Tendenzen waren in allen drei Färbungen einheitlich und können daher trotzdem für eine Interpretation herangezogen werden. Die beiden Gruppen *Foxp3 EP4* und *Foxp3 EP2 EP4* wiesen in allen drei Färbungen eine sehr ähnliche Anzahl an infiltrierenden Zellen auf, jeweils lag das Niveau unter dem ihrer Kontrollgruppe *Foxp3 Cre*. Es zeigte sich also ein geringerer Influx von Immunzellen. Die *EP2ko*-Tiere hingegen zeigten kaum eine Änderung im Infiltrationsverhalten von Immunzellen im Vergleich zu den Tieren der *WT* Kontrollgruppe.

Speziell zur Infiltration von Tregs ist zu bemerken, dass sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen *WT* und *Foxp3 Cre* Tieren zeigte. Die Infiltration an Tregs in das Nierengewebe der *Foxp3 Cre* Tiere war mehr als doppelt so hoch wie in den *WT* Tieren. Worauf dieser Unterschied zurückzuführen ist, ist unklar. Dieser Umstand erschwert die Interpretation des Verhältnisses der Treg-Infiltration zwischen den Gruppen mit EP4-Defizienz und kombinierter Defizienz mit der *EP2ko* Gruppe, da sie mit diesen sich stark unterscheidenden Kontrollgruppen verglichen werden. Die Aussagekraft der Ergebnisse der Foxp3-Zählung ist daher gemindert.

Dennoch ist davon auszugehen, dass die Präsenz der Cre-Rekombinase an sich keinen wesentlichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der GN hat, da sowohl in Nierenfunktion und Schaden, als auch beim Infiltrationsverhalten von CD3 und F4/80 kein signifikanter Unterschied festzustellen war.

Die Infiltration von schadenvermittelnden Immunzellen bei EP2-defizienten Tieren ist kaum verändert, der Influx von Tregs ist nur tendenziell erhöht. Diese Tiere weisen aber den geringsten Schaden und die beste Nierenfunktion auf, was vermuten lässt, dass der protektive Einfluss von Tregs nicht nur lokal seine Wirkung entfaltet, sondern vor allem auch peripher, wie z.B. in den Lymphknoten und der Milz. Die infiltrierenden, schadenvermittelnden Immunzellen könnten in ihrer Funktion durch den Verlust der EP-Rezeptoren im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen geschwächt sein.

Eine EP4-Defizienz auf Tregs dagegen scheint zwar den Influx sowohl der schadenvermittelnden T-Zellen als auch der Tregs zu mindern, dennoch ist der Schaden und die Nierenfunktion schlechter als in der *EP2ko* Gruppe. Allerdings ist der Schaden besser als in der *Foxp3 Cre* Kontrollgruppe. Leider sind Schlüsse bezüglich einer möglicherweise EP4-Defizienz bedingten geminderten protektiven Potenz der Tregs nicht möglich. Zwar scheinen relativ weniger infiltrierende Immunzellen verhältnismäßig mehr Schaden zu vermitteln, da eventuell ihre schädigende Potenz durch die Tregs nicht so sehr vermindert wird. Doch die *Foxp3 Cre* bedingte signifikant erhöhte Treg Infiltration im Vergleich zum *WT* lässt keine valide Interpretation zu.

In Zusammenschau der Ergebnisse scheint PGE₂ vor allem via EP2-Rezeptoren den Verlauf der GN zu verschlimmern, da bei einer Defizienz eine Schadens-Verbesserung eintritt. Tendenziell lässt sich dieser Effekt auch via EP4 vermuten. Spekulativ könnte PGE₂ zusätzlich via EP4-Rezeptoren die protektive Potenz von Tregs steigern, da bei einer Defizienz weniger protektiv wirkende Tregs infiltrieren. Letzteres ist allerdings durch die präsentierten Daten nicht zweifelsfrei zu belegen, da ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Dies ist zum Einen bedingt durch die unterschiedlichen Ausprägungsmuster der EP-Defizienzen und zum Anderen durch den signifikanten Infiltrations-Unterschied Foxp3 positiver Zellen zwischen *WT*- und *Foxp3 Cre* Tieren.

Der Influx von Immunzellen wird bedeutend beeinflusst durch die Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Es gibt eine große Anzahl verschiedener Zytokine. In dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression der Zytokine CCL2, TNF α und IL-6 und des im entzündeten Gewebe exprimierten Enzyms Cox2 bestimmt. Diese Marker sind von den verschiedensten Arbeitsgruppen gründlich untersucht worden und gelten als verlässliche und häufig verwendete Indikatoren für das Entzündungsgeschehen innerhalb der Niere (40, 41).

Alle vier proinflammatorischen Marker zusammengenommen zeigten, dass eine EP4-Defizienz auf Tregs entweder zu keiner bedeutenden Veränderung (TNF α , IL-6) oder zu einer Verstärkung (CCL2, Cox2) der mRNA-Expression im Vergleich zur *Foxp3 Cre* Kontrolle führte. Eine reine EP2-Defizienz und eine kombinierte EP2/EP4-Defizienz führte zu deutlich verminderter Expression proinflammatorischer Marker im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrolle. Die Validität dieser Daten ist eingeschränkt.

Denn zum Einen besteht ein signifikanter Unterschied in der CCL2- und Cox2-Expression zwischen *WT*- und *Foxp3 Cre* Tieren, dessen Ursache unklar ist. Zum Anderen ist davon auszugehen, dass nicht nur die agierenden Immunzellen die detektierten Marker produzieren, sondern auch die ortsständigen Zellen des entzündeten Gewebes. Diese ortsständigen Zellen sind ebenfalls EP2-defizient, der Rückschluss auf den Effekt der EP2-Defizienz auf Immunzellen ist hier also nur eingeschränkt möglich. Zudem ist es denkbar, dass die mRNA Expression kein genauer Indikator für den aktuellen Aktivierungs- und Infiltrationszustand der

Immunzellen ist. Möglicherweise ist z.B. die Markerexpression hochreguliert, doch auf Ebene der Immunzellen zeigt sich noch keine Veränderung. Oder deren Infiltration ist vermindert, aber die Expression der untersuchten proinflammatorischen Marker hoch, was auf eine negative Gegenregulation schließen ließe.

Dennoch passen die Befunde in das Gesamtbild. Eine EP4-Defizienz auf Tregs, die scheinbar zu einer verminderten protektiven Potenz führt, erlaubt eine erhöhte Freisetzung von proinflammatorischen Markern. Allerdings führt, wie oben erwähnt, das zur Herstellung der EP4-Defizienz genutzte Cre/loxP-System zu einem erhöhten renalen Treg-Influx. Dieser Einflussfaktor lässt eine Interpretation im Gesamtkontext kaum zu.

Eine EP2-Defizienz jedoch, die alle Zellen betrifft und den Verlauf der experimentellen GN deutlich mildert, vermindert auch die Freisetzung aller untersuchten proinflammatorischen Marker. Es ist nicht zu differenzieren, welche Zellen hauptsächlich für die Freisetzung der Marker verantwortlich sind, bzw. welche durch die EP2-Defizienz am meisten beeinflusst sind. Hier lässt sich lediglich der Schluss ziehen, dass das Entzündungsgeschehen im Rahmen der experimentellen GN in einem konstitutiv EP2-defizienten Mausorganismus signifikant mildernd beeinflusst. Dies ist nicht nur belegt durch die bessere Nierenfunktion an sich, sondern auch auf den zugrundeliegenden Ebenen nachvollziehbar begründet. Eine geringere Expression von Entzündungsmediatoren reduziert die Effizienz schädigender Immunzellen, denn bei Kontrollgruppen-ähnlicher Infiltration zeigt sich ein deutlich geringerer glomerulärer Schaden.

Die Tatsache, dass alle untersuchten Entzündungsmarker in ihrer Expression über den EP2 Rezeptor von PGE₂ abhängig sind, spricht für die zentrale Rolle dieses Rezeptors im Prozess der Entzündung. Wie spezifisch die Rolle des EP2-Rezeptors jedoch auf die Expression auf infiltrierenden Immunzellen bezogen ist, lässt sich in diesem Untersuchungsmodell nicht genau beurteilen. Der Einfluss der ortsständigen Zellen auf die Expression von Entzündungsmarkern ist nicht zu differenzieren.

4.3. Ausblick

Im Großen und Ganzen bestätigt sich die Annahme, die sich aus den teils widersprüchlichen Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen zum immunsuppressiven bzw. immunaktivierenden Effekt von PGE₂ ergab: PGE₂ hat ein vielfältiges Wirkungsmuster. Die Art der Wirkung hängt ab vom vermittelnden Rezeptor und der Art der Zielzelle. Entsprechend sind die Mechanismen auf Rezeptor-Ebene nach wie vor umstritten.

Doch Wirkstoffe, die unspezifisch in den gesamten Prostaglandin Stoffwechsel eingreifen, sind nur suboptimal in der Therapie einsetzbar. Prostaglandine eignen sich aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Aktivität, das ein breites Nebenwirkungsspektrum verursacht, und der chemischen Instabilität schlecht als Medikament. Auch die bei Entzündungen viel verwendeten Cox-Inhibitoren und Cortison (Hemmung der PLA₂ und der Synthese der Interleukine (4)) haben vor allem langfristig problematische Nebenwirkungen, die auf das ubiquitäre Vorkommen dieser Enzyme zurückzuführen sind. Daher ist eine zielgenaue Stimulierung oder Hemmung der immunoregulatorischen EP-Rezeptorisoformen ein Ziel der Erforschung von Autoimmunerkrankungen wie der RPGN. Um dies zu erreichen, ist ein sehr genaues Verständnis der einzelnen Funktionen der verschiedenen EP-Rezeptoren auf individuellen Zelltypen notwendig. Nur so ist eine feine, spezifische Regulierung der Immunantwort möglich.

Der hier angestellte Vergleich lässt erste Schlüsse auf den Einfluss einzelner Rezeptoren auf das komplexe Gefüge der Immunantwort zu. Vor allem via EP2-Rezeptoren wird eher ein proinflammatorischer Effekt auf Immunzellen vermittelt, tendenziell auch via EP4-Rezeptoren. Möglicherweise wird via EP4 jedoch auch der protektive Effekt von Tregs verstärkt. Von diesen Ergebnissen ausgehend kann über die weiterführende Erforschung von PGE₂ und seinen Rezeptoren im Rahmen der GN nachgedacht werden.

Ein Ansatzpunkt wäre die Stimulation der Tregs über einen EP4-Rezeptoragonisten. *Nagamatsu et al* fanden einen protektiven Effekt von EP4-Agonisten in der Anti-GBM Nephritis (39). Allerdings wurden hier nicht spezifisch die Tregs stimuliert, was ohnehin technisch schwierig sein dürfte. Der beobachtete antiinflammatorische Effekt

wurde durch eine Verstärkung der cAMP-Produktion durch den EP4-Agonisten erklärt. Die cAMP-Konzentration sei durch eine Herunterregulierung der Expression von EP-Rezeptoren im Rahmen der Entzündung vermindert, so *Nagamatsu et al.* Eine Verstärkung der cAMP-Produktion habe über vielfältige Wirkmechanismen einen positiven Einfluss auf den Verlauf der GN (39). Dennoch scheint eine EP4-Stimulation kein geeigneter Ansatz. Denn nicht nur Tregs verfügen über diese Rezeptoren, sondern auch die anderen T-Zellsubtypen. Sowohl *Yao et al* als auch *Sakata et al* fanden eine Verstärkung der Th1-Differenzierung und eine Th17-Zellexpansion über EP4-Signalwege (8, 9). Daher wäre eine Stimulation dieser Rezeptoren möglicherweise trotz des verstärkenden Effekts auf Tregs kontraproduktiv.

Vielversprechender ist den Ergebnissen dieser Arbeit nach der Ansatz einer EP2-Hemmung. Fast alle hier untersuchten Parameter deuten auf eine klare Verbesserung im Krankheitsverlauf bei einzelner oder kombinierter EP2-Defizienz auf allen Körperzellen hin. Daher kann man hoffen, hier weniger antagonisierende Wirkungen zu erzielen, als bei einer EP4-Stimulation. Allerdings gibt es auch hierzu widersprüchliche Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Während *Nataraj et al* eine Hemmung der zellulären Immunantwort via EP2 fanden (19), stellten *Boniface et al* eine Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Zellen und Th17-Zellen via EP2 und EP4 fest (22).

Es sollte daher Gegenstand zukünftiger Forschung sein, validere Systeme zu entwickeln, die das Ausschalten jedes Rezeptortyps auf spezifischen Zellen erlauben. Auch wäre ein Vergleich von Mäusen denkbar, die keine eigene adaptive Immunantwort besitzen. Hier könnten sogenannte RAG-1 Mäuse in Betracht kommen, die durch eine Mutation im RAG-1 Gen keine funktionierenden B- und T-Zellen produzieren können (42). Diesen Mäusen könnte im Rahmen einer experimentellen GN entweder EP2-defiziente, EP4-defiziente, kombiniert defiziente oder normale Immunzellen transferiert werden. So könnten viele Störfaktoren beseitigt werden, um validere Informationen zu erhalten. Es wäre eine deutlich größere Vergleichbarkeit gegeben.

Des Weiteren stellt sich die Frage der Übertragbarkeit auf den Menschen. Zwar ist die murine nephrotoxische Serumnephritis der aktuellen Einschätzung nach ein gutes Modell der humanen RPGN. Doch diese Unterform macht zum Einen nur einen kleinen Anteil der verschiedenen Glomerulonephritiden beim Menschen aus. Die Übertragbarkeit auf andere Formen der Nephritiden ist unklar. Zum Anderen fanden einige Forscher einen Unterschied im Expressionsmuster von PG im Glomerulum. Ratten und Mäuse produzieren hier im Wesentlichen das untersuchte PGE₂, der Mensch scheint jedoch eher PGI₂ zu bilden (5, 43).

Selbst nach über 20 Jahren Forschung auf dem Gebiet der Prostaglandine und der Immunologie bleiben also noch viele Fragen offen, viele Mechanismen und Interaktionen der vielen bekannten und unbekanntenen Faktoren des Immunsystems bleiben ungeklärt. Doch in Anbetracht der teils dramatischen Verläufe von Nephritiden und anderen Autoimmunerkrankungen ist die Erforschung der pathophysiologischen Grundlagen und darauf aufbauend die Entwicklung neuer Therapien unerlässlich. Diese Arbeit stellt den Anfang einer der vielen Fäden dar, die im Geflecht der autoimmunen RPGN und ähnlicher Erkrankungen zu einem tieferen Verständnis der Vorgänge führen können. Diesen und andere Fäden weiter zu verfolgen, zusammenzuführen und das teils unüberschaubare Netz von Aktion und Reaktion des Immunsystems zu entwirren, wird sicher noch viele Jahre Gegenstand intensiver Forschung sein.

Zusammenfassung in deutscher Sprache

Glomerulonephritiden (GN) sind die zweithäufigste Ursache für terminale Niereninsuffizienz. Das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen und damit eine spezifische Therapie der autoimmunvermittelten Formen von GN, sind bisher noch unzureichend erforscht. Nachgewiesen wurde bisher ein hoher Stellenwert von Prostaglandinen (PG), besonders PGE_2 und seinen Rezeptoren, im Entzündungsgeschehen der Rapid Progressiven GN (RPGN) und anderen Formen der GN.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das mit der RPGN korrelierende Modell der murinen Nephrotoxischen Serum Nephritis (NTN) angewendet. Die Versuchsmäuse wiesen eine Defizienz der relevanten PGE_2 Rezeptoren EP2 oder EP4 auf, oder aber eine kombinierte Defizienz beider Rezeptoren. Hierbei war eine EP2-Defizienz immer auf allen körpereigenen Zellen ausgeprägt, während sich die EP4-Defizienz ausschließlich auf Foxp3 positive T-regulierende Zellen (Tregs) beschränkte. Ziel der Arbeit war ein Vergleich der Krankheitsverläufe bei Tieren mit konstitutiver EP2-Defizienz, mit EP4-Defizienz auf Tregs sowie mit kombinierter EP2 EP4-Defizienz. Hierfür wurden die Nierenfunktionsparameter Proteinurie und der Stickstoffanteil des Blutharnstoffes, der glomeruläre Schaden anhand eines arbiträren PAS-Scores und der Halbmondbildung, die Infiltration von CD3-, F4/80- und Foxp3-positiven Zellen und die mRNA-Expression der proinflammatorischen Marker CCL2, Cox2, TNF α und IL-6 erhoben.

Es zeigte sich eine deutliche Verbesserung des Krankheitsverlaufs bei konstitutiv EP2-defizienten Mäusen. Tendenziell zeigte sich dieser Effekt auch bei der EP4-Defizienz. Diesen Befunden entsprechend scheint PGE_2 einen proinflammatorischen Effekt via EP2- und EP4-Rezeptoren auszuüben. Zusätzlich könnte eine EP4-Rezeptorstimulation protektiv auf Tregs wirken.

Neue Therapieansätze lassen sich durch die hier dargestellten experimentellen Ansätze nur schwer herleiten. Trotz Allem vermitteln diese Ergebnisse wichtige Informationen für weiterführende, detailliertere Arbeiten. So sind beispielsweise, basierend auf den hier dargestellten Ergebnissen, Transferexperimente unterschiedlicher EP-Rezeptor defizienter Tregs in Rag1 Mäuse in Arbeit. Aus diesen kann voraussichtlich die Wirkung einzelner EP-Rezeptoren auf das Verhalten vor allem von Tregs besser abgeleitet werden.

Abstract in English

Glomerulonephritis (GN) is the second most common cause of end stage renal disease. The underlying mechanisms of autoimmune-mediated forms of GN are not yet completely understood, specific therapy is not available. Former reports have indicated an important role for prostaglandins (PG), particularly PGE₂ and its receptors in inflammatory processes of rapid progressive GN (RPGN) as well as other forms of GN.

The experiments underlying this work were based on the model of murine nephrotoxic serum nephritis (NTN), which correlates with RPGN. The mice showed a deficiency of the relevant PGE₂ receptors EP2 or EP4, or a combined deficiency of both receptors. The EP2 deficiency was always evident in all cells, whereas the EP4 deficiency was developed only in the Foxp3-positive regulatory T cells (Tregs).

The aim of this study was to compare the progression and severity of GN in animals with either EP2 deficiency or EP4 deficiency or deficiency of both, with each other. To this end, the following parameters were examined and evaluated: a) the renal function parameters albumin/creatinine ratio and the blood urea nitrogen, b) glomerular damage based on an arbitrary PAS score and the crescent formation, c) infiltration of CD3-, F4/80- and Foxp3-positive cells and d) the mRNA expression of the proinflammatory markers CCL2, Cox2, TNF and IL-6.

The results showed a significant improvement in the disease process in constitutive EP2-deficient mice. Partly, this effect could also be observed in EP4-deficient mice. These findings suggest that PGE₂ promotes a proinflammatory effect via EP2 and EP4 receptors. Additionally, it could exert a protective effect on Tregs via EP4 receptors. New therapeutic approaches are difficult to derive from these findings. Nevertheless, these results provide important information for further, more detailed work. Based on the results presented here, transfer experiments of different EP receptor deficient Tregs in Rag1 mice are in development. From these experiments we can expect a better understanding of the effect of individual EP receptors on the behavior of Tregs.

Literaturverzeichnis

- 1 **Klinke R, Bauer C**: Physiologie. Thieme, Stuttgart, 2005.
- 2 **Herold G**: Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung Mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis, 2009.
- 3 **Holdsworth SR**: Th1 and Th2 T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis. *Kidney Int.* 55 (1999) 1198–1216.
- 4 **Rassow J**: Biochemie. 660 Abbildungen, 50 Tabellen. Thieme, Stuttgart, 2006.
- 5 **Schlondorff D, Ardaillou R**: Prostaglandins and other arachidonic acid metabolites in the kidney. *Kidney Int.* 29 (1986) 108–119.
- 6 **Tanabe T, Tohnai N.**: Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69 (2002) 95–114.
- 7 **Coleman RA, Smith WL, Narumiya S**: VIII. International Union of Pharmacology Classification of Prostanoid Receptors: Properties, Distribution, and Structure of the Receptors and their Subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46 (1994) 205–229.
- 8 **Yao C, Sakata D.**: Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat. Med.* 15 (2009) 633–639.
- 9 **Sakata D, Yao C, Narumiya S**: Prostaglandin E2, an Immunoactivator. *J. Pharmacol. Sci.* 112 (2010) 1–5.
- 10 **Smith WL, Bell TG**: Immunohistochemical localization of the prostaglandin-forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am J Physiol* 235 (1978) F451—F457.
- 11 **Sraer J, Foidart J, Chansel D, Mahieu P, Kouznetzova B, Ardaillou R**: Prostaglandin synthesis by mesangial and epithelial glomerular cultured cells. *FEBS Lett* 15 (1979) 420–424.
- 12 **Muirhead EE, Germain G, Leach BE, Pitcock JA, Stephenson P, Brooks B, Brosius WL, Daniels EG, Hinman JW**: Production of renomedullary prostaglandins by renomedullary interstitial cells grown in tissue culture. *Circ Res* 30-31 (1972) 161–172.
- 13 **Bohman SO**: Demonstration of prostaglandin synthesis in collecting duct cells and other cell types of the rabbit renal medulla. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 14 (1977) 729–744.
- 14 **Dworkin LD, Ichikawa I, Brenner BM**: Hormonal modulation of glomerular function. *Am J Physiol* 244 (1983) 95–104.
- 15 **Breyer MD, Davis L, Jacobson HR, Breyer RM**: Differential localization of prostaglandin E receptor subtypes in human kidney. *Am J Physiol* 270 (1996) F912-8.
- 16 **Rios A, Vargas-Robles H, Gamez-Mendez AM, Escalante B**: Cyclooxygenase-2 and kidney failure. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2011).
- 17 **Harris S, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps R**: Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23 (2002) 144–150.
- 18 **Weinreb M, Machwate M, Shir N, Abramovitz M., Rodan GA, Harada S.**: Expression of the prostaglandin E(2) (PGE(2)) receptor subtype EP(4) and its regulation by PGE(2) in osteoblastic cell lines and adult rat bone tissue. *Bone* 28 (2001) 275–281.
- 19 **Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL, Nguyen MT, Mannon R, Koller BH, Coffman TM**: Receptors for prostaglandin E2 that regulate cellular immune responses in the mouse. *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 1229–1235.

- 20 **Ooi JD, Snelgrove SL, Engel DR, Hochheiser K, Ludwig-Portugall I, Nozaki Y, O'Sullivan KM, Hickey MJ, Holdsworth SR, Kurts C, Kitching AR:** Endogenous foxp3+ T-regulatory cells suppress anti-glomerular basement membrane nephritis. *Kidney Int.* 79 (2011) 977–986.
- 21 **Burgler S, Mantel PY, Bassin C, Ouaked N, Akdis CA, Schmidt-Weber CB:** RORC2 is involved in T cell polarization through interaction with the Foxp3 promoter. *J. Immunol.* 184 (2010) 6161–6169.
- 22 **Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ, de Waal Malefyt R:** Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J. Exp. Med.* 206(3) (2009) 535–548.
- 23 **Summers SA, Steinmetz OM, Li M, Kausman JY, Semple T, Edgton KL, Borza D, Braley H, Holdsworth SR, Kitching AR:** Th1 and Th17 Cells Induce Proliferative Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology* 20 (2009) 2518–2524.
- 24 **Tipping PG, Huang XR, Berndt MC, Holdsworth SR:** A role for P selectin in complement-independent neutrophil-mediated glomerular injury. *Kidney Int.* 46 (1994) 79–88.
- 25 **Kelley VE, Winkelstein A, Izui S:** Effect of prostaglandin E on immune complex nephritis in NZB/W mice. *Lab Invest* 41 (1979) 531–537.
- 26 **Cattell V, Smith J, Cook HT:** Prostaglandin E1 suppresses macrophage infiltration and ameliorates injury in an experimental model of macrophage-dependent glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 79 (1990) 260–265.
- 27 **Schneider A, Thaiss F, Rau HP, Wolf G, Zahner G, Jocks T, Helmchen U, Stahl RA:** Prostaglandin E1 inhibits collagen expression in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis: possible role of TGF beta. *Kidney Int.* 50 (1996) 190–199.
- 28 **Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang SC, Heuzé-Vourc'h N, Zeng G, Reckamp K, Dohadwala M, Sharma S, Dubinett SM:** Prostaglandin E2 induces Foxp3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J. Immunol.* 175(3) (2005) 1483–1490.
- 29 **Corthay A:** How do regulatory T cells work? *Scand. J. Immunol.* 70 (2009) 326–336.
- 30 **Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko S, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F:** Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27 (2001) 68–73.
- 31 **Hori S, Nomura T, Sakaguchi S:** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299 (2003) 1057–1061.
- 32 **Paust HJ, Ostmann A.:** Regulatory T cells control the Th1 immune response in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 80(2) (2011) 154–164.
- 33 **Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Peters A, Riedel JH, Erhardt A, Wegscheid C, Velden J, Fehr S, Mittrücker HW, Tiegs G, Stahl RA, Panzer U:** CCR6 recruits regulatory T cells and Th17 cells to the kidney in glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21 (2010) 974–985.
- 34 **Schneider A, Guan Y, Zhang Y, Magnuson MA, Pettepher C, Loftin CD, Langenbach R, Breyer RM, Breyer MD:** Generation of a conditional allele of the mouse prostaglandin EP4 receptor. *Genesis* 40 (2004) 7–14.

-
- 35 **Breyer RM, Kennedy CR, Zhang Y, Brandon S, Guan Y, Coffee K, Funk CD, Magnuson MA, Oates JA, Breyer MD:** Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nat. Med* 5 (1999) 217–220.
 - 36 **Nguyen M, Camenisch T, Snouwaert JN, Hicks E, Coffman TM, Anderson PA, Malouf NN, Koller BH:** The prostaglandin receptor EP4 triggers remodeling of the cardiovascular system at birth. *Nature* 390 (1997) 78–81.
 - 37 **Singh S, Jeansson M, Quaggin S:** New insights into the pathogenesis of cellular crescents. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20 (2011) 258–262.
 - 38 **Napolitani G, Acosta-Rodriguez E. V.:** Prostaglandin E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN- γ production by memory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 39 (2009) 1301–1312.
 - 39 **Nagamatsu T, Imai H, Yokoi M, Nishiyama T, Hirasawa Y, Nagao T, Suzuki Y:** Protective effect of prostaglandin EP4-receptor agonist on anti-glomerular basement membrane antibody-associated nephritis. *J Pharmacol Sci* 102 (2006) 182–188.
 - 40 **Rovin BH, Rumancik M, Tan L, Dickerson J:** Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab Invest* 71 (1994) 536–542.
 - 41 **Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D:** Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 11 (2000) 152–176.
 - 42 **Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE:** RAG-1-Deficient Mice Have No Mature B and T Lymphocytes. *Cell* 68 (1992) 869–877.
 - 43 **Lands WEM:** The biosynthesis and metabolism of Prostaglandins. *Ann. Rev. Physiol.* 41 (1979) 633–652.
 - 44 **Legler DF, Bruckner M, Uetz von Allmen E, Krause P:** Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Int J Biochem Cell Biol* 42 (2009) 198-201.
 - 45 **Zhu J, Paul WE:** CD4 T cells: fates, functions and faults. *Blood* 112(5) (2008) 1557–1569

Danksagung

Mein herzlichster Dank geht an PD Dr. rer. nat. Gunther Zahner, nicht nur für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, sondern insbesondere auch für die herausragende Betreuung. Die Umsetzung dieser Arbeit wäre ohne sein immer offenes Ohr, seine Erläuterungen, seine konstruktive Kritik und seine Geduld im Lehren der Labortechniken nicht möglich gewesen. Dank ihm habe ich einen guten Einblick in die Forschung und die Laborarbeit gewonnen und viel gelernt.

Doch auch die technische und emotionale Unterstützung des exzellenten Laborteams der III Medizinischen Klinik, insbesondere Melanie Schaper, Olga Ilin und Saskia Schröder, sorgte immer für ein ausgezeichnetes Arbeitsklima. Ich möchte ihnen sowohl für das Färben aller histologischen Schnitte danken, als auch für all die Geduld, die Unterstützung und den Spaß bei der gemeinsamen Arbeit.

Auch bei allen Dozenten des Wahlfaches „Experimentelle Medizin“ möchte ich mich herzlich bedanken. Sie haben mir den Einstieg in die Thematik und das Lesen, Verstehen und Analysieren von wissenschaftlichen Publikationen sehr erleichtert.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützen, in allem was ich tue. Ohne sie wäre ich nicht, wo ich heute bin, hätte ich nicht geschafft, was ich bis jetzt geschafft habe. Das Wissen, mich immer auf sie verlassen zu können, gibt mir die Kraft auch in schwierigen Momenten nicht aufzugeben, sondern immer weiter zu machen und neue Wege zu suchen. In gleicher Weise kann ich mich auf meinen Partner Ronald Coronado verlassen, auch ihm möchte ich daher einmal mehr danken.

Lebenslauf

Persönliches

Geburtsdatum: 17.07.1987
Geburtsort: Buchholz in der Nordheide
Kontakt: Julia.Berliner@stud.uke.uni-hamburg.de

Ausbildung

Abitur: Heisenberg Gymnasium Hamburg-Harburg Juli 2006

Studium der Humanmedizin:

Uniklinikum Hamburg-Eppendorf	seit Oktober 2006
1. Ärztliche Prüfung: Universitätsklinikum Eppendorf	August 2008
Auslandsstudium der Medizin an der „Universidad Católica de Santa María“ in Arequipa, Peru	Juli 2009 – August 2010
Voraussichtlicher Abschluss	Sommer 2013

Berufliche Erfahrung & Praktika

2. Summer School Rheumatologie PD Dr. C. Iking-Konert, Dr. P.M. Aries und weitere	August 2012
Hospital Nacional „Adolfo Guevara Velasco“ Cusco, Peru Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe Famulatur in der Nephrologie	August-September 2011
Seminar Krankenhausmanagement Dr. Kirstein, Kaufmännischer Direktor UKE	Juli 2011
Wahlfach „Experimentelle Nephrologie“ III. Med. Klinik, UKE, Prof. R.A.K. Stahl	Januar-März 2011
Asklepiosklinik Harburg Famulatur in der Zentralen Notaufnahme, Dr. J. Linzer	September 2010
Hospital Goyeneche, Arequipa, Peru Famulatur in der inneren Medizin (Station und Notaufnahme)	Februar 2010
Blockkurs „Pädiatrische Echokardiografie“ Theorie sowie Praxis, angeleitet durch PD Dr. H. Stern	Januar 2009
Facharztklinik Hamburg Krankenpflegedienst	Juli-Oktober 2007
Praktikum „Molekulare Anatomie“ Im Rahmen der Zusatzqualifikation „Grundlagen der Molekularen Medizin“	Februar 2007

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: J. Berliner