

Der Einfluss von bakteriell induzierten geweberesidenten T-Zellen auf renale Autoimmunerkrankungen

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Chemie der Fakultät für

Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

vorgelegt von

Daniel Reimers

aus Hamburg

Hamburg, August 2019

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hartmut Schlüter

Tag der Disputation: 11.10.2019

Datum der Druckfreigabe: 30.10.2019

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum März 2016 bis August 2019 im Institut für Immunologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	2
3. Einleitung	3
3.1. Aufbau und Funktion der Niere	3
3.2. Glomerulonephritiden	5
3.3. T-Zellen Selektion ,Differenzierung und Funktion	6
3.4. <i>Staphylococcus aureus</i> und die dagegen resultierende Immunantwort	9
3.5. Tierexperimentelle Modelle zur Untersuchung von Glomerulonephritiden	11
3.5.1. Nephrotoxische Nephritis (NTN)	11
3.5.2. Die Experimentelle autoimmune Glomerulonephritis (EAG)	12
3.6. Die Th17-Zellen in der adaptiven Immunantwort und bei Autoimmunerkrankungen	13
3.7. Geweberesidenter Gedächtniszellen	14
4. Zielsetzung	17
5. Ergebnisse	19
5.1. <i>Staphylococcus aureus</i> -Infektionen in der Niere	19
5.1.1. Charakterisierung der T-Zellantwort in der <i>S. aureus</i> Infektion	21
5.1.2. Charakterisierung der Immunantwort in der Niere nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	26
5.1.3. Analyse der Persistenz von <i>S. aureus</i> induzierten residenten T-Gedächtniszellen	28
5.2. Der Einfluss vorausgehender bakterieller Infektionen auf renale Autoimmunerkrankungen	32
5.2.1. Krankheitsverlauf der Glomerulonephritis nach vorheriger <i>L. monocytogenes</i> Infektion	32
5.2.2. Renale T-Zellantwort während der cGN nach vorheriger <i>L. monocytogenes</i> Infektion	34

5.2.3. Der Einfluss einer vorhergehenden <i>S. aureus</i> Infektion auf die cGN	36
5.2.4. Der Einfluss einer vorhergehenden <i>S. aureus</i> Infektion auf die experimentelle autoimmune Glomerulonephritis (EAG)	43
5.2.5. Die Bedeutung von IL-17A in der durch die Infektion von <i>S. aureus</i> potenzierten cGN	45
5.2.6. T-Zellrezeptorunabhängige Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen	50
5.2.7. Neutralisierung aktivierender Zytokine als therapeutischer Ansatz in der experimentellen cGN	53
5.3. Analyse von gesundem humanem Nierengewebe	56
6. Diskussion	58
6.1. Die Generierung von geweberesidenten T-Zellen in der Niere nach bakteriellen Infektionen	59
6.2. Analyse der Persistenz von <i>S. aureus</i> induzierten residenten Gedächtniszellen	63
6.3. Der Einfluss vorausgehender Bakterieller Infektionen auf renale Autoimmunerkrankungen	65
6.4. Der Einfluss einer vorhergehenden <i>S. aureus</i> Infektion auf die experimentelle autoimmune Glomerulonephritis (EAG)	68
6.5. Die Bedeutung von IL-17A in der durch die Infektion von <i>S. aureus</i> potenzierten cGN	68
6.6. T-Zellrezeptorunabhängige Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen	70
6.7. Analysen von gesundem Humanem Nierengewebe	73
7. Ausblick	76
8. Material und Methoden	77
8.1. Materialien	77
8.1.1. Geräte	77
8.1.2. Chemikalien	77
8.1.3. Verbrauchsmaterialien	79
8.1.4. Kits	80

8.1.5. Primer	80
8.1.6. Antikörper	81
8.1.7. Software	83
8.1.8. Statistik	84
8.2. Methoden	84
8.2.1. Tierexperimentelle Arbeiten	84
8.2.1.1. Mauslinien	84
8.2.1.2. Induktion der Nephrotoxischen Nephritis	85
8.2.1.3. Induktion der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG)	85
8.2.1.4. Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	85
8.2.1.5. Infektion mit <i>Staphylococcus aureus</i>	85
8.2.1.6. Depletion von IL-17A produzierenden Zellen mittels Diphtherietoxin	86
8.2.1.7. Photokonversionen von Nieren in Kaede-Mäusen	86
8.2.1.8. Behandlung mit Ampicillin	86
8.2.1.9. Intravenöse Injektion von α CD45	86
8.2.1.10. Neutralisation von Zytokinen in vivo	87
8.2.2. Zellbiologische Methoden	87
8.2.2.1. Organentnahme und Zellisolation	87
8.2.2.2. Zellisolation aus Organen der Maus	87
8.2.2.3. Zellisolation aus humanem Gewebe	88
8.2.2.4. <i>In vitro</i> Stimulation	88
8.2.2.5. Extrazelluläre und intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie	89
8.2.2.6. Zellsortierung	90
8.2.2.7. Zellzahlbestimmung	90

8.2.3. Molekularbiologische Methoden	91
8.2.3.1. RNA Isolation	91
8.2.3.2. cDNA-Synthese	91
8.2.3.3. Quantitative Real-time-PCR	91
8.2.4. Proteinbiochemische Methoden	91
8.2.4.1. Proteinisolation aus Nierengewebe	91
8.2.4.2. Quantifizierung von Proteinen	92
8.2.5. Immunologische Methoden	92
8.2.5.1. Albumin-ELISA	92
8.2.6. Histologie	92
8.2.6.1. PAS-Reaktion zur histologischen Untersuchung der Nierenschädigung	92
8.2.6.2. Schadensermittlung durch Auszählen der glomerulären Halbmonde	92
9. Literaturverzeichnis	93
10. Anhang	101
10.1. Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe	101
10.2. Zusätzliche Abbildungen in Kooperation erhobener Daten	104
10.3. Tabellenverzeichnis	105
10.4. Abbildungsverzeichnis	106
10.5. Abkürzungsverzeichnis	109
10.6. Danksagung	113
10.7. Publikationsliste und Kongressbeiträge	115
10.8. Eidesstattliche Erklärung	116

1. Zusammenfassung.

Geweberesidente Gedächtnis-T-Zellen sind Zellen des adaptiven Immunsystems, die in peripheren Organen verbleiben und nicht wie Effektor-T-Zellen durch den Körper zirkulieren. Sie können durch Infektionen mit Bakterien wie *Staphylococcus aureus* oder *Listeria monocytogenes* induziert werden und bieten dem Körper Schutz gegen diese Pathogene bei erneuten Infektionen. Ihr Einfluss auf Autoimmunerkrankungen ist aber weitgehend unbekannt. Glomerulonephritiden sind Autoimmunerkrankungen der Nierenkörperchen, die im Menschen rasch zu einem Verlust der Nierenfunktion führen und sogar lebensbedrohend werden können. In diesen Erkrankungen spielen CD4⁺ T-Zellen eine besondere Rolle, da sie maßgeblich für die Schädigung der Niere verantwortlich sind.

In der hier vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von geweberesidenten T-Zellen auf Autoimmunerkrankungen der Niere untersucht werden. Um die residenten T-Zellen zu induzieren wurden Mäuse mit *S. aureus* bzw. *L. monocytogenes* infiziert und die T-Zellantwort zunächst während der Primärinfektion charakterisiert. Eine Infektion mit *Staphylococcus aureus* induziert große Mengen an Th17- und $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Niere, die IL-17A produzieren und über viele Wochen stabil in der Niere nachweisbar waren.

Eine induzierte halbmondbildende Glomerulonephritis (cGN) zeigte in Tieren mit ausgeheilter Staphylokokken-Infektion im Vergleich zu zuvor nicht infizierten Tieren einen aggravierten Krankheitsverlauf und eine stärkere T-Zellantwort. Die Infektion mit Listerien führte nicht zu einer verstärkten Autoimmunerkrankung in der Niere. Interventionsstudien wie die Blockade von IL-17A, Depletion von IL-17A-produzierenden Zellen oder die Hemmung der Aktivierung von residenten T-Zellen in der Niere konnten die Krankheitssymptome der cGN abschwächen.

In humanen Nierenproben von gesunden Probanden konnten im Vergleich zu Blutproben mehr Th17-Zellen nachgewiesen werden, die in der Lage waren IL-17A zu produzieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine wichtige Rolle der durch Pathogene induzierten geweberesidenten T-Zellen für den Verlauf von Autoimmunerkrankungen.

2. Summary

Tissue resident memory T (TRM) cells are part of the adaptive immune system, they reside in peripheral organs and, unlike effector T cells, they do not recirculate through peripheral and lymphoid organs. TRM cells are generated after a bacterial infection with pathogens such as *Staphylococcus aureus* or *Listeria monocytogenes* and they provide local immunosurveillance. However their role in autoimmune diseases is largely unknown.

Glomerulonephritis is an autoimmune disease which affects the glomeruli in the kidney. Glomerulonephritis causes renal injury which can become life-threatening if untreated. CD4⁺ T cells play an important role in the disease and act major inducers of tissue damage in the kidney.

The aim of this study was to characterize the influence of tissue resident memory T cells on autoimmune diseases of the kidney. To generate TRM cells, mice were infected with *S. aureus* and the T cell response was characterized during the primary infection. Interestingly, while *S. aureus* infection led to a profound accumulation of Th17 cells and $\gamma\delta$ -T-cells in the kidney of mice. Other organs were far less affected. The induced T cells were stable over long time periods and able to produce large amounts of IL-17A.

The induction of crescentic glomerulonephritis (cGN) in mice with resolved *S. aureus* infection resulted in significantly aggravated renal disease when compared to that observed in mice without prior infection. In contrast, a previous listeria infection did not alter the course of renal autoimmunity. In an alternative mouse model of renal autoimmunity, prior *S. aureus* infection caused accelerated tissue damage as well. Interventional approaches based on neutralization of IL-17A, depletion of IL-17A-producing cells or inhibition of T cell activation by pro-inflammatory cytokines ameliorated the renal disease. In healthy human kidney tissue, more Th17 cells capable of producing IL-17A were detected compared to matching blood samples.

In conclusion, this study shows a major role of pathogen induced tissue resident memory T cells in autoimmune kidney diseases.

3. Einleitung

3.1 Aufbau und Funktion der Niere

Die Niere ist ein Organ, das bei Wirbeltieren paarweise auftritt. Die biologischen Funktionen der Niere sind komplex, dabei besteht die Hauptaufgabe in der Filtration des Blutes zur Aufbereitung des Harns. Des Weiteren ist die Niere an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts von Wirbeltieren entscheidend beteiligt, sowie der Produktion von verschiedenen Hormonen.

Das Nierengewebe (Nierenparenchym) lässt sich in verschiedene Zonen einteilen. Außen liegt die Nierenrinde (Cortex renalis), innen befindet sich das pyramidenförmig angeordnete Nierenmark (Medulla renalis). Die funktionale Einheit der Niere ist das Nephron, dieses besteht aus einem Nierenkörperchen (Corpusculum renis) und dem Tubulussystem (Tubuli). In jeder humanen Niere gibt es mehr als 1 Million Nephrone, die in der Nierenrinde lokalisiert sind ¹. Die Tubuli reichen von der Nierenrinde, der Position der Nierenkörperchen (Glomeruli), bis ins Nierenmark. Das Nierenkörperchen selbst besteht wiederum aus Kapillaren, die in einem Knäuel angeordnet sind. In diesen Kapillaren findet die Filtration des Primärharns statt. Die Filtrationsbarriere in den Glomeruli besteht aus den Endothelzellen der Blutkapillaren, der glomerulären Basalmembran (GBM), die Kollagen enthält, sowie den Podozyten. Die Podozyten sind spezialisierte Zellen in der Niere, die Fußfortsätze ausbilden, welche wiederum eine Schlitzmembran formen. Dieser Filter in der Niere lässt nur Moleküle einer gewissen Größe passieren. Moleküle über einem Molekulargewicht von 60 Kilodalton (kDa) werden zurückgehalten und fließen nicht, wie kleinere Moleküle, in das Tubulussystem. Außerdem ist die Ladung der Moleküle mit ausschlaggebend für die Filtration². Dieses System besteht aus verschiedenen Abschnitten, diese werden als proximaler und distaler Tubulus bezeichnet, anschließend folgt die Henle-Schleife. Im Tubulussystem erfolgt die Konzentration des Harns. Es werden bestimmte Moleküle und Wasser entzogen, der entstehende Sekundärharn wird in die Harnblase (Vesica urinaria) abgeleitet. Der schematische Aufbau der Niere ist in Abbildung 1 dargestellt.

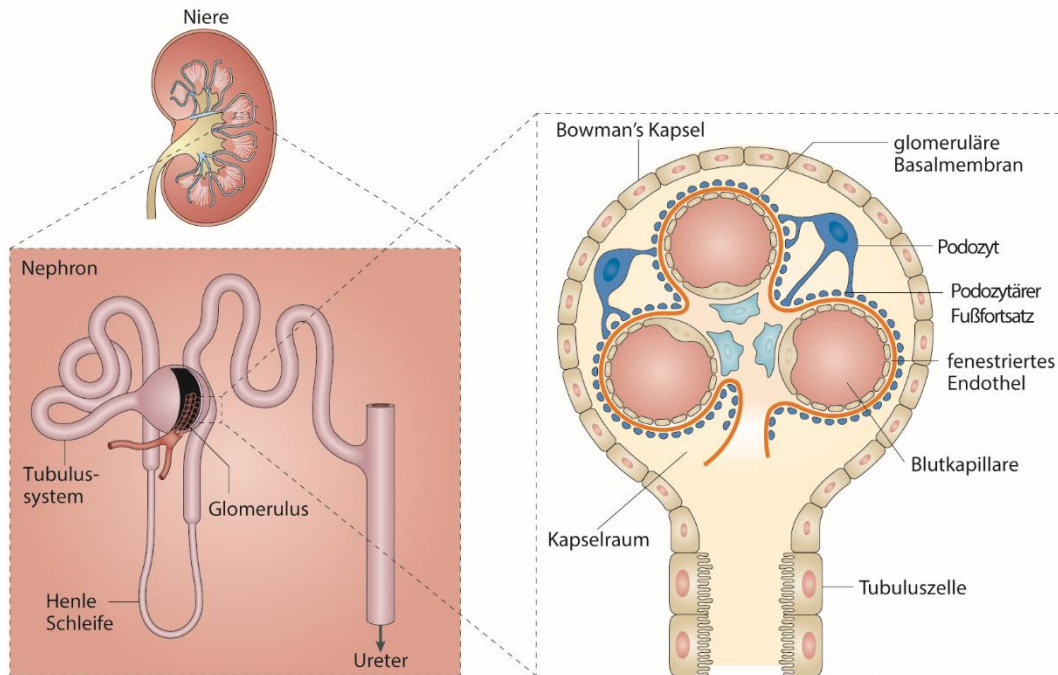


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Niere. Das Nephron stellt die funktionale Einheit einer Niere dar, jedes Nephron setzt sich aus dem Tubulussystem und einem Nierenkörperchen zusammen. Die Nierenkörperchen sind in der Nierenrinde lokalisiert und bestehen aus Blutkapillaren und der Bowman-Kapsel. Innerhalb der Kapsel bilden das fenestrierte Endothel, die glomeruläre Basalmembran und die Fußfortsätze der Podozyten die Filtrationsbarriere für das Blut in der Niere. Abbildung modifiziert nach³.

Die Niere hat eine sehr hohe Filtrationsleistung, es werden täglich 20% des Herzzeitvolumens an Flüssigkeit filtriert, aus denen ca. 1 Liter Harn entsteht⁴. Über Stoffwechselprodukte, wie Harnsäure, Harnstoff und Kreatinin, die über den Harn ausgeschieden werden, kann eine Aussage über die Nierenfunktion getroffen werden. Verschiedene Krankheiten beeinflussen die Nierenfunktion, allerdings tritt eine Niereninsuffizienz erst bei größeren Verlusten an funktionellen Nephronen ein. Krankheiten können verschiedene Bereiche der Niere betreffen, es gibt Nierenerkrankungen des tubulären Systems sowie Glomerulopathien, bei der die Glomeruli betroffen sind. Die Ursachen hierfür sind häufig Autoimmunerkrankungen.

3.2 Glomerulonephritiden

Glomerulopathien sind Krankheiten, welche die Glomeruli betreffen. Eine ihnen untergeordnete Gruppe sind die Glomerulonephritiden (GN). Glomerulonephritiden sind inflammatorische Erkrankungen der Glomeruli. Im klinischen Alltag wird im Verlauf einer Nierenerkrankung zwischen einem nephritischen oder einem nephrotischen Syndrom unterschieden. Im nephrotischen Syndrom kommt es zu einer schweren Proteinurie (mehr als 3,5g Protein im 24 Stunden-Urin), wodurch eine starke Bildung von Ödemen begünstigt wird. Im nephritischen Syndrom ist die Proteinurie geringer (weniger als 3,5g Protein/24h), allerdings tritt eine akute Entzündung auf.

Besonders aggressive Verlaufsformen der GN, bei denen es innerhalb von Wochen oder sogar Tagen zu einem signifikanten Funktionsverlust der Niere kommen kann, werden als rasch progressive Glomerulonephritiden (RPGN) bezeichnet. Charakteristisch für eine RPGN ist eine schwere Entzündung, die sich durch das Ausbilden einer halbmondförmigen Struktur in der Bowman-Kapsel auszeichnet. Hierbei sammeln sich proliferierende Zellen in der Bowman-Kapsel. Diese Halbmonde (englisch crescents) führen zur Bezeichnung der Erkrankung als crescentic Glomerulonephritis (cGN), die auch im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet wird. Die RPGNs zeichnen sich hierbei alle durch das Auftreten eines nephritischen Syndroms aus. Weiterhin wird bei einer GN generell zwischen zwei Arten unterschieden, der primären und sekundären Glomerulonephritis. Die primäre Form zeichnet sich dadurch aus, dass keine weitere Erkrankung für den Schaden verantwortlich ist, häufig manifestiert sich die Krankheit direkt an den Glomeruli, wie bei der anti-GBM-GN. Im Unterschied dazu ist eine sekundäre Glomerulonephritis häufig die Folge einer systemisch Erkrankung, die auch eine Beteiligung der Niere aufweist (z.B. ANCA GN). Eine RPGN lässt sich in drei verschiedene Gruppen einteilen, je nach Mechanismus der Pathogenese.

Der erste Typ ist die anti-glomeruläre Basalmembran-Glomerulonephritis (anti-GBM-GN). Bei dieser Erkrankung werden Antikörper gegen ein Bestandteil der Basalmembran, das Kollagen IV, produziert, die zu linearen Ablagerungen an der Basalmembran führen. Eine Form dieser Erkrankung ist das Goodpasture-Syndrom, bei dem ebenfalls die Lunge betroffen ist. Diese Erkrankung wurde erstmals 1919 beschrieben⁵.

Die Zweite Form der RPGN ist die Immunkomplex-vermittelte RPGN. Hierbei werden Immunkomplexe entlang der Basalmembran abgelagert. Unter den Immunkomplex-

vermittelten RPGNs ist die IgA-Nephropathie der häufigste Vertreter dieser Gruppe von Erkrankungen. Bei der Krankheit werden IgA-Antikörper gebildet, die wiederum selbst eine anti-IgA Antikörperantwort auslösen. Die daraus resultierenden Immunkomplexe lagern sich dann an der Basalmembran ab. Eine weitere Erkrankung, die zu einer Immunkomplex-RPGN gezählt wird, ist der Lupus erythematodes.

Eine ANCA-assoziierte GN (ANCA = *anti-neutrophil cytoplasmatic antibody*) ist die dritte Form der RPGN. Hierbei handelt es sich eigentlich um eine Gefäßentzündung (Vaskulitis), bei denen oft auch die Niere beteiligt ist⁶. Bei dieser Erkrankung werden Antikörper gegen Bestandteile von Neutrophilen gebildet. Hier sind zwei Antigene identifiziert worden, die Myeloperoxidase und die Proteinase-3. Die ANCA-assoziierte GN ist die häufigste Form der RPGNs.

3.3 T-Zellen Selektion ,Differenzierung und Funktion

Für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen ist eine gestörte Toleranz des körpereigenen Immunsystems verantwortlich. Bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen sind verschiedene Teile des Immunsystems beteiligt. So gibt es B-Zellen, die Antikörper produzieren, welche gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind und somit Schäden verursachen⁷. Neben Autoantikörpern gibt es auch T-Zellen, die körpereigene Strukturen erkennen und attackieren⁸.

Die T-Zellen werden zunächst im Knochenmark als Vorläuferzellen gebildet und gelangen in den Thymus. In diesem Stadium sind die T-Zellen negativ für die beiden Oberflächenmarker CD4 und CD8 (CD4⁻CD8⁻). Im Thymus interagieren die Vorläuferzellen mit Epithelzellen und Dendritischen Zellen, wodurch eine Differenzierung und Proliferation ausgelöst wird. In diesem Stadium wird erstmals ein funktionsfähiger T-Zellrezeptor (TCR, von *T-cell receptor*) exprimiert. Aus den doppelt negativen (CD4⁻CD8⁻) reifen nun doppelt positive (CD4⁺CD8⁺) Zellen heran. Nach dieser ersten Reifung setzt eine Reihe von Selektionsprozessen ein, bei denen dem TCR Autoantigene präsentiert werden. Diese Autoantigene werden in Antigenpräsentierenden Zellen (APZs) zu Peptiden prozessiert und im Komplex mit dem MHC (*major histocompatibility complex*) präsentiert. Die Interaktion des TCR mit den präsentierten Peptiden entscheidet über das Schicksal der Zellen, nur Zellen mit einer intermediären Affinität können den Thymus lebend verlassen. Eine zu niedrige oder zu starke Affinität führt zum programmierten Zelltod (Apoptose). Zellen, die den Selektionsprozess überstehen, verlassen als naive CD4 oder CD8 T-Zellen den

Thymus. Neben den konventionellen CD4 T-Zellen können auch regulatorische T-Zellen, die sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 auszeichnen (Tregs), den Thymus verlassen⁹. Diese Selektionsprozesse werden als zentrale Toleranz bezeichnet, mit dem Ziel die Entstehung von autoreaktiven T-Zellen zu verhindern und damit das Auftreten Autoimmunerkrankungen zu begrenzen¹⁰.

Neben der schädlichen Rolle von CD4 T-Zellen in den bereits erwähnten Autoimmunerkrankungen sind CD4 T-Zellen vor allem ein zentraler Bestandteil des adaptiven Immunsystems¹¹. T-Zellen können durch ihre Interaktion mit B-Zellen die Produktion von Antikörpern beeinflussen. Des Weiteren können T-Zellen Zytokine sekretieren, die weitere Zellen des Immunsystems spezifisch in Organe rekrutieren, um dort eine Infektion zu bekämpfen. Durch die Produktion von Zytokinen lässt sich die Immunantwort je nach Situation in verschiedene Richtungen lenken. Die CD4 T-Zellen werden entsprechend ihres Zytokinprofils und ihrer spezifischen Transkriptionsfaktoren in Subtypen unterteilt. Die wichtigsten Subtypen sind die T-Helferzellen des Typs 1 (Th1), 2 (Th2) und 17 (Th17) sowie die regulatorischen T-Zellen (Tregs)^{12,13}. Neben diesen „klassischen“ Subtypen gibt es Weitere wie Th9- und Th22-Zellen^{14,15}. Die Rolle dieser Zellen in der Abwehr von Pathogenen ist bisher nicht vollständig geklärt.

Th1-Zellen sind klassischerweise für die Abwehr von intrazellulären Bakterien, wie z.B. Listerien oder Mykobakterien, verantwortlich. Sie zeichnen sich durch die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) aus, das für die Aktivierung von Makrophagen notwendig ist¹⁶. Typisch für Th1-Zellen ist die Expression des Transkriptionsfaktor Tbet. Neben Tbet sind auch die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT4 für die Differenzierung zu Th1-Zellen wichtig. Neben ihrer protektiven Funktion sind Th1-Zellen auch an der Entstehung und der Gewebeschädigung im Verlauf von Autoimmunerkrankungen beteiligt.

Th2-Zellen zeichnen sich durch den Transkriptionsfaktor GATA3 aus, zudem ist auch STAT6 an ihrer Entwicklung beteiligt. Th2-Zellen produzieren verschiedene Interleukine (IL) wie das IL-4, IL-5 und IL-13. Th2-Zellen sind mit verantwortlich für die Rekrutierung von Eosinophilen. Diese sind an der Abwehr von extrazellulären Parasiten wie Würmern beteiligt, aber auch an allergischen Reaktionen¹⁷.

Th17-Zellen sind ein weiterer Subtyp der T-Helferzellen und durch die Produktion des Interleukin 17A (IL-17A) sowie den Transkriptionsfaktor ROR γ t charakterisiert^{18,19}. Das Interleukin 17A dient zur Rekrutierung von Neutrophilen an den Ort der Entzündung.

Neben IL-17A produzieren Th17-Zellen ebenfalls IL-17F, IL-22 und GM-CSF. Außerdem ist bekannt, dass Th17-Zellen bei Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Psoriasis wichtig sind²⁰. Die Bedeutung und Eigenschaften von Th17-Zellen werden unten in einem weiteren Abschnitt im Detail beschrieben.

Regulatorische T-Zellen sind für die Kontrolle des Immunsystems wichtig. Sie inhibieren über verschiedene Mechanismen, u.a. durch das von ihnen produzierte Interleukin-10 (IL-10), andere Immunzellen, was einem überschießendem Immunsystem und somit einer Immunpathogenese entgegen wirkt. Diese Kontrolle ist auch bei Antigenen in der Nahrung oder Bakterien im Darm wichtig (periphere Toleranz), um eine ungewollte Aktivierung des Immunsystems zu verhindern. Wie zuvor bereits beschrieben ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 charakteristisch für regulatorische T-Zellen. Neben IL-10 produzieren diese T-Zellen auch u.a. noch IL-35 und TGF- β . Regulatorische T-Zellen lassen sich noch weiter in natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) und induzierte regulatorische T-Zellen, welche im Vergleich zu den nTregs nicht im Thymus, sondern in der Peripherie unter anderem durch TGF- β entstehen, unterteilen²¹.

Neben den CD4 T-Zellen gibt es die Gruppe der CD8 T-Zellen, welche als zytotoxische T-Zellen bekannt sind²². Diese sind für die Erkennung und Eliminierung von infizierten Zellen oder auch Tumorzellen verantwortlich. Die Entwicklung der Subtypen der CD4 T-Zellen verläuft nicht ausschließlich gradlinig wie in Abb. 2 dargestellt, es treten zusätzlich noch Prozesse auf, bei denen T-Zellen ihren Phänotyp verändern können, in diesem Fall spricht man von Plastizität der T-Zellen²³. Neben den klassischen CD4 und CD8 T-Zellen mit einem T-Zellrezeptor, bestehend aus den Untereinheiten α und β , gibt es noch $\gamma\delta$ -T-Zellen, die im früh im Thymus entstehen und direkt in periphere Gewebe wandern²⁴. $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen keinen klassischen T-Zellrezeptor, sondern einen TCR, bestehend aus einer γ und einer δ Untereinheit. Über die Antigene von $\gamma\delta$ -T-Zellen ist noch nicht viel bekannt, allerdings sind sie wichtige Bestandteile des Immunsystems mit verschiedenen Funktionen²⁵. Sie sind beispielsweise in der Lage, wie auch Th17-Zellen, IL-17A zu produzieren.

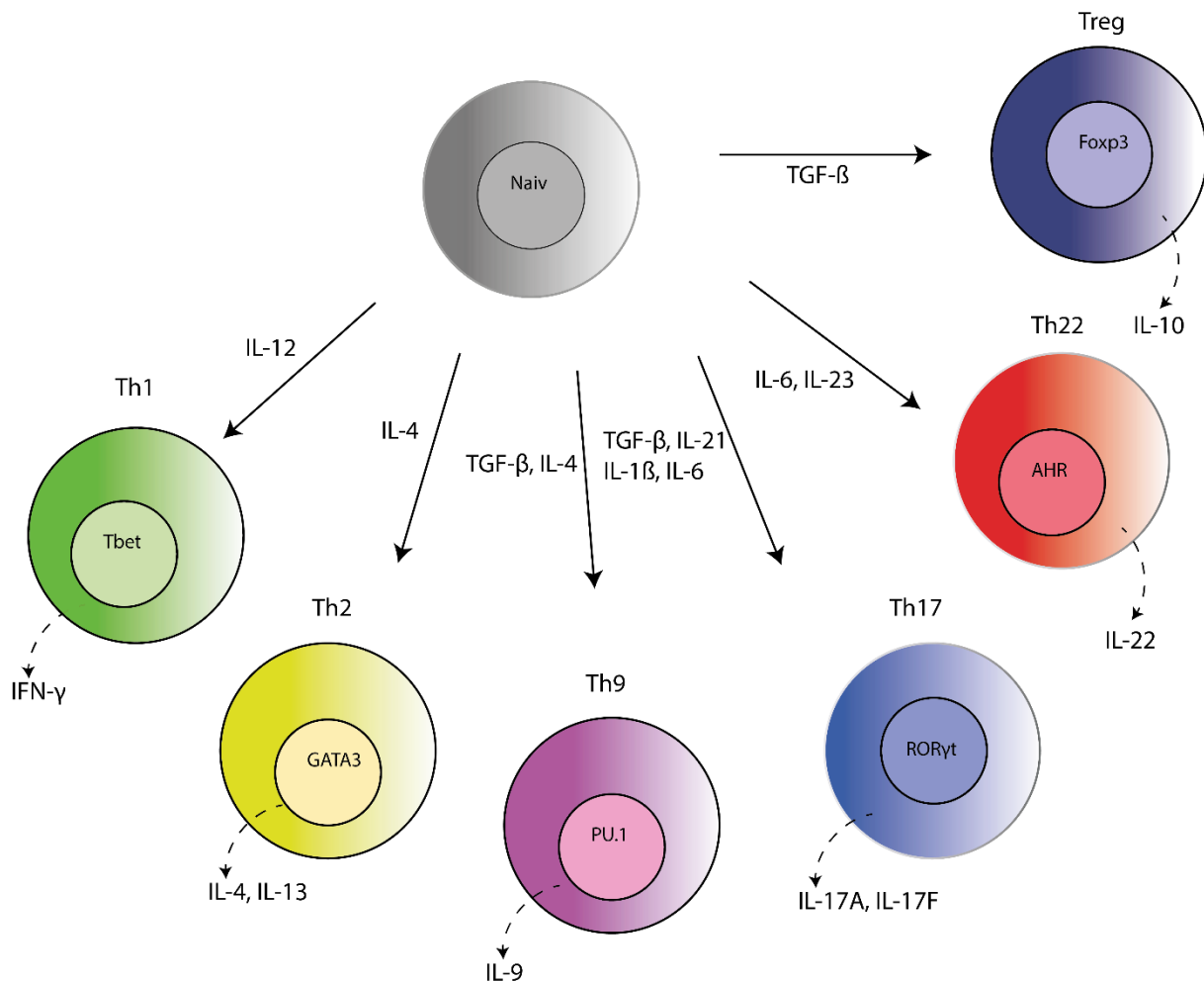


Abbildung 2: Schematische Darstellung der T-Helferzellsesubtypen. Dargestellt sind jeweils die benötigten Zytokine zur Differenzierung in die jeweiligen Subtypen sowie die charakteristischen Transkriptionsfaktoren und die wichtigsten jeweils produzierten Zytokine der T-Zellen²⁶.

3.4 *Staphylococcus aureus* und die dagegen resultierende Immunantwort.

Der *Staphylococcus aureus* ist ein grampositives, fakultativ anaerobes Bakterium, welches kommensal auftritt und sich zu traubenförmigen Kolonien zusammenfindet. Insgesamt sind mehr als 30 Arten von Staphylokokken bekannt²⁷. Menschen sind *S. aureus* täglich ausgesetzt. Im Normalfall tragen etwa 30% der Bevölkerung *S. aureus* in den oberen Atemwegen oder auf der Haut, ohne, dass Krankheitssymptome auftreten. Bei einem geschwächten Immunsystem oder Verletzungen ist es allerdings möglich, dass Staphylokokken pathogen werden und zu unterschiedlichen Krankheiten führen. Hierzu zählen beispielsweise Hautinfektionen, Lungenentzündungen, Endocarditis oder auch Sepsis. Im Normalfall lassen sich Infektionen mit *S. aureus* durch die Behandlung mit Antibiotikagut gut bekämpfen²⁸. Ein Problem sind Staphylokokken, die gegen eine große Bandbreite von Antibiotika

resistent sind, prominente Vertreter hierfür sind Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme²⁹. Staphylokokken haben sich ihrerseits an das Immunsystem angepasst, es gibt zahlreiche Strategien auf Seiten der Bakterien, die zum Ziel haben das Immunsystem zu unterlaufen³⁰. Abbildung 3 zeigt verschiedene Strategien mit denen Bakterien nach intravenöser Infektion die Blutgefäße verlassen und das Immunsystem umgehen.

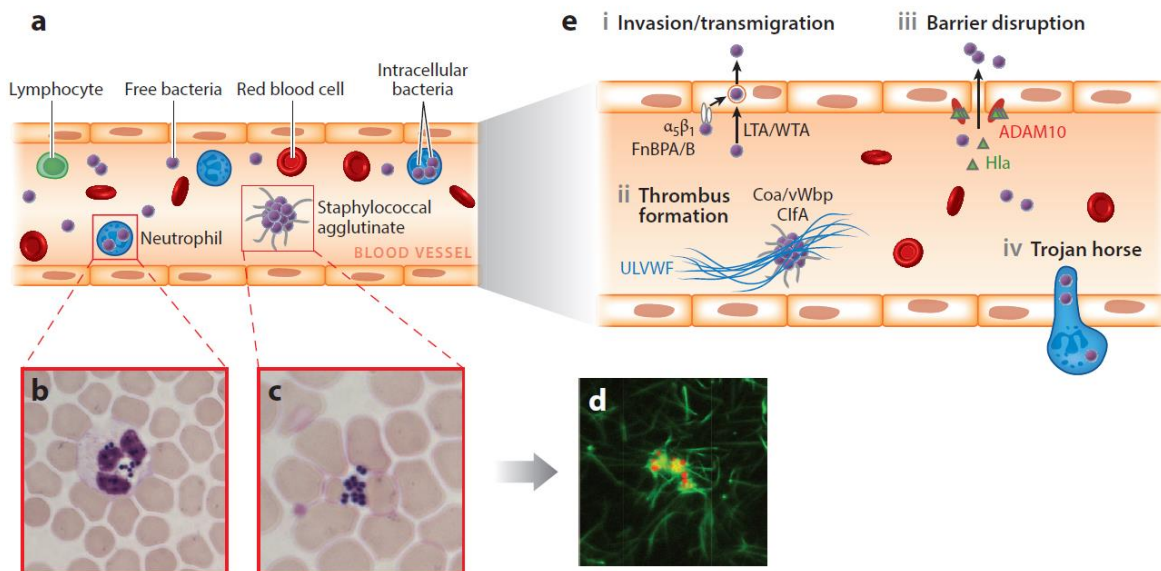


Abbildung 3. *Staphylococcus aureus* im Blutkreislauf und die Invasion angrenzender Gewebe.

A) Nach intravenöser Infektion verteilen sich Staphylokokken durch den Blutkreislauf in angrenzende Gewebe. Nach 24-48 Stunden sind keine Bakterien mehr im Blut zu detektieren. B) und C) zeigen in einer Giemsa-Färbung, dass Staphylokokken mit Neutrophilen assoziiert sind (B) oder an ihrer Oberfläche kleben (C). D) zeigt Staphylokokken, welche rote Reporterproteine exprimieren, die sich durch die Interaktion mit Fibrinmolekülen (Grüne Fluoreszenz) zu Kolonien zusammenlagern. E) zeigt Strategien der Staphylokokken, um aus den Blutgefäßen in die anliegenden Organe zu entkommen. Dazu werden Oberflächenproteine der Bakterien (FnBPA/B) genutzt, um durch die Endothelien der Blutgefäße in die Gewebe zu kommen (i). Zusätzlich können Thromben gebildet werden, wobei auch von Willebrand Faktoren beteiligt sind. Diese Aktivierung der Blutgerinnung hilft den Bakterien gegen das Immunsystem des Wirtes (ii). Durch die Sekretion von Bakteriellen Toxinen wie dem α -Hämolyin (Hla), die mit Proteasen des Wirtes wie ADAM10 interagieren, können die Strukturen der Gefäße zerstört werden, sodass Bakterien in die umliegenden Gewebe eindringen können (iii). Weiterhin können Bakterien intrazellulär in Neutrophilen die Gefäße verlassen und ins Gewebe eindringen (iv). Abbildung aus Thomer, Schneewind and Missiakas, 2016³¹

Zunächst soll die normale Immunantwort gegen *S. aureus* beschrieben werden. Staphylokokken sind normalerweise extrazelluläre Bakterien, die somit eine typische Antwort von CD4 T-Zellen, genauer den Th17-Zellen auslösen³². Dieser Subtyp von CD4 T-Zellen produziert das IL-17-A, welches wiederum zur Rekrutierung von Neutrophilen dient. Neben den CD4 T-Zellen sind ebenfalls die $\gamma\delta$ -T-Zellen an der Immunantwort gegen *S. aureus* beteiligt³³. Neben Neutrophilen sind auch Makrophagen an der Bekämpfung der extrazellulären Bakterien von Bedeutung. Einige Studien zeigen auch eine Beteiligung von Th1-Zellen bei der Bekämpfung von

S. aureus Infektionen³⁴. Neben den CD4 T-Zellen spielen auch antikörperproduzierenden B-Zellen eine Rolle bei der Bekämpfung des *S. aureus*³⁵. Die gegen Staphylokokken gerichteten Antikörper können zur Opsonisierung der Bakterien durch Makrophagen führen. Die hauptsächlich extrazellulär lebenden Staphylokokken können teils auch intrazellulär überleben und sind dadurch das Ziel von zytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen eliminieren können. Neben dem Menschen sind auch Tiere, oft Nutzvieh Opfer von *S. aureus* Infektionen. Daher sind häufig Studien zur Entwicklung eines Impfstoffes in diesen Tieren zu finden³⁶.

3.5 Tierexperimentelle Modelle zur Untersuchung von Glomerulonephritiden

3.5.1 Nephrotoxische Nephritis (NTN)

Ein verbreitetes Modell zur Untersuchung von einer RPGN ist das Modell der Nephrotoxischen Nephritis³⁷. Bei diesem Modell wird aus zuvor mit Bestandteilen von murinen Nierenrinden immunisierten Schafen Serum gewonnen. Dieses enthält vom Schaf produzierte anti-Maus-Nierencortex-Antikörper. Diese Antikörper erkennen Strukturen des Nierencortexes von Mäusen, die genauen Antigene sind hierbei aber nicht bekannt. Nach Injektion der Antikörper entwickeln Mäuse eine starke Proteinurie, welche in der ersten Phase unabhängig vom adaptiven Immunsystem entsteht. Diese heterologe Phase der Erkrankung läuft auch in Mäusen mit fehlenden B- und T-Zellen ab. Durch die Injektion der Antikörper wird also ein für die Maus fremdes Antigen, in Gestalt der Schaf-anti-Nierencortex-Antikörper, in der Niere der Mäuse platziert (*planted antigen*). Diese Antikörper lösen ihrerseits wieder eine Immunantwort aus. Im Anschluss an die auftretende Antikörperablagerung an der GBM, beginnen Zellen des adaptiven Immunsystems in die Niere einzuwandern. Außerdem kommt es zur charakteristischen glomerulären Halbmondbildung. Das NTN Modell stellt ein experimentelles Modell für die halbmondbildende Glomerulonephritis dar. Aus vorhergehenden Arbeiten konnte im experimentellen NTN Modell gezeigt werden, dass besonders IL-17A produzierende T-Helferzellen unter anderem aus dem Dünndarm in die Nieren einwandern und entscheidend zum Schaden in früheren Phasen der Erkrankung beitragen³⁸. Neben den einwandernden Th17-Zellen sind gerade in frühen Zeitpunkten der NTN die $\gamma\delta$ -T-Zellen wichtig³⁹. Die Migration der Th17-Zellen setzt ab Tag 4-5 der experimentellen Nephritis ein. Im weiteren Verlauf der Krankheit folgt eine Phase, die sich durch die Akkumulation von pro-

inflammatorischen Th1-Zellen und anti-inflammatorischen regulatorischen T-Zellen auszeichnet⁴⁰. In dieser Phase sind besonders Th1-Zellen für Nierenschäden verantwortlich³. Wird die Einwanderung von Th1-Zellen unterbunden, beispielsweise durch KO (*knock out*) Mäuse, denen der Chemokinrezeptor CXCR3 fehlt, so verbessert sich auch das Krankheitsbild dieser Mäuse⁴¹. Sind keine T-Zellen in der Niere, findet auch die Bildung der glomerulären Halbmonde nicht statt.

3.5.2 Die Experimentelle autoimmune Glomerulonephritis (EAG)

Ein weiteres Modell, um autoimmune Erkrankungen in der Niere zu untersuchen, ist das antigenspezifische Modell der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG). Bei diesem Modell werden Mäuse mit dem Antigen des Goodpasture-Syndroms, dem $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, einem Bestandteil des humanen Kollagen IV, immunisiert. Die wiederholte Immunisierung mit dem rekombinant hergestellten Protein führt zu einer sich langsam entwickelnden autoimmunen Nierenerkrankung⁴². In der hier vorliegenden Arbeit wurde murines $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ verwendet, das sich analog zu humanem $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ verhält, wobei die Pathogenese jedoch etwas langsamer verläuft.

Das Verfahren zur Immunisierung und Herstellung des rekombinanten Proteins wurde von Hopfer et al. ausführlich beschrieben⁴². In der EAG spielen B-Zellen eine zentrale Rolle. Diese produzieren anti- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ Autoantikörper und lassen sich bereits 2 Wochen nach der primären Immunisierung im Blut nachweisen. Im Verlauf der Erkrankung lagern sich die Autoantikörper entlang der GBM ab. Die Mäuse entwickeln ab Woche 7 eine Proteinurie und werden ab Woche 9 stark nephrotisch und beginnen Ödeme zu bilden. Schwerkranke Tiere zeigen außerdem einen erhöhten Blutstickstoffgehalt und weisen histologisch die charakteristische Halbmondbildung in den Glomeruli auf. Neben der Rolle von B-Zellen konnte durch unsere Arbeitsgruppe auch eine essentielle Rolle von $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen T-Zellen in der Entstehung einer cGN nachgewiesen werden^{43,44,45,46}. Die EAG erlaubt somit, im Unterschied zum NTN Modell, die Analyse der antigenspezifischen zellulären und humoralen Immunantwort bei der vollständigen Entwicklung einer Autoimmunerkrankung. Beginnend bei der ersten Immunisierung bis hin zur starken Nierenschädigung in der Endphase.

3.6 Die Th17-Zellen in der adaptiven Immunantwort und bei Autoimmunerkrankungen

Th17-Zellen zeichnen sich wie zuvor bereits beschrieben durch die Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t aus⁴⁷. Für die Th17-Zellen ist auch der Transkriptionsfaktor STAT3 wichtig, der aber auch von anderen Zellen exprimiert. Neben der Identifikation über den Transkriptionsfaktor ROR γ t ist es auch möglich Th17-Zellen über ein spezifisches Muster an Chemokinrezeptoren zu identifizieren⁴⁸. So exprimieren Th17-Zellen auf der Oberfläche vermehrt den Chemokinrezeptor CCR6, welcher für die Wanderung der Th17-Zellen zum Entzündungsherd relevant ist⁴⁹. Für die Entstehung von Th17-Zellen sind verschiedene Zytokine nötig (Abb. 2). Unter physiologischen Bedingungen finden sich Th17-Zellen vor allem in Schleimhäuten und besonders im Dünndarm⁵⁰. An diesen Grenzflächen findet oft eine ständige Interaktion mit Mikroorganismen, vor allem Bakterien, statt. Den Th17-Zellen werden hier vermehrt über antigenpräsentierenden Zellen (APZs) bakterielle Peptide präsentiert. Antigenpräsentierende Zellen tragen zudem das Oberflächenprotein CD40, welches mit dem CD154 (auch CD40L) der T-Zellen interagiert, diese CD40-CD40L Interaktion ist ebenfalls für die Entstehung von Th17-Zellen von Bedeutung⁵¹. Für die Expansion der entstehenden Th17-Zellen ist das Interleukin-23 entscheidend. Im Verlauf einer Infektion mit extrazellulären Bakterien wie *S. aureus* oder pathogenen Pilzen wie *Candida Albicans*, werden in der adaptiven Immunantwort auch Th17-Zellen aktiviert. Die Rekrutierung von Th17-Zellen erfolgt über die Achse CCL20-CCR6⁵². Am Entzündungsort wird das Chemokin CCL20 produziert, welches an den Chemokinrezeptor CCR6 der Th17-Zellen bindet. Rekrutierte Th17-Zellen produzieren nun vor allem Zytokine der IL-17 Familien, wie IL-17A und IL-17F. Ein wesentlicher Effekt der Aktivierung von Th17-Zellen ist die Rekrutierung von Neutrophilen an den Ort der Entzündung⁵³. Dies geschieht über weitere Zellen am Entzündungsort, die auf die von den Th17-Zellen sekretierten Zytokine reagieren. Endothelzellen exprimieren den IL-17 Rezeptor. Bindet der Rezeptor IL-17A oder auch IL-17F wird die Zelle zur Produktion von Chemokinen wie CXCL1 oder CXCL5 angeregt, welche wiederum für die Rekrutierung von Neutrophilen zur Bekämpfung von Bakterien verantwortlich sind⁵⁴. Es konnten neben den protektiven Rollen der Th17-Zellen bei Infektionen auch Beteiligungen an Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden. In Mausmodellen der nephrotoxischen Nephritis konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Mäuse, denen eine Untereinheit (p40) des IL-23, welches zur Expansion der Th17-Zellen

beiträgt, eine verminderte Pathologie in der Niere zeigen⁵⁵. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in IL-17A defizienten Tiere gezeigt werden⁵⁶. Neben den Modellen der Nierenerkrankungen konnten auch in einem Mausmodell zur Multiplen Sklerose (experimentelle autoimmune enzephalomyelitis, EAE) gezeigt werden, dass Tieren mit fehlendem IL-17A geschützt sind⁵⁷. Es gibt zudem auch Hinweise, dass Th17-Zellen in Autoimmunerkrankungen bei Menschen eine Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass bei ANCA-Patienten vermehrt Th17-Zellen in Nierenbiopsien zu finden sind³⁸. Bei anderen Autoimmunerkrankungen finden bereits Medikamente Verwendung, die gegen das IL-17A blockieren. So gibt es monoklonale Antikörper gegen IL-17A, beispielsweise Ixekizumab oder Secunimab, welche bei der Psoriasis angewendet werden^{58,59}. Außerdem gibt es Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Infektion bzw. Kolonisation mit *S. aureus* und der ANCA-Vasculitis herstellen⁶⁰.

3.7 Geweberesidenter Gedächtniszellen

T-Zellen werden klassischerweise durch den Kontakt mit einem Antigen sowie der Interaktion mit weiteren Molekülen aktiviert. Die Antigene werden in peripheren Organen von dendritischen Zellen aufgenommen und prozessiert, dienen somit als antigenpräsentierende Zellen und wandern in sekundäre Lymphknoten, wo sie auf die T-Zellen treffen und zu deren Aktivierung beitragen. Im Falle von Infektionen werden die T-Zellen gezielt an den Ort der Infektion bzw. Entzündung rekrutiert und sind somit auch in peripheren, nicht lymphatischen Organen, zu finden. Nach dem Abklingen einer Infektion bleiben T-Zellen erhalten, die sich nun zu langlebigen Gedächtniszellen entwickeln⁶¹. Auch die T-Gedächtniszellen lassen sich wiederum erneut unterteilen, in T-Effektor-Gedächtnis Zellen, die sich schnell durch bekannte Antigene aktivieren lassen und somit eine schnelle Reaktion des Immunsystems ermöglichen, diese Zellen zirkulieren durch den Körper und lassen auch in nicht-lymphatischen Organen finden, wie beispielsweise der Niere⁶². Zudem gibt es Zentrale-Gedächtnis Zellen, die vor allem in lymphatischen Organen und der Zirkulation zu finden sind. Ein weiterer Zelltyp der Gedächtniszellen sind die geweberesidenten Gedächtniszellen⁶³. Diese Zellen unterscheiden von den anderen Gedächtniszellen, weil sie in den peripheren Organen verbleiben und nicht mehr auswandern. Aufgrund ihrer Position im Gewebe unterscheiden sich residente T-Zellen relativ stark von zirkulierenden Zellen, da sie zum Einen im Gewebe verbleiben und dafür andere Oberflächenproteine benötigen

als zirkulierende T-Zellen und zum Anderen unterschiedlichen Zugang zu Nährstoffen haben⁶⁴. Die gewebeständigen T-Zellen bieten dem Organismus die Möglichkeit schnell und gezielt in spezifischen Organen bzw. Geweben auf Infektionen zu reagieren. Sie dienen quasi als Wächter im Gewebe. Eine ihrer wichtigsten Funktionen ist die schnelle Rekrutierung von weiteren Immunzellen gezielt zum Infektionsherd.

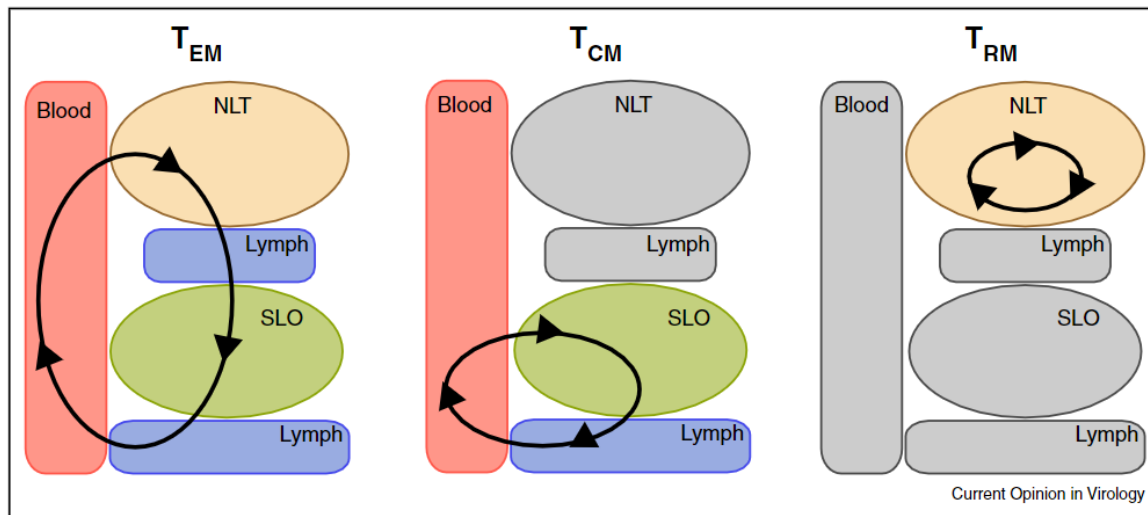


Abbildung 4: Subtypen von T-Gedächtniszellen und ihr Migrationsmuster. Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) zirkulieren durch das Blut (Blood), Lymphgefäße (Lymph), lymphatische (SLO secondary lymphoid tissues) und nicht lymphatische Organe (NLT, non-lymphoid tissues) und patrouillieren so im ganzen Körper. Zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}) wandern nicht in periphere Gewebe und bewegen sich nur zwischen lymphatischen Organen und dem Blut. Geweberesidente T-Zellen (T_{RM}) halten sich nur nicht lymphatischen peripheren Geweben auf und sorgen dort für eine ortsspezifische Immunantwort (Abbildung aus ⁶⁵).

Die meisten Studien zum Nachweis der Persistenz von geweberesidenten T-Zellen wurden mittels Parabiose durchgeführt, hierbei werden die Blutkreisläufe zweier Mäuse verbunden und über kongene Marker, wie CD45.1 und CD45.2, konnte ein stabiles Verbleiben in peripheren Organen der jeweiligen Zellen beobachtet werden⁶⁶. Eine allgemeingültige Definition von spezifischen Oberflächenmarkern für residente T-Zellen ist aber schwierig, vor allem im Menschen. Die Expressionsmuster dieser Oberflächenproteine unterscheiden sich von Zelltyp zu Zelltyp oder auch von den jeweiligen untersuchten Organen. So gibt es unterschiedliche Oberflächenmarker für residente CD4 und CD8 T-Zellen. Weithin genutzte Marker sind die Proteine CD69, ein C-Typ Lektin, das ursprünglich als Aktivierungsmarker in T-Zellen beschrieben wurde und CD103, ein Integrin, das als Adhäsionsmolekül fungiert^{67,68}. CD103 wird allerdings eher in Schleimhäuten und vorrangig auf CD8⁺ T-Zellen exprimiert. Weitere weniger eindeutige Marker sind CD49a, ebenfalls ein Integrin oder die Transkriptionsfaktoren Hobit und Blimp1^{69,70}. Diese beiden Transkriptionsfaktoren

unterscheiden sich allerdings auch in ihren Expressionsmustern in Menschen und Mäusen und sind nicht auf geweberesidente Zellen begrenzt. Eine weitere Methode um gewebeständige Zellen in Versuchstieren zu identifizieren ist die intravenöse Injektion eines Fluorochrom-markierten Antikörpers in eine Maus drei Minuten vor der Organentnahme. Hierdurch ist es möglich die zirkulierenden Zellen zu markieren und in der Durchflusszytometrie von den residenten und somit nicht markieren Zellen zu unterscheiden⁷¹. Neben geweberesidenten T-Zellen gibt es auch weitere Zelltypen, die geweberesident sein können wie NK-Zellen oder ILCs (*innate lymphoid cells*). Diese gewebsständigen T-Zellen konnten bisher in verschiedenen Organen identifiziert werden. Vor allem in der Haut oder in mukosalem Geweben sind diese Zellen beschrieben⁷². Neben Studien über die Rolle von geweberesidenten T-Zellen in Maus Modellen werden vermehrt Untersuchungen zu Geweberesidenten T-Zellen in Geweben des Menschen veröffentlicht. Aktuelle Studien konnten beispielsweise die Relevanz von geweberesidenten Zellen in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn zeigen. Hierbei wurden sowohl Biopsien von Patienten, als auch Gewebe aus verschiedene Mausmodellen untersucht⁷³. Neben Darmerkrankungen wurde auch bei allergischem Asthma eine Beteiligung von geweberesidenten CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen⁷⁴. Neben geweberesidenten T-Zellen ist dieser Art der Zellen im Gewebe auch für andere Immunzellen, wie B-Zellen oder NK-Zellen (natürliche Killerzellen) beschrieben^{75,76}.

4. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten geweberesidente Th17-Zellen in der Niere und in verschiedenen renalen Autoimmunmodellen untersucht werden. In vorausgehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Th17-Zellen eine entscheidende Rolle in der Autoimmunkrankheiten der Niere spielen und zur deren Pathogenese beitragen^{45,54,55,77}. In diesen Studien wurde vor allem das Modell der Nephrotoxischen Nephritis (NTN) verwendet, aber auch das der Experimentellen Autoimmunen Glomerulonephritis (EAG). Im ersten Modell sorgt die Injektion von Antikörpern aus Schafseren, die gegen Strukturen des murinen Nierencortexes gerichtet sind, für die Induktion einer Erkrankung die einer rasch progredienten Glomerulonephritis (RPGN) ähnelt. Im EAG-Modell werden Mäuse mit dem Antigen des Goodpasture-Syndroms ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) wiederholt immunisiert. Daraufhin entwickeln die Mäuse eine starke renale Autoimmunerkrankung mit Beteiligung von B- und T-Zellen. In beiden Modellen konnte gezeigt werden, dass Th17-Zellen eine Rolle in der Autoimmunerkrankungen spielen. Durch eine Infektion mit *Staphylococcus aureus* lassen sich in der Niere große Mengen von Th17-Zellen generieren. Diese Zellen sind über einen langen Zeitraum stabil und zeigen einen Phänotyp von geweberesidenten T-Zellen.

Die Hypothese der Arbeit ist, dass Infektionen oder Entzündungsreaktionen die T-Zellpopulationen in Geweben verändern werden und dass sich diese Veränderungen auf den Verlauf von Autoimmunerkrankungen auswirken. Normale Labormäuse werden unter keimarmen Bedingungen gehalten, sodass nur wenige geweberesidente T-Zellen entstehen. Sie sind daher nur eingeschränkt mit dem Menschen vergleichbar. Durch die gezielte Infektion mit Krankheitserregern wie Staphylokokken oder Listerien können gesunde Mäuse Pathogenen ausgesetzt werden, dies kann zu Veränderungen der T-Zellpopulationen in verschiedenen Geweben führen. Ein Teil der T-Zellen entwickelt sich zu Gedächtniszellen, so dass auch nach der Beseitigung der Krankheitserreger ein verändertes Immunmilieu in den Geweben vorliegt.

In dieser Arbeit soll die Frage beantwortet werden wie sich eine abgeklungene bakterielle Infektion auf Autoimmunerkrankungen auswirkt. Für dieses Projekt sollen Mäuse aus verschiedenen Inzuchtstämmen mit Bakterien (*Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes*) infiziert und die T-Zellantwort auf die Infektion untersucht werden. Neben der akuten T-Zellantwort werden dann auch die Entwicklung und Persistenz der T-Gedächtniszellen in den Geweben analysiert. Anschließend soll die

Frage beantwortet werden, ob durch Bakterien induzierte geweberesidente T-Gedächtniszellen einen Einfluss auf Autoimmunerkrankungen haben und, falls ja, welche Mechanismen dafür verantwortlich sind.

Das langfristige Ziel dieser Untersuchungen ist es ein besseres Verständnis der Rolle geweberesidenten T-Gedächtniszellen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu gewinnen.

5. Ergebnisse

5.1 *Staphylococcus aureus*-Infektionen in der Niere

Unter Laborbedingungen gehaltene Mäuse, sogenannte SPF (*specific pathogen free*) Mäuse, werden unter streng kontrollierten Bedingungen gehalten. Unter diesen Haltungsbedingungen herrscht ein hoher Hygienestatus, sodass die Mäuse vielen natürlich auftretenden Mikroorganismen gar nicht oder nur bedingt ausgesetzt sind. Diese kontrollierten Laborbedingungen führen zu einer besseren Reproduzierbarkeit von Tierersuchen, sie bedeuten aber auch, dass das Immunsystem der Mäuse nicht mit denen von Wildmäusen oder Menschen vergleichbar ist. Menschen und freilaufende Mäuse sind täglich im Kontakt mit Mikroorganismen und haben abhängig vom Alter zahlreiche Infektionen überstanden⁷⁸. Der ständige Kontakt mit Mikroorganismen führt dazu, dass das Immunsystem verändert wird und ein immunologisches Gedächtnis, in Form von bestimmten B- und T-Gedächtniszellen, ausbildet. Diese Gedächtniszellen ermöglichen es auf schon bekannte Pathogene schnell und effektiv zu reagieren. Die Bedeutung einer besonderen Subpopulation der T-Gedächtniszellen, die der geweberesidenten T-Gedächtniszellen, ist nicht vollends geklärt. Auch ihr Einfluss auf andere, von der ursprünglichen Infektion unabhängigen, Erkrankungen, beispielsweise von Autoimmunerkrankungen ist nicht ausreichend erforscht. In der vorliegenden Arbeit soll zunächst die Entstehung der gewebeständigen T-Gedächtniszellen im Rahmen von bakteriellen Infektionsmodellen untersucht werden.

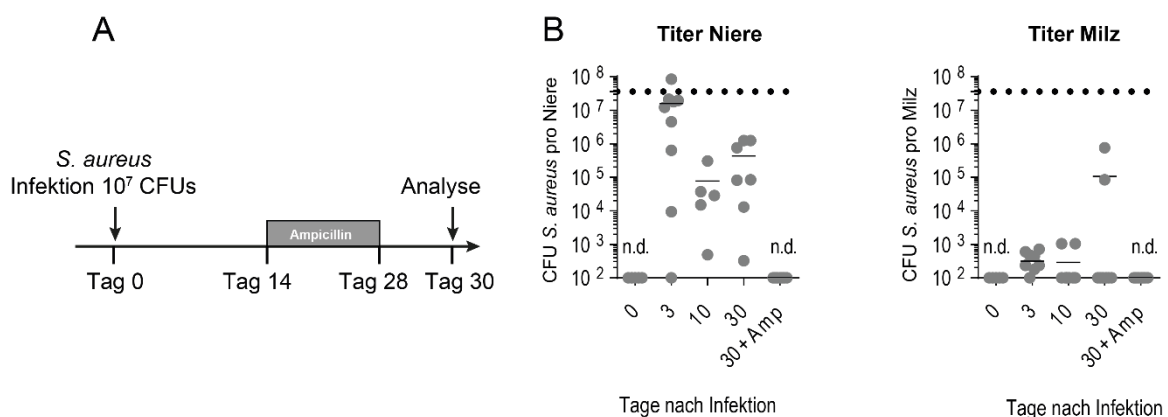


Abbildung 5: *Staphylococcus aureus* Infektionen in Milz und Niere. C57BL/6 Mäuse wurden mit $3,6 \times 10^7$ *S. aureus* intravenös infiziert. Die Analyse der Titer erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. A) Experimenteller Ablauf. B) Bakterielle Titer in Niere und Milz zu angegebenen Zeitpunkten. Die gepunktete Linie zeigt die Infektionsdosis, der Strich zeigt zusätzlich zu den Einzelwerten, den Mittelwert.

Staphylokokken sind stäbchenförmige Gram-positive Bakterien, die häufig als Kommensalen auf der Haut zu finden sind und meist keine gesundheitlichen Probleme verursachen. Eine intravenöse Infektion von Mäusen mit *S. aureus* löst zunächst eine bakterielle Sepsis aus, bei der der gesamte Organismus des Wirts betroffen ist. Nach der intravenösen Applikation von großen Mengen an *S. aureus* ($3,6 \times 10^7$ Koloniebildende Einheiten (CFU; *Colony forming units*)) zeigten sich im zeitlichen Verlauf der Infektion viele Staphylokokken in der Niere (siehe Abb. 5). Drei Tage nach Infektion waren im Durchschnitt noch $1,6 \times 10^7$ CFU vorhanden. Im weiteren Verlauf der Infektion gingen die bakteriellen CFU nach 10 Tagen auf $7,7 \times 10^4$ zurück, stieg dann aber nach 30 Tagen leicht, wieder auf $4,3 \times 10^5$ CFU an. In der Milz, als Referenz für ein sekundäres lymphatisches Organ, waren im Infektionsverlauf nur sehr geringe Mengen an Bakterien aufzufinden. Drei Tage nach Infektion waren im Durchschnitt nur $3,2 \times 10^2$ CFU der Staphylokokken identifiziert worden, nach 10 Tagen waren die Milzen der Mehrheit der Mäuse frei von Staphylokokken, lediglich in zwei Mäusen wurden noch Bakterien detektiert. Am Tag 30 nach der Infektion wiesen ebenfalls nur noch zwei Mäuse eine hohe Bakterienlast ($2,7 \times 10^5$), vergleichbar mit der Niere am selben Tag, auf. Mit der Gabe von Ampicillin (1g/L) im Trinkwasser, konnte in den Mäusen die Infektion geklärt werden, sodass die untersuchten Organe der behandelten Mäuse 30 Tage nach Infektion (2 Wochen davon mit Ampicillinbehandlung) frei von Staphylokokken waren. Auch in histologischen Untersuchungen ließen sich mit einer Gram-Färbung die Gram-positiven Bakterien zeigen (Anhang 10.2 A). Diese Bakterien fanden sich in Abszessen. Die Abszessen im vorliegenden Modell entsprachen dabei den in der Literatur beschriebenen typischen *S. aureus*-Abszessen⁷⁹. Aufgrund der hohen renalen Bakterienlast sowie der histologisch sichtbaren Abszessbildung wurde die Nierenfunktion anhand verschiedener Parameter untersucht. Der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Wert (BUN, engl *blood urea nitrogen*) gibt Aufschluss über die Nierenfunktion, ein erhöhter Blutharnstoff zeigt an, dass die Niere ihre normale Funktion nicht mehr ausüben kann. Bei normaler Funktion wird Harnstoff ausgeschieden, eine eingeschränkte Nierenfunktion kann somit über einen erhöhten BUN-Wert ermittelt werden. Die Mäuse, die eine *S. aureus* -Infektion überstanden haben, zeigten einen marginal erhöhten BUN-Wert im Vergleich zu Kontrollgruppe (Abb. 6), die Erhöhung war allerdings statistisch signifikant. Als weiterer Parameter kann die Menge an Protein, die über den Urin ausgeschieden wird, bestimmt werden. Im gesammelten Urin wird das Albumin, welches unter Normalbedingungen nicht oder

nur in geringen Mengen zu finden ist, bestimmt. Zusätzlich wird Kreatinin bestimmt. Der Quotient aus Albumin und Kreatinin dient ebenfalls als funktionaler Parameter der Niere.

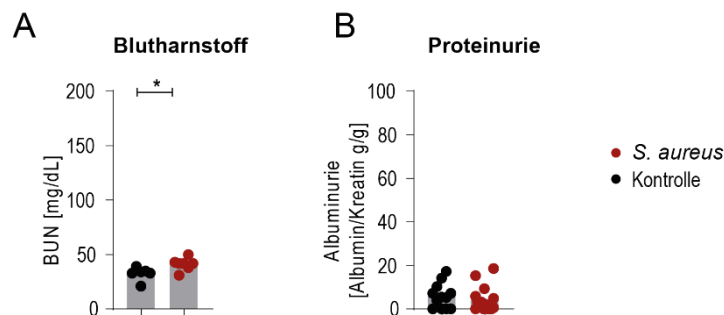


Abbildung 6: Funktionelle Untersuchung der Nieren von *S. aureus* infizierten Mäusen. A) Analyse des Blutharnstoffs in infizierten und Kontrollmäusen 30 Tage nach Infektion. B) Analyse der Proteinurie in gesunden und infizierten Mäusen 60 Tage nach Infektion. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Messwerte. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test. * $p < 0,05$

Nach ausgeheilter *S. aureus* -Infektion war auch die Proteinausscheidung nicht erhöht (Abb.6). Zusätzlich wurden mittels Elektronenmikroskopie (Siehe Anhang 10.2 C) die Blutgefäße in den Glomeruli untersucht, auch diese waren in infizierten Tieren nicht beschädigt und es ließen sich keine Ablagerungen an der glomerulären Basalmembran nachweisen, wie es in anderen postinfektiösen Nierenerkrankungen (Postinfektiöse Glomerulonephritis) der Fall ist⁸⁰. Die histologischen Untersuchungen wurden im Institut für Pathologie des UKEs unter Leitung von Prof. Dr. Thorsten Wiech durchgeführt. Das Nierengewebe wurde auch in der klassischen Histologie (PAS-Färbung) untersucht, hierbei zeigten sich keine veränderten Glomeruli und auch keine Halbmondbildung.

Zusammenfassend zeigt der erste Abschnitt, dass nach intravenöser Infektion mit *S. aureus* vor allem die Niere betroffen ist und hohe Bakterientiter zeigt. Die Nierenfunktion selbst ist durch die Infektion nicht wesentlich beeinträchtigt.

5.1.1 Charakterisierung der T-Zellantwort in der *S. aureus* Infektion

Zur Bekämpfung von Staphylokokken tragen verschiedene Teile des Immunsystems bei. Die T-Zellen des adaptiven Immunsystems sind ebenfalls beteiligt, hierbei besonders ein Subtyp, die Th17-Zellen. In der *S. aureus* Infektion sollten daher auch die T-Zellantwort untersucht werden. Im Verlauf der Infektion konnte gezeigt werden, dass mit fortschreitender Infektion eine Akkumulation bestimmter T-Zelltypen

einhergeht. Es konnte eine Zunahme von Th17-Zellen, charakterisiert durch den Transkriptionsfaktor ROR γ t, mittels intrazellulärer Transkriptionsfaktorfärbung gezeigt werden (Abb. 7). ROR γ t ist der charakteristische Transkriptionsfaktor für Th17-Zellen. Neben der Expression des Transkriptionsfaktors wurden zusätzlich der Marker CD69 und die Lokalisation im Gewebe mittels intravaskulärer CD45 Färbung (siehe 8.2.1.9 Methoden) untersucht. Geweberesidente T-Zellen zeichnen sich durch die Expression von CD69 auf der Oberfläche aus, ebenso ist eine Lokalisation im Gewebe, hier nachgewiesen durch die intravaskuläre Färbung von CD45, charakteristisch für diesen Zelltyp.

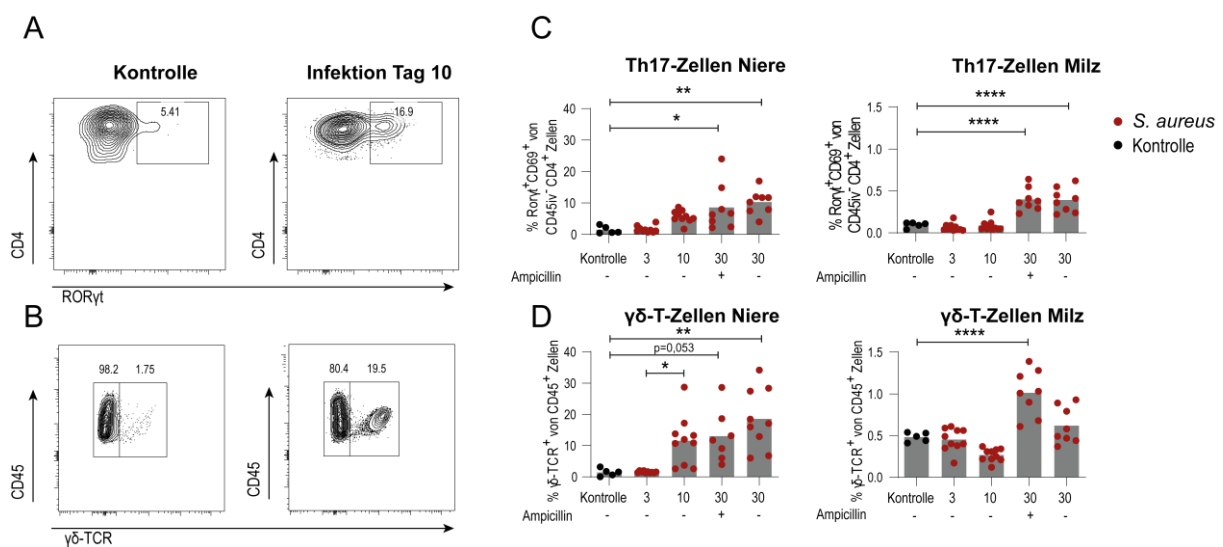


Abbildung 7: Akkumulation von Th17- und $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Niere nach *S. aureus* Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden mit $3,6 \times 10^7$ *S. aureus* i.v. infiziert. Die Analyse der Titer erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. A, B) Exemplarische Konturplots der durchflusszytometrischen Analyse von Leukozyten aus der Niere von Tieren an Tag 10 nach der Infektion bzw. gesunden Kontrollen. C) Quantifizierung von geweberesidenten Th17-Zellen in der Niere und Milz zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten. D) Analyse von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Niere und Milz. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der einzeln dargestellten Messwerte. Für alle statistischen Tests wurde ein *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttest verwendet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; **** $p < 0,00001$

Drei Tage nach Infektion konnte weder in der Niere noch in der Milz erhöhte Frequenzen von Th17-Zellen nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf konnten nach 10 Tagen eine Tendenz im Anstieg der Frequenz der Th17-Zellen gezeigt werden. Nach 30 Tagen waren in der Niere signifikant mehr Th17-Zellen vorhanden, sowohl in Tieren mit Antibiotikabehandlung (Tag 14-28), als auch in unbehandelten Tieren. In der Milz waren im Vergleich zur Kontrollgruppe, an Tag 30 ebenfalls signifikant mehr Th17-Zellen vorhanden, allerdings machen diese lediglich durchschnittlich 0,398% mit Ampicillin-Behandlung bzw. 0,391% ohne Ampicillin-Behandlung der geweberesidenten CD4⁺ T-Zellen aus.

Neben den Th17-Zellen wurden auch die $\gamma\delta$ -T-Zellen untersucht. Diese zeichnen sich durch einen T-Zellrezeptor (TCR, eng. *T cell receptor*) bestehend aus einer γ -Kette und einer δ -Kette aus. Analog zu den Th17-Zellen nahmen auch die Frequenzen der $\gamma\delta$ -T-Zellen deutlich zu. Bereits ab 10 Tagen nach der Infektion waren in der Niere höhere Frequenzen an $\gamma\delta$ -T-Zellen zu beobachten, auch nach 30 Tagen war die Frequenz an $\gamma\delta$ -T-Zellen noch erhöht, dies war von der Antibiotikabehandlung unabhängig (Abb. 7). An Tag 30 waren zum Teil 30% aller Leukozyten $\gamma\delta$ -T-Zellen. In der Milz waren generell weniger $\gamma\delta$ -T-Zellen vorhanden, im Verlauf der Infektion nahm ihre Frequenz leicht zu, allerdings mit höheren Schwankungen innerhalb der untersuchten Mausgruppen (zwischen 0,3 und 1,4% der gesamten Leukozyten).

Neben der Untersuchung der T-Zellen über ihre Transkriptionsfaktoren und den TCR wurden die T-Zellen auch auf ihre Fähigkeit zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen untersucht. Die isolierten Zellen wurden dazu mit PMA und Ionomycin polyklonal stimuliert (siehe Methoden 8.2.2.4) und durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Analyse von Zellen, welche die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-17A (IL-17A) produzieren. Th1-Zellen produzieren hauptsächlich IFN- γ , während Th17-Zellen meist IL-17A produzieren, sodass über die Analyse der Zytokine T-Zellen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können.

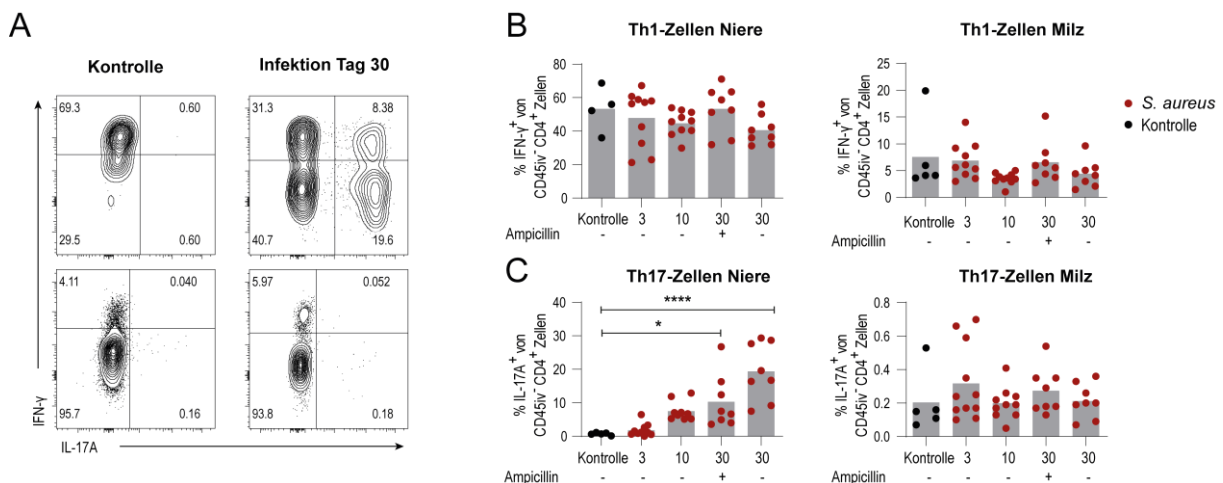


Abbildung 8: Akkumulation von Th17 und gleichbleibende Th1-Zellen in der Niere nach *S. aureus* Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden mit $3,6 \times 10^7$ *S. aureus* i.v. infiziert. Die Analyse der Titer erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten A) Exemplarische Konturplots der durchflusszytometrischen Analyse von Leukozyten aus den Nieren infizierter Tiere (Tag 30) und Kontrollmäusen. B) Quantifizierung von IFN- γ produzierenden Zellen in der Niere und Milz zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten. C) Analyse von IL-17A produzierenden T-Zellen in der Niere und Milz. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der einzeln dargestellten Messwerte. Für alle statistischen Tests wurde ein *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttest verwendet. * $p < 0,05$; **** $p < 0,00001$

Wie in Abb. 8 zu sehen, blieben die Frequenzen für Th1-Zellen relativ konstant im untersuchten Zeitraum nach der Infektion, sowohl in der Niere, als auch in der Milz waren keine signifikanten Veränderungen zu detektieren. Die Frequenz der IL-17A produzierenden Zellen nahm analog zu der Frequenz an ROR γ t positiver Zellen aus Abb. 8 deutlich zu. Drei Tage nach Infektion war noch kein signifikanter Anstieg zu verzeichnen (1,8% IL-17A⁺ Zellen im Vergleich zu 0,71% in der Kontrolle), ab Tag 10 nach der Infektion war die Frequenz mit 7,4% merklich erhöht. Auch nach 30 Tagen war die Anzahl an Th17-Zellen noch deutlich erhöht, 10,2% in den Antibiotika-behandelten Tieren, 19,4% in den Tieren ohne Behandlung. Diese Erhöhung der Frequenz war statistisch signifikant.

Zusätzlich zu einem Infektionszeitraum von 30 Tagen wurden Mäuse auch 120 Tage nach Infektion, ohne Antibiotika, auf ihre T-Zellantwort gegen *Staphylococcus aureus* untersucht.

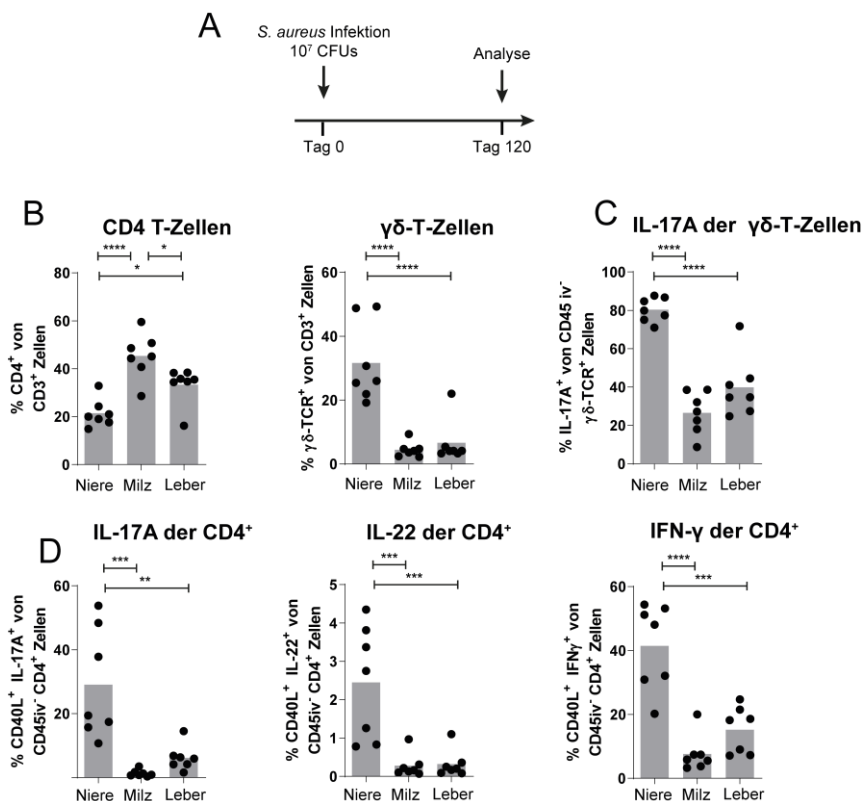


Abbildung 9: Veränderte T-Zellpopulationen nach chronischer *S. aureus* Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden i.v. mit 10⁷ Staphylokokken infiziert. Die Analyse erfolgte 120 Tage nach Infektion A) experimenteller Ablauf B) Frequenz der CD4⁺ T- und γδ-T-Zellen in den untersuchten Organen C) IL-17A Produktion der γδ-T-Zellen D) Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Zellen in den untersuchten Organen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der einzeln dargestellten Messwerte. Für alle statistischen Tests wurde ein one-way-Anova mit Tukey's Posttest verwendet. *p<0,05; **p<0,001, ***p<0,0001, ****p<0,00001

In Abb. 9 zeigt, dass sich die T-Zellsubtypen in den Organen unterscheiden. In der Niere konnte 120 Tage nach der Infektion die geringste Frequenz an CD4⁺ T-Zellen detektiert werden, im Vergleich zu den ebenfalls untersuchten Milzen und Lebern. Im Kontrast dazu waren die $\gamma\delta$ -T-Zellen lediglich in der Niere stark erhöht, durchschnittlich 31,6% aller T-Zellen waren $\gamma\delta$ -T-Zellen, während sich diese Zellen in der Milz auf vergleichbarem Niveau zu gesunden Tieren (Abb. 9) befanden. Die Frequenz der $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Leber war vergleichbar zur Milz. Es wurde in den drei Organen jeweils die Fähigkeit zur Zytokinproduktion untersucht. Hierbei zeigte sich, dass ein sehr hoher Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Niere IL-17A produzieren (ca. 80%), während die $\gamma\delta$ -T-Zellen der Milz und Leber zu einem signifikant geringeren Teil IL-17A positiv waren. In der Niere zeigte sich, wie im Verlauf der früheren Infektion bis Tag 30, eine stark erhöhte Produktion von IL-17A der CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation, die in Milz und Leber nicht im selben Maße zu detektieren war. Für die Frequenz der IFN- γ produzierenden CD4⁺T-Zellen waren vergleichbare Ergebnisse zu den früheren Infektionszeitpunkten zu detektieren, es produzierten signifikant mehr T-Zellen aus der Niere IFN- γ als in der Milz und Leber. IL-22 produzierende CD4⁺ T-Zellen konnten vor allem in der Niere detektiert werden. Durchschnittlich 2,4% der CD4⁺ T-Zellen produzierten IL-22. Dies war signifikant mehr als in der Milz (0,28%) und in der Leber (0,32%). IL-22 wird häufig auch von Th17-Zellen produziert, kann aber auch von denen nach ihnen benannten Th22-Zellen produziert werden. Dem IL-22 werden sowohl pro-inflammatorische, als auch schützende Funktionen für Gewebe zugesprochen⁸¹. Zusätzlich zu den Zytokinen wurde der Aktivierungsmarker CD40L (auch CD154) untersucht, um aktivierte von nicht aktivierten T-Zellen zu unterscheiden⁸².

Zusammenfassend zeigt sich, dass nach Infektionen mit *S. aureus* vor allem in der Niere IL-17A produzierende CD4⁺- und $\gamma\delta$ -T-Zellen induziert werden. Die Zellen sind auch bis 120 Tage in erhöhter Frequenz nachweisbar.

5.1.2 Charakterisierung der Immunantwort in der Niere nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Neben dem Infektionsmodell mit *S. aureus* wurde auch ein weiteres Infektionsmodell untersucht, dass eine andere Art der Immunantwort auslöst. Hierzu wurde das Gram-positive Bakterium *Listeria monocytogenes* verwendet. Die Infektion mit den intrazellulär replizierenden Listerien erfolgte analog zu den Staphylokokken intravenös, allerdings mit geringerer Bakterienzahl (siehe 8.2.1.4 Methoden).

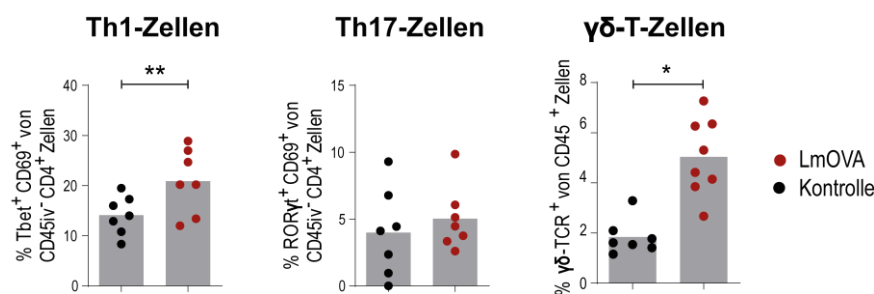


Abbildung 10: T-Zellpopulationen in der Niere nach *Listeria monocytogenes* Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden i.v. mit rekombinant Ovalbumin (LmOVA) exprimierenden Listerien (2×10^4) infiziert und an Tag 9 nach Infektion analysiert. Es werden T-Zellpopulationen in der Niere nach Listerieninfektion gezeigt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der einzelnen gezeigten Messwerte. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

In Abbildung 10. ist die Analyse von CD4⁺ T-Zellen in der Niere, 9 Tage nach Infektion mit Listerien, dargestellt. Hierbei wurde eine Kontrollgruppe mit einer infizierten Gruppe verglichen. Die infizierte Gruppe zeigte signifikant mehr CD4⁺ T-Zellen, die positiv für den Transkriptionsfaktor Tbet waren, als die Kontrollgruppe. Tbet ist als Transkriptionsfaktor der charakteristisch für Th1-Zellen, analog zu RORγt für Th17-Zellen. Es wurde kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der RORγt Expression beobachtet. Zusätzlich wurden γδ-T-Zellen untersucht. Auch in diesem Infektionsmodell war die Frequenz der γδ-T-Zellen in der infizierten Gruppe zu einem frühen Zeitpunkt signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe.

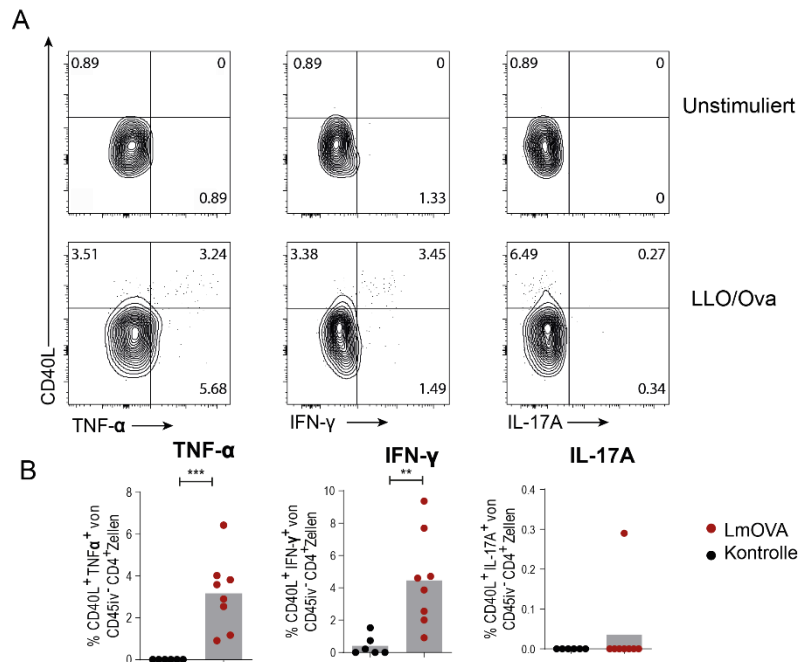


Abbildung 11: Nachweis von listerienspezifischen T-Zellen in der Niere. C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^4 Listerien i.v. infiziert und 9 Tage später spezifisch mit Peptiden von Ovalbumin ²⁵⁷⁻²⁶⁴ und Listeriolysin O¹⁸⁹⁻²⁰⁴ stimuliert. A) Exemplarische Konturplots aus der Durchflusszytometrie stimulierter CD4⁺ T-Zellen B) Quantifizierung der analysierten Zytokine TNF-α, IFN-γ und IL-17A. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert als Balkendiagramm. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test. **p<0,001; ***p<0,0001.

Analog zum Staphylokokken-Infektionsmodell wurde ebenfalls die Zytokinproduktion untersucht. Die isolierten Leukozyten wurden antigenspezifisch mit Peptiden des Listeriolysins O (Aminosäuren (AS) 189-204) und Ovalbumins (AS 257-264) stimuliert. Zellen, die spezifisch für Listerien sind, werden durch diese Stimulation aktiviert. CD8⁺ T-Zellen erkennen das immundominante OVA Peptid (Daten nicht gezeigt), während die CD4⁺ T-Zellen, die spezifisch für Listerien sind, durch das Peptid des Listeriolysins O stimuliert werden. In Abbildung 11. sind die Ergebnisse für die Stimulation der CD4⁺ T-Zellen dargestellt. Für die pro-inflammatorischen Zytokine TNF-α und IFN-γ zeigte sich, dass nur CD4⁺ T-Zellen aus infizierten Tieren in der Lage waren diese nach antigenspezifischer Stimulation zu produzieren, gesunde Tiere dagegen nicht. IL-17A war nach dieser Stimulation kaum detektierbar.

Zusammenfassend zeigt die Infektion mit Listerien, dass auch hier das Immunmilieu in der Niere verändert wurde und T-Gedächtniszellen, die spezifisch für Listerien sind, induziert wurden.

5.1.3 Analyse der Persistenz von *S. aureus* induzierten residenten T-Gedächtniszellen

In den vorherigen Experimenten konnte die massive Akkumulation von Th17-Zellen sowie $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Niere gezeigt werden. Als nächstes sollte untersucht werden, wie lange die Th17- und $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Niere stabil sind. Hierzu wurden transgene Mäuse verwendet, die ubiquitär das Reporterprotein Kaede exprimieren. Wie im Methodenteil (8.2.1.7) beschrieben, ermöglicht es dieses Protein Zellen durch Photokonversion zu markieren, indem das gewünschte Gewebe mit blauem Licht (385 nm) bestrahlt wird. Dadurch ändert sich das emittierte Licht des Fluoreszenzproteins konstitutiv von grün zu rot. In *S. aureus* infizierten Mäuse wurden 60 Tage nach Infektion eine Niere bestrahlt und die Zellen somit durch die Photokonversion markiert. Der Anteil und Phänotyp der konvertierten Zellen wurde dann zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Exemplarische Plots aus der Durchflusszytometrie zeigen in Abb. 12, dass lediglich die bestrahlte Niere an Tag 1 nach der Bestrahlung photokonvertierte, also Kaede-rote, CD4⁺ T-Zellen enthielt. Die anderen untersuchten Organe zeigten keine photokonvertierten Zellen, sodass eine spezifische Analyse dieser Nierenzellen möglich war. Die zweite, unbehandelte Niere, fungierte hier als interne Kontrolle und zeigte ebenfalls keine photokonvertierten Zellen.

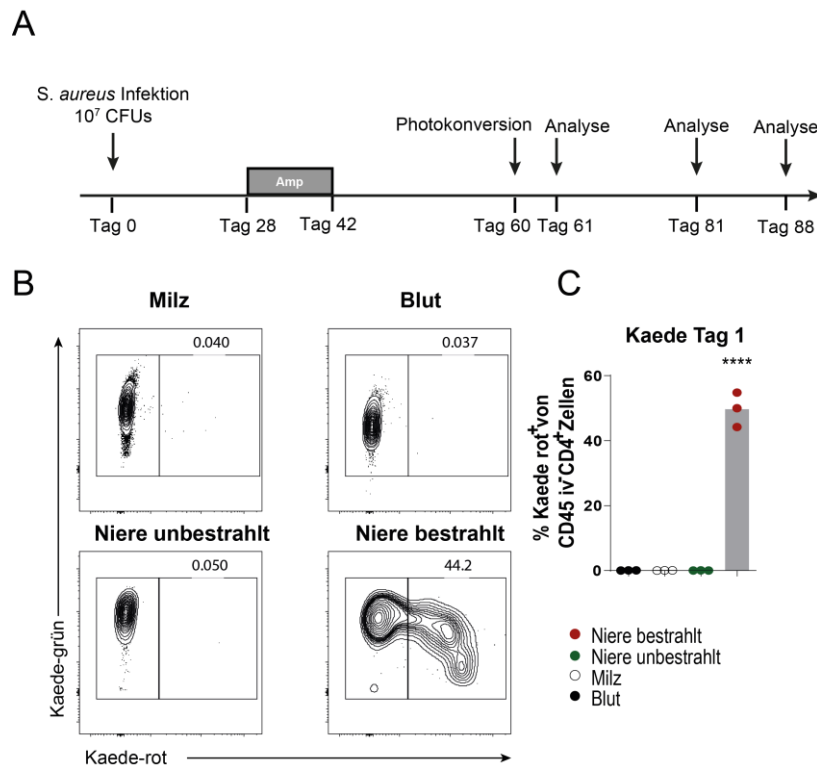


Abbildung 12: Spezifische Markierung der Leukozyten in der Nieren von transgenen Kaede-Mäusen. Kaede-Mäuse wurden mit $3,3 \times 10^7$ *S. aureus* i.v. infiziert. Nach ausgeheilter Infektion und Antibiotikabehandlung (Tag 28-42) wurde eine Niere freigelegt und photokonvertiert (Tag 60 nach Infektion). Die Analyse erfolgte an den Tag 1. A) Experimenteller Ablauf. (Analysen Tag 81 und 88 in Abb. 13). B) Exemplarische durchflusszytometrische Analysen der Photokonversion in Milz, Blut und den Nieren an Tag 1 nach Photokonversion C) Photokonversionsrate an Tag 1. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert als Balkendiagramm. Für die statistische Analyse wurde ein *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttests verwendet. **** $p < 0,00001$

Die Analyse der markierten Zellen zu späteren Zeitpunkten ist in Abb. 13 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass auch drei Wochen nach der Bestrahlung einer Niere eine deutliche photokonvertierte Zellpopulation (Kaede-rot) nachzuweisen war. Andere untersuchte Organe waren weiterhin frei von photokonvertierten Zellen. Die Analyse von markierten Zellen wurde mit der Färbung des Transkriptionsfaktors ROR γ t kombiniert, sodass eine Identifizierung von Th17-Zellen möglich war. Abbildung 13 zeigt, dass sowohl in den Kaede-roten, als auch in den Kaede-grünen Zellen ROR γ t positive Zellen identifiziert werden konnten. Durch die zusätzliche Analyse des Markers für geweberesidente Zellen, CD69, zeigte sich, dass unter den Kaede-roten Zellen tendenziell mehr residente Th17-Zellen (CD69⁺ ROR γ t⁺) vorhanden sind, als unter den Kaede-grünen Zellen. Die Analyse der Th17-Zellen, die negativ für CD69 waren, ergab ebenfalls eine Tendenz zu mehr Th17-Zellen in der photokonvertierten Population.

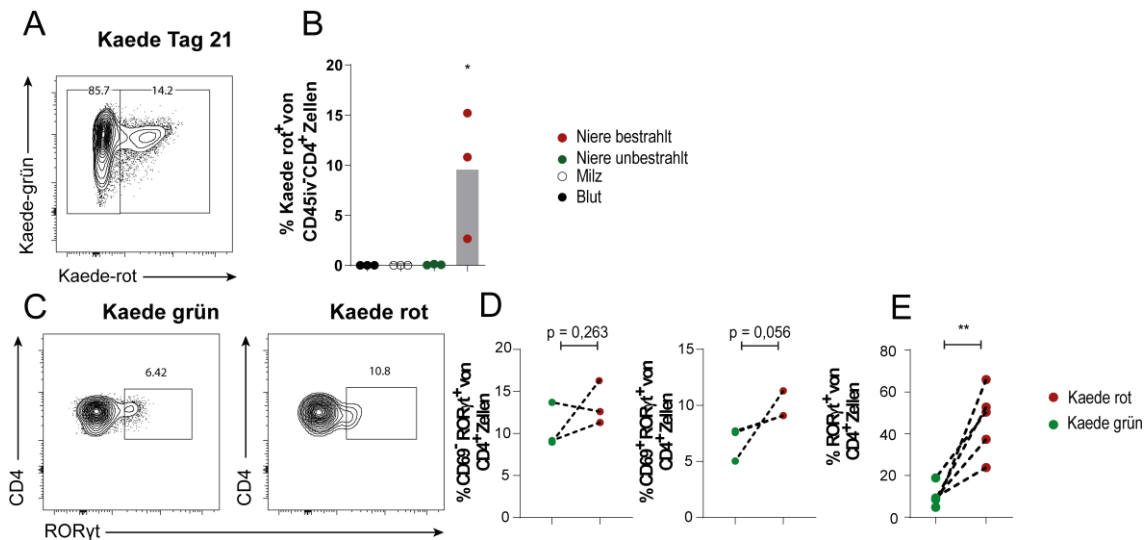


Abbildung 13: Persistenz der durch *S. aureus* induzierten Th17-Zellen in der Niere. Kaede-Mäuse wurden mit $3,3 \times 10^7$ *S. aureus* i.v. infiziert, nach ausgeheilter Infektion und Antibiotikabehandlung (Tag 28-42) ist eine Niere freigelegt und photokonvertiert worden (Tag 60 nach Infektion). Die Analyse erfolgte an Tag 81 und 88 nach Infektion. A) Darstellung der photokonvertierten Zellen 21 Tage nach Photokonversion. B) Quantifizierung der Photokonversionsrate in den untersuchten Organen. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert als Balkendiagramm. C) Exemplarische Darstellung der RORyt Färbung von CD4⁺ T-Zellen in der Kaede-rot bzw. grünen Population. D) Quantifizierung der RORyt⁺ CD69⁺ Population der CD4⁺ T-Zellen. 21 Tage nach Photokonversion. E) Analyse der RORyt⁺ Zellen 28 Tage nach Photokonversion. Es wurden je nach Anzahl der Versuchsgruppen *one-way-Anova* mit *Tukey's Posttest* (B) bzw. ein *t-Test* verwendet (D, E). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Eine Kohorte wurde vier Wochen nach Bestrahlung untersucht (Abb. 13 E), hierbei zeigte sich, dass unter den Kaede-roten Zellen, die sich mindestens 4 Wochen in der Niere befanden, signifikant mehr RORyt⁺ Th17-Zellen waren als unter den Kaede-grünen Zellen. Zusätzlich zu der Persistenz der CD4⁺ T-Zellen wurde auch die Persistenz der $\gamma\delta$ -T-Zellen untersucht.

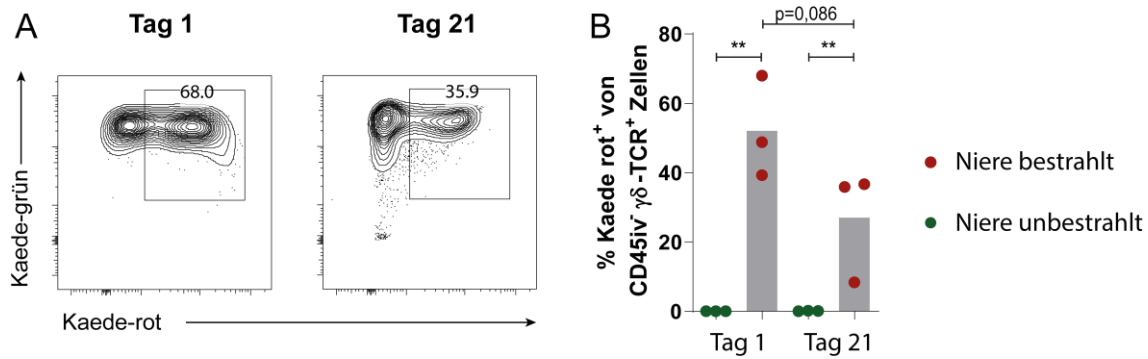


Abbildung 14: Persistenz der $\gamma\delta$ -T-Zellen nach *S. aureus* Infektion Kaede-Mäuse wurden mit $3,3 \times 10^7$ *S. aureus* i.v. infiziert, nach ausgeheilter Infektion (Ampicillin Tag 28-42) ist eine Niere freigelegt und photokonvertiert worden (Tag 60 nach Infektion). Die Analyse erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. A) Darstellung der photokonvertierten $\gamma\delta$ -T-Zellen 1 bzw. 21 Tage nach Photokonversion B) Quantifizierung der photokonvertierten Zellen in der bestrahlten bzw. der nicht bestrahlten Niere. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert als Balkendiagramm. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines *one-way-Anova* mit *Tukey's Posttest* (B). ** $<0,001$.

In Abb. 14 sind exemplarische Plots der renalen $\gamma\delta$ -T-Zellen an den Tagen 1 und 21 nach Photokonversion abgebildet. Die Frequenz der photokonvertierten Zellen war zu beiden Zeitpunkten im Vergleich zur internen Kontrolle, der nicht bestrahlten Niere, signifikant erhöht und nahm nach 21 Tage ab, allerdings war diese Abnahme nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse des ersten Abschnitts, dass bakterielle Infektionen dazu beitragen das Repertoire an renalen Immunzellen, hier der T-Zellen, maßgeblich zu verändern. Im Falle der *S. aureus* Infektion, werden Th17-Zellen induziert, die mit den hier gezeigten Methoden über längere Zeit stabil in den Geweben verbleiben. In vergleichbaren Maßen ist dies auch für renale $\gamma\delta$ -T-Zellen zutreffend, die ebenfalls in hoher Frequenz induziert werden und relativ stabil sind. Beide Zelltypen sind in der Lage nach Stimulation IL-17A zu produzieren. Die Infektion mit Listerien verändert die Zusammensetzung der CD4⁺ T-Zellen in der Niere ebenfalls, allerdings nicht im gleichen Maße wie die Infektion mit *Staphylococcus aureus*.

5.2 Der Einfluss vorausgehender bakterieller Infektionen auf renale Autoimmunerkrankungen

Im folgenden Abschnitt wurden die aus 5.1 beschriebenen bakteriellen Infektionsmodelle mit Modellen für Autoimmunerkrankungen der Niere kombiniert, um den Einfluss der veränderten T-Zellpopulationen in den entsprechenden Geweben auf den Verlauf einer Autoimmunerkrankung zu untersuchen.

5.2.1 Krankheitsverlauf der Glomerulonephritis nach vorheriger *L. monocytogenes* Infektion

Zunächst wurden C57BL/6 Mäuse wie in 8.2.1.4 beschrieben mit Listerien (2×10^4 , LmOVA) infiziert. In C57BL/6 Mäusen führt eine Infektion mit diesem Stamm und der verwendeten Dosis zu einer transienten Infektion, die innerhalb von 10-14 Tagen komplett geklärt wird und zum Zeitpunkt der Autoimmunerkrankung vollständig ausgeheilt ist (Abb. 15). Eine Glomerulonephritiden sind Autoimmunerkrankungen, die zu einer Schädigung der Glomeruli führen. Hierbei ist ein charakteristisches Merkmal die Bildung von halbmondförmigen Entzündungen in den Glomeruli (Abb.20), die durch Proliferation und Infiltration von Zellen entstehen. Die Erkrankung wird daher auch als halbmondförmige oder engl. *crescentic* Glomerulonephritis (cGN) bezeichnet.

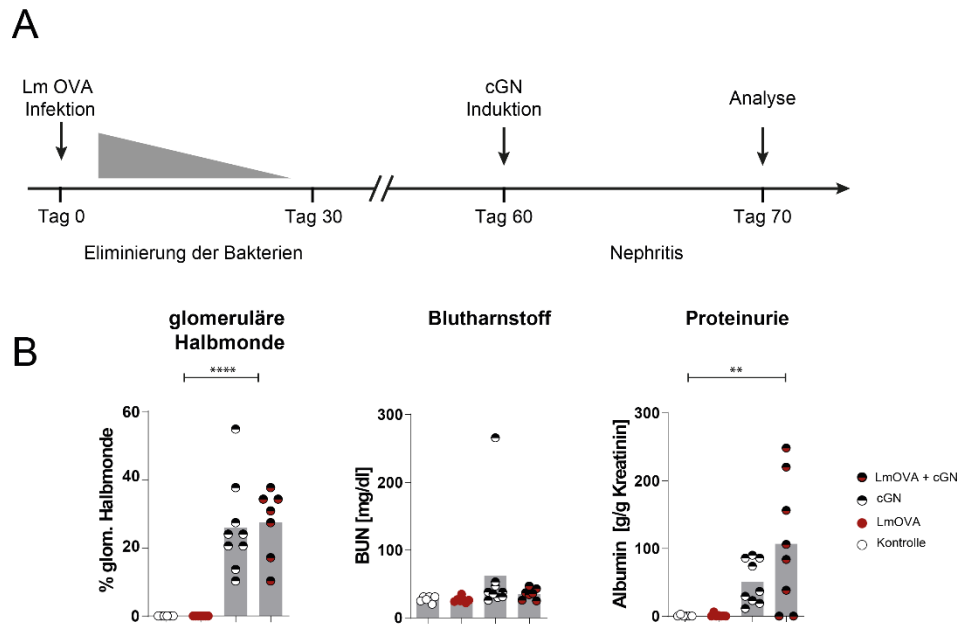


Abbildung 15: Der Einfluss einer vorherigen Infektion mit *Listeria monocytogenes* auf eine nachfolgende cGN. C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^4 LmOVA infiziert, 60 Tage nach der Infektion wurde die cGN durch nephrotoxisches Schafserum induziert. Die Analyse erfolgte 10 Tage nach cGN Induktion. A) Experimenteller Ablauf. B) Quantifizierung der glomerulären Halbmonde, des Blutharnstoffs sowie der Proteinurie an Tag 9 der cGN. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert als Balkendiagramm. Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's Posttest* statistisch analysiert. ** $p < 0,001$, **** $p < 0,00001$

In Abb. 15 sind die klinischen Parameter sichtbar, die einen Aufschluss über die Schwere der Erkrankung geben. Die glomerulären Halbmonde wurden histologisch analysiert und quantifiziert. Abb. 15. B zeigt, dass die Mausgruppen, in denen die Nephritis induziert wurde eine signifikant erhöhte Menge an Halbmonden hatten, es aber keinen Unterschied machte, ob die Mäuse zuvor mit Listerien infiziert waren (durchschnittlich 27% Glomeruli mit Halbmonden) oder nicht (25%). Mäuse, die lediglich mit Listerien infiziert waren zeigten keinen Unterschied im Vergleich zu gänzlich unbehandelten Kontrollen. Für die Proteinurie der Mäuse mit induzierter cGN ergab sich eine Tendenz ($p=0,18$) zu erhöhten Werten der zuvor infizierten Mäuse im Vergleich zur Gruppe ohne vorherige Infektion. Der Blutharnstoff (BUN) war in keiner der analysierten Gruppen signifikant erhöht.

5.2.2 Renale T-Zellantwort während der cGN nach vorheriger *L. monocytogenes* Infektion

Im Folgenden wurde die T-Zellantwort während der cGN untersucht und mit der von Mäusen verglichen, die zuvor eine Listerieninfektion überstanden hatten. Abb. 16 zeigt erneut exemplarisch die Expression von CD69 und des Transkriptionsfaktors ROR γ t in CD4⁺ T-Zellen als Indikator für geweberesidente Th17-Zellen in den jeweiligen Versuchsgruppen in der Milz und in der Niere. Die Frequenz der CD4⁺ T-Zellen stieg in den Gruppen mit induzierter cGN in der Niere leicht aber nicht signifikant an, in der Milz blieb die Frequenz in allen Versuchsgruppen auf vergleichbarem Niveau.

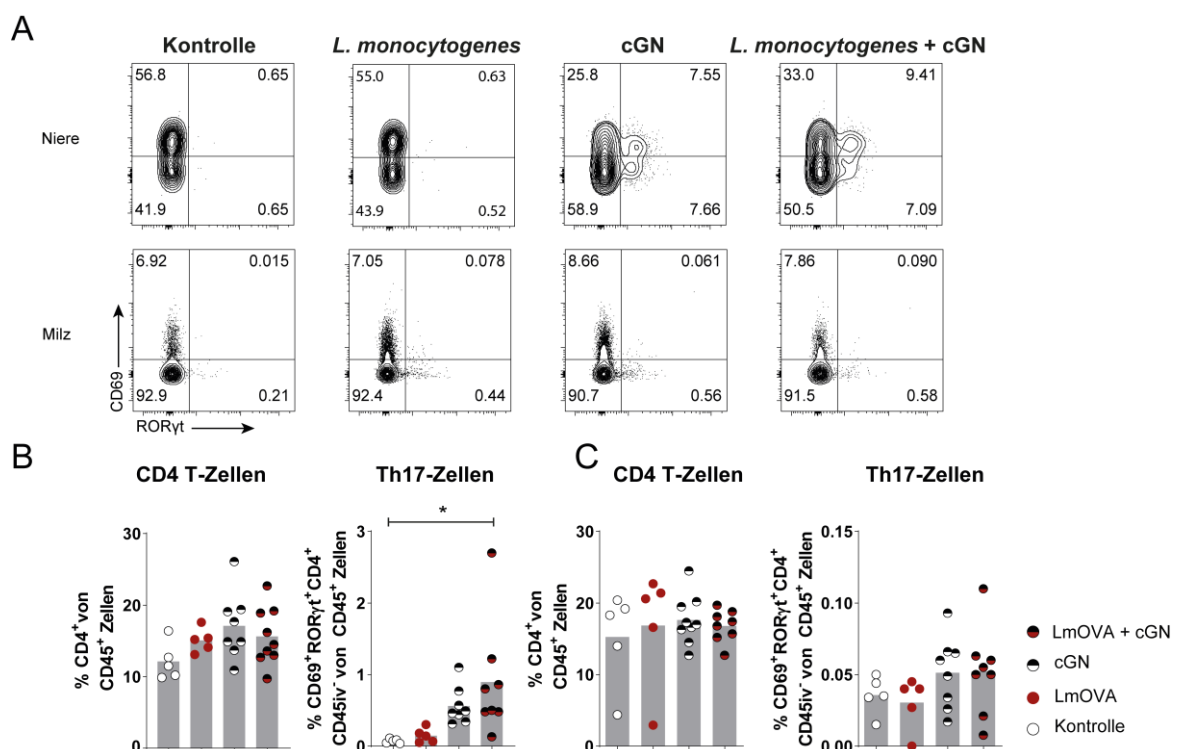


Abbildung 16: Analyse der T-Zellpopulationen in der cGN nach Listerieninfektion. C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^4 LmOVA infiziert, 2 Monate nach Infektion wurde die cGN durch nephrotoxisches Schafserum induziert. Die Analyse erfolgte 10 Tage nach cGN Induktion. A) Repräsentative Darstellung der CD69 und ROR γ t Expression in CD4⁺ T-Zellen aus Niere und Milz in den jeweiligen Versuchsgruppen. Quantifizierung der CD4⁺ T-Zellen und der geweberesidenten Th17-Zellen in der Niere (B) und Milz (C). Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert als Balkendiagramm. Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttest statistisch analysiert. * $p < 0,05$.

Die Analyse der Expression des Transkriptionsfaktors (Abb. 16) zeigte eine erhöhte Frequenz an residenten Th17-Zellen, in beiden Mausgruppen in denen die cGN induziert wurde. In der Niere fand sich eine leichte Tendenz zu einer erhöhten Frequenz an ROR γ t⁺ T-Zellen in der Gruppe mit Listerieninfektion und cGN, aber kein signifikanter Unterschied zur cGN Gruppe ohne Infektion. In der Milz wurde dieselbe Tendenz beobachtet.

Neben den Transkriptionsfaktoren wurde auch die Zytokinproduktion nach antigenspezifischer Stimulation mit LLO- und OVA-Peptiden analysiert.

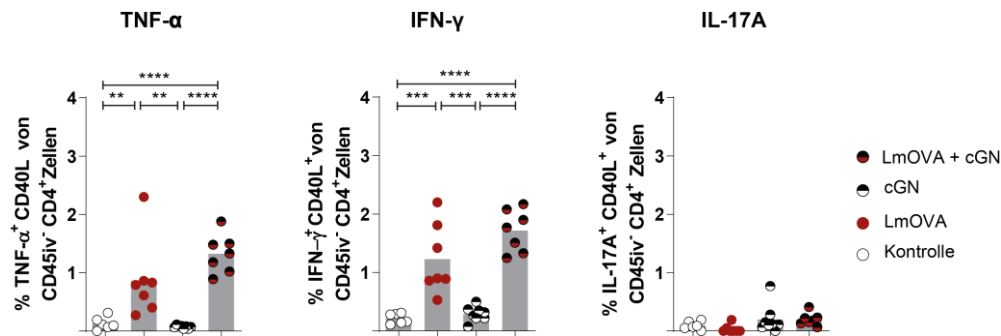


Abbildung 17: Charakterisierung der T-Zellantwort in der cGN nach vorheriger Listerieninfektion. C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^4 LmOVA infiziert, zwei Monate nach der Infektion wurde die cGN durch nephrotoxisches Schafserum induziert. Die Analyse erfolgte 10 Tage nach cGN Induktion. Die Graphen zeigen die Zytokinproduktion der durch LLO stimulierten Leukozyten aus der Niere. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert als Balkendiagramm. Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's Posttest* statistisch analysiert, **p<0,001, ***p<0,0001, ****p<0,00001.

Nach antigenspezifischer Stimulation waren, wie erwartet, nur in den zuvor infizierten Mausgruppen zytokinproduzierende Zellen nachzuweisen. Für TNF-α und IFN-γ bestand eine leichte Tendenz zu einer erhöhten Produktion in der LmOVA + cGN Gruppe im Vergleich zur reinen LmOVA Gruppe, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant (TNF-α: p= 0,13, IFN-γ: p= 0,08). IL-17A produzierende Zellen konnten nach Peptidstimulation nicht nachgewiesen werden (Abb. 17).

Sowohl der Krankheitsverlauf der induzierten Glomerulonephritis, als auch die T-Zellantwort waren nicht in signifikanter Weise von einer zuvor überstandenen Listerieninfektion beeinflusst.

5.2.3 Der Einfluss einer vorhergehenden *S. aureus* Infektion auf die cGN

Weitergehend wurde der Einfluss einer Infektion mit *S. aureus* auf den anschließenden Verlauf einer renalen Autoimmunerkrankung analysiert. Hierzu wurden die Mäuse, analog zu 5.1 mit Staphylokokken statt Listerien infiziert und zunächst nicht antibiotisch behandelt. In einer Kohorte wurde dann an Tag 60 nach der Infektion eine cGN induziert. In Abb. 18A ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt und die analysierten klinischen Parameter aufgelistet.

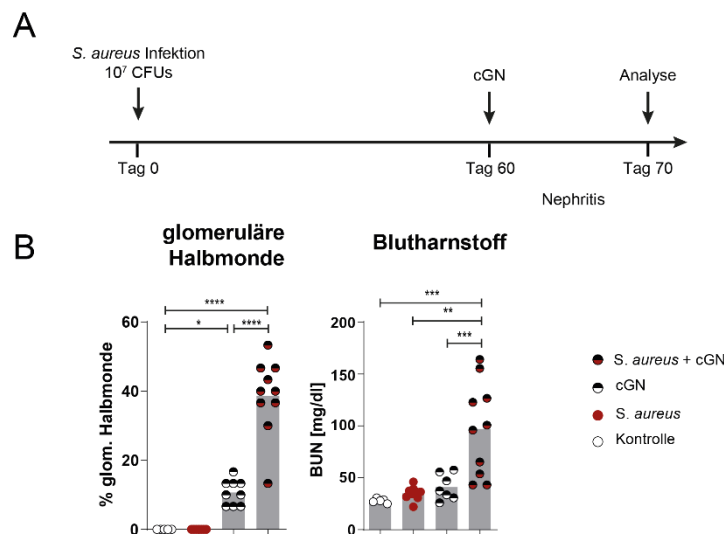


Abbildung 18: Der Einfluss einer vorherigen Infektion mit *Staphylococcus aureus* auf den Verlauf der Glomerulonephritis. C57BL/6 Mäuse wurden intravenös mit 5×10^7 *S. aureus* infiziert, 60 Tage später erfolgte die Induktion der cGN. A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. B) Quantifizierung der glomerulären Halbmonde und des Blutharnstoffs. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert als Balkendiagramm. Die Experimente wurden mittels one-way-Anova mit Tukey's Posttest statistisch analysiert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, **** $p < 0,00001$

In der *S. aureus* - und der cGN-Versuchsgruppe konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle hinsichtlich des Blutharnstoffs festgestellt werden. *S. aureus* -infizierte Tiere zeigten weiterhin keine glomerulären Halbmonde. In den Tieren mit cGN waren im Durchschnitt 10% der Glomeruli mit Halbmonden belastet (Abb. 18B). Infizierte Tiere, in denen nach Infektion die cGN induziert wurde, zeigten hingegen stark erhöhte Werte für den Blutharnstoff, die sich signifikant zu allen anderen Gruppen unterschieden. Auch die Frequenz der Glomeruli mit Halbmonden (durchschnittlich 38%) war signifikant erhöht. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sich nach über 60 Tagen noch lebende Staphylokokken in den Geweben befanden und somit eine chronische Infektion entstanden war, wurde in weiteren Experimenten ein Behandlungsschritt mit Ampicillin für 2 Wochen durchgeführt (Abb. 19A). Wie bereits

in Abschnitt 5.1.1 gezeigt wurde, führt diese Behandlung zur vollständigen Klärung der *S. aureus* Infektion.

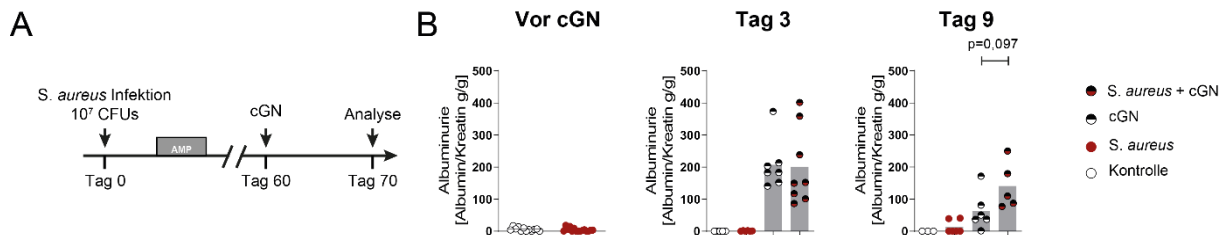


Abbildung 19: Der Einfluss einer vorherigen Infektion mit *Staphylococcus aureus* auf den Verlauf der Glomerulonephritis. C57BL/6 Mäuse wurden intravenös mit 5×10^7 *S. aureus* infiziert, von Tag 28-42 mit Ampicillin behandelt und nach 60 Tagen erfolgte die Induktion der cGN. Die Analyse erfolgte 10 Tage nach cGN Induktion (A). B) Analyse der Proteinurie in den Versuchsgruppen, vor cGN sowie an Tag3 und Tag 9 nach Induktion der cGN. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert als Balkendiagramm. Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttest statistisch analysiert.

Es wurde vor der Induktion der cGN die Proteinurie der Mäuse (Abb. 19 B) untersucht, nach *S. aureus* Infektion zeigten die zuvor infizierten Mäuse, keine erhöhte Proteinausscheidung über den Urin. Drei Tage nach Induktion der Nephritis konnte in den entsprechenden Mausgruppen eine starke Proteinurie, unabhängig von einer vorherigen Infektion, nachgewiesen werden. An Tag 9 der Nephritis gab es eine Tendenz ($p=0,09$) zu einer verstärkten Proteinausscheidung in den Mäusen, die vor der cGN Induktion mit Staphylokokken infiziert waren.

Wie in den Versuchen mit Listerieninfektion und anschließender cGN wurden in diesen Experimenten glomeruläre Halbmonde in der histologischen Untersuchung quantifiziert. In Abb. 20 sind exemplarisch Glomeruli mit Halbmonden abgebildet. Die Quantifizierung, zeigte, dass Mäuse erneut signifikant mehr Glomeruli mit Halbmonden aufwiesen, wenn sie zuvor mit *S. aureus* infiziert waren, auch wenn die Infektion nach Behandlung mit Ampicillin ausgeheilt war.

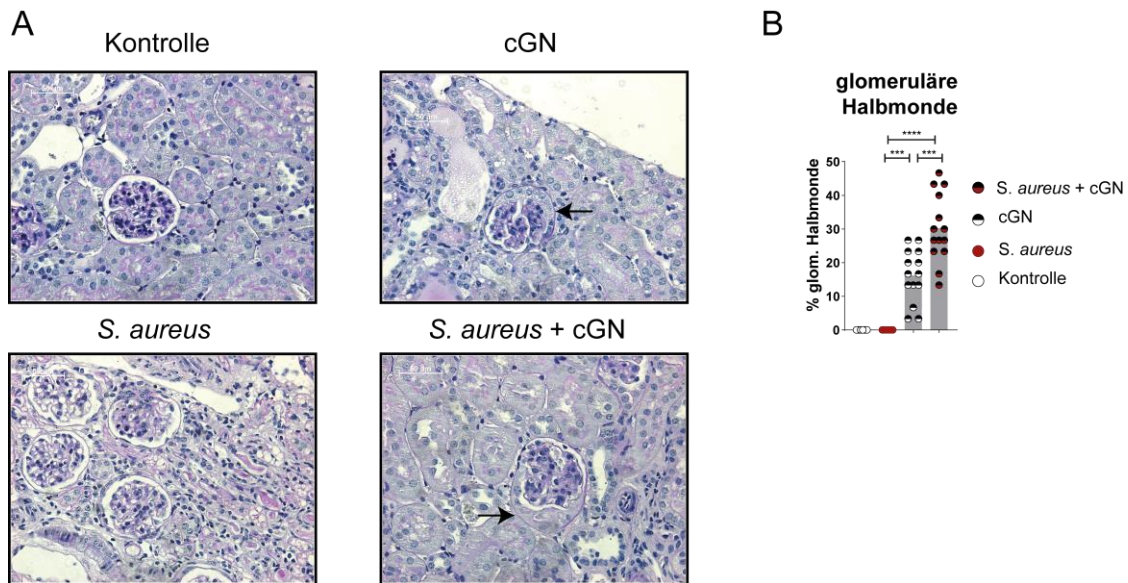


Abbildung 20: Histologische Untersuchungen von Mäusen mit *S. aureus* infizierten Mäusen in der cGN. C57BL/6 Mäuse wurden intravenös mit 5×10^7 *S. aureus* infiziert, von Tag 28-42 mit Ampicillin behandelt und nach 60 Tagen erfolgte die Induktion der cGN. Die Analyse erfolgte 10 Tage nach cGN Induktion. A) Exemplarische histologische Abbildungen von Glomeruli aus den Mäusen der entsprechenden Versuchsgruppen (PAS-Färbung, 40x Vergrößerung) B) Quantifizierung der glomerulären Halbmonde (Schwarzen Pfeil in A). Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert als Balkendiagramm. Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttest statistisch analysiert. *** $p < 0,0001$.

Zusätzlich zu den Untersuchungen der klinischen und histologischen Parameter wurde die T-Zellantwort in Milz und Niere analysiert. Abbildung 21 zeigt exemplarisch durchflusszytometrische Analysen mit der Färbung von CD69 und des Transkriptionsfaktors ROR γ t in den jeweils untersuchten Versuchsgruppen. Die Quantifizierung dieser Daten (Abb. 21) ergab, dass die Mäuse mit cGN und vorheriger Infektion, eine signifikant höhere Frequenz an residenten Th17-Zellen (CD69⁺ CD45^{iv} ROR γ t⁺) in der Niere hatten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe und zur cGN Gruppe ohne Nephritis. Mäuse mit *S. aureus* Infektion ohne cGN hatten vergleichbare Mengen an renalen Th17-Zellen wie die cGN Gruppe. In der Milz zeigten sich dagegen sogar verringerte Frequenzen an residenten Th17-Zellen in den Gruppen mit induzierter Nephritis im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Präsenz von residenten Th17-Zellen in der Niere korreliert mit glomerulären Halbmonden (alle Gruppen mit cGN, auch *S. aureus* + cGN), so ließ sich eine positive Beziehung der beiden Parameter mit einem p-Wert von 0,0047 ermitteln (Abb. 21).

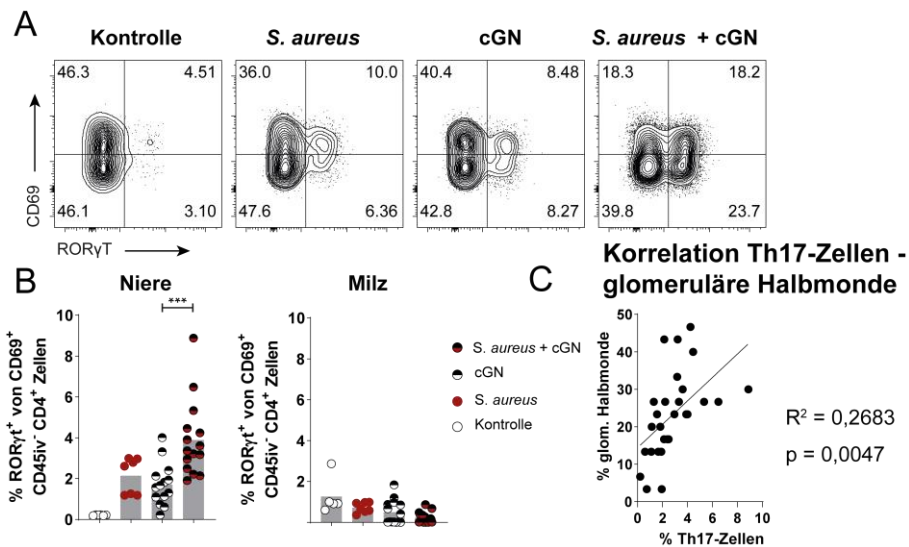


Abbildung 21: Der Einfluss einer vorherigen Infektion mit *Staphylococcus aureus* auf die T-Zellpopulationen in der Glomerulonephritis. C57BL/6 Mäuse wurden intravenös mit 5×10^7 *S. aureus* infiziert, von Tag 28-42 mit Ampicillin behandelt und nach 60 Tagen erfolgte die Induktion der cGN. Die Analyse fand 10 Tage nach cGN Induktion statt. A) Exemplarische Konturplots von CD4⁺ T-Zellen, analysiert wurden die Marker RORγT und CD69. B) Quantifizierung der residenten Th17-Zellen in Milz und Niere. C) Korrelation von Th17-Zellen mit glomerulären Halbmonden (Lineare Regression). Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert als Balkendiagramm. Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttest statistisch analysiert. *** $p < 0,0001$.

Zusätzlich wurden Leukozyten aus Milz und Niere der entsprechenden Mäuse erneut polyklonal stimuliert und ihre Fähigkeit zur Produktion von Zytokinen analysiert. Abb. 22 zeigt exemplarisch CD4⁺T-Zellen, die IL-17A oder IFN-γ produzieren. Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Mäuse mit cGN und der mit *S. aureus* Infektion + cGN gezeigt werden. In letzterer waren im Durchschnitt 10% aller T-Zellen positiv für IL-17A, während die Gruppe nur mit der cGN durchschnittlich 4% IL-17A produzierende Th17-Zellen hatte. Die Gruppe mit überstandener Infektion hat ebenfalls erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrolle (5% vs. 0,6%), der Unterschied war aber nicht statistisch signifikant.

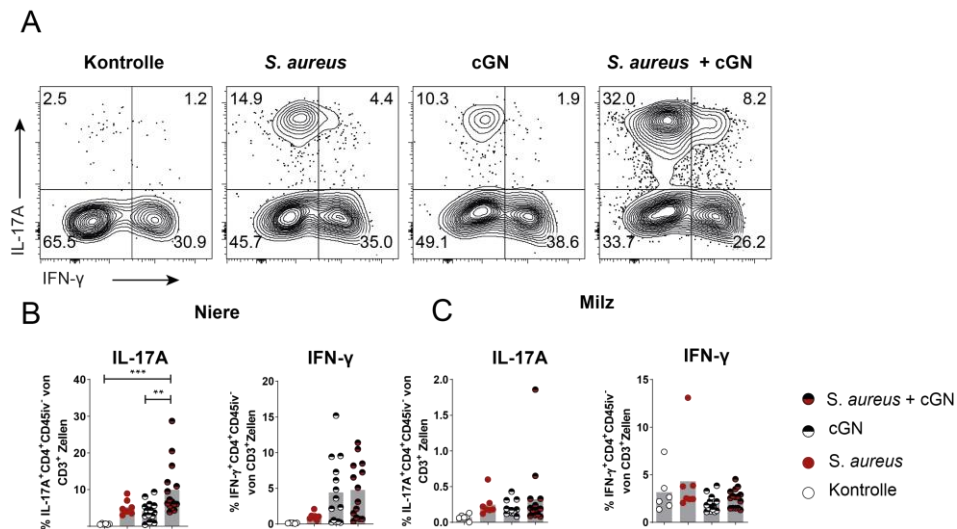


Abbildung 22: Der Einfluss einer vorherigen Infektion mit *Staphylococcus aureus* auf die T-Zellantwort in der Glomerulonephritis. C57BL/6 Mäuse wurden intravenös mit 5×10^7 *S. aureus* infiziert, von Tag 28-42 mit Ampicillin behandelt und nach 60 Tagen erfolgte die Induktion der cGN. Die Analyse erfolgte 10 Tage nach cGN Induktion. Nach Isolation der Leukozyten wurden die Zellen unspezifisch mit PMA und Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A stimuliert. A) Exemplarische Konturplots von CD4⁺ Zellen, analysiert wurden die Marker IFN-γ und IL-17A. Auswertung der IL-17A oder IFN-γ produzierenden Zellen in Niere (B) oder Milz (C). Die Balken in den Diagrammen repräsentieren den Mittelwert. Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttest statistisch analysiert. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

In den Nieren aller behandelten Gruppen waren tendenziell höhere Frequenzen an IFN-γ⁺ Th1-Zellen zu beobachten als in der Kontrollgruppe. Insbesondere die beiden Gruppen mit induzierter cGN zeigten höhere Werte. In der Milz (Abb. 22 C) war in den behandelten Tieren ein leichter, nicht signifikanter, Anstieg der IL-17A produzierenden Th17-Zellen zu beobachten, allerdings war die Frequenz der IL-17A produzierenden Zellen mit 0,07% in der Kontrollgruppe und 0,19%-0,32% in den behandelten deutlich geringer als in der Niere.

Die Analyse der Zytokinproduktion nach polyklonaler Stimulation zeigt nur das Potential, nicht aber die tatsächliche Zytokinproduktion *in vivo* an. Um das Ausmaß der Zytokinproduktion in der Niere zu untersuchen wurde das Expressionslevel verschiedener relevanter Gene mittels quantitativer *real-time* PCR (qPCR) untersucht (siehe Methoden 8.2.3.3). In Abbildung 23 sind die Expressionslevel der mRNAs von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und auch des Transkriptionsfaktors Rorc (kodiert für RORγt) dargestellt. Für das *Il17a* (kodiert für IL-17A) konnte ein signifikanter Anstieg der mRNA in beiden Gruppen mit induzierter Glomerulonephritis detektiert werden. Untereinander waren beide Versuchsgruppen mit cGN nicht signifikant unterschiedlich.

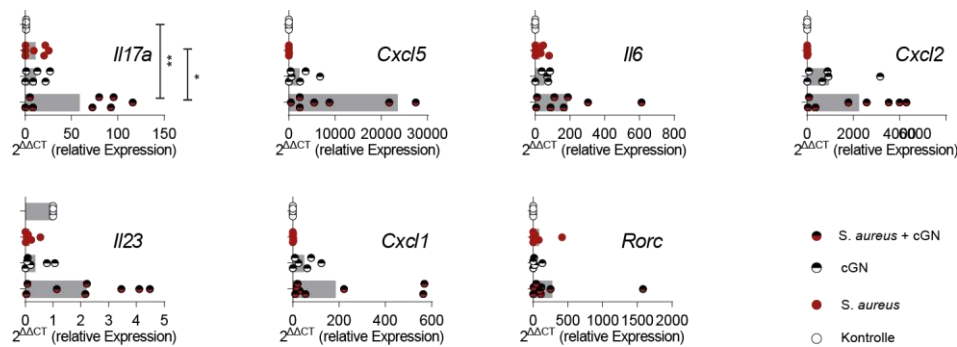


Abbildung 23: Genexpressionsanalysen von in der cGN relevanten Genen nach vorheriger *S. aureus* Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden intravenös mit 5×10^7 *S. aureus* infiziert, von Tag 28-42 mit Ampicillin behandelt und nach 60 Tagen erfolgte die Induktion der cGN. Die Analyse erfolgte 10 Tage nach cGN Induktion. Die RNA wurde aus den Nieren isoliert und in cDNA transkribiert. Dargestellt sind die jeweils in der cGN relevanten Gene als x-fache Expression zu den Tieren der Kontrollgruppe. Das Housekeeping Gen zu Normalisierung war die 18S rRNA. Angegeben sind die Expressionslevel der Einzelwerte und der Mittelwert als Balken. Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttest statistisch analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Für die analysierten mRNAs der Chemokine *Cxcl1* (kodiert für CXCL1), *Cxcl2* (kodiert für CXCL2) und *Cxcl5* (kodiert für CXCL5) konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden, allerdings eine deutliche Tendenz, dass die Chemokine in den Versuchsgruppen mit cGN höher als in den anderen beiden exprimiert wurden. Die Versuchsgruppe cGN + *S. aureus* war dabei stets höher als die reine cGN Gruppe. Für das *Il6* (kodiert für IL-6) zeigte sich ein vergleichbares Muster. Das *Il23* (kodiert für IL-23), war ebenfalls in der cGN + *S. aureus* am stärksten exprimiert. In den Gruppen mit infizierten Mäusen und der cGN Gruppe war es im Vergleich zur Kontrollgruppe, die als Referenz genutzt wurde, sogar herunterreguliert. Die Expression der mRNA von *Rorc* war in allen Gruppen tendenziell höher exprimiert als in der Kontrolle.

Zusammenfassend zeigte sich, dass auch die Expressionslevel von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in den Gruppen mit cGN und *S. aureus* + cGN erhöht waren.

Anschließend sollte analysiert werden, ob die durch die Infektion mit *S. aureus* induzierten Nieren-residenten Th17-Zellen im Verlauf der Glomerulonephritis tatsächlich IL-17A produzieren. Im verwendeten Modell der induzierten cGN findet eine Migration von Th17-Zellen unter anderem aus dem Dünndarm in die Niere statt, diese beginnt 4-5 Tage nach Induktion³⁸. Um die Beteiligung der bereits persistierenden Th17-Zellen nachzuweisen, wurden erneut Kaede-Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden analog zu bisherigen Experimenten infiziert, mit Antibiotika behandelt und nach 60 Tagen wurde die cGN induziert (Abb.24).

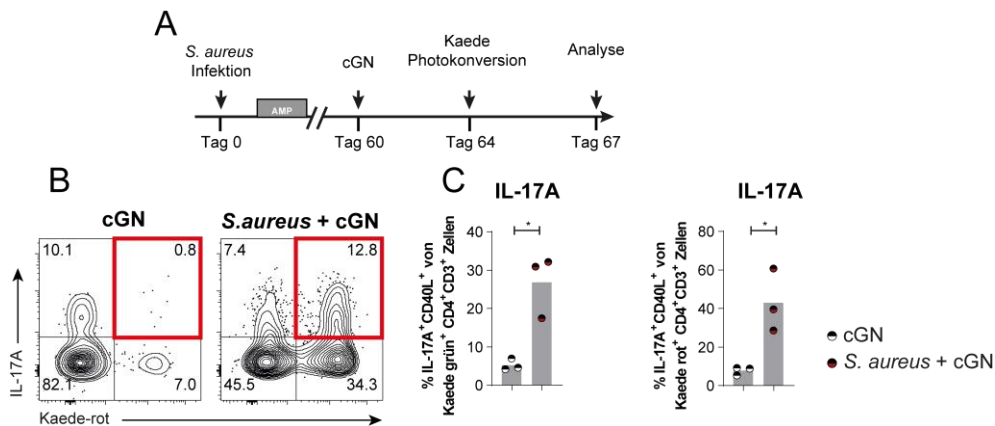


Abbildung 24: Analyse der Lokalisierung der IL-17A produzierenden Zellen in der cGN. Kaede-Mäuse wurden mit 2×10^7 *S. aureus* infiziert, anschließend mit Ampicillin behandelt (Tag 28-42) und 60 Tage nach Infektion wurde die cGN induziert. 4 Tage nach cGN Induktion wurde eine Niere photokonvertiert. Weitere 3 Tage später wurden die Mäuse analysiert. A) Schematische Darstellung des Versuchsvorhabens. B) Exemplarische Konturplots der durchflusszytometrischen Analyse von CD4⁺ T-Zellen nach PMA und Ionomycin Stimulation in Gegenwart von Brefeldin A. Dargestellt sind die photokonvertierten Zellen, die IL-17A produzieren. C) Auswertung der IL-17A produzierenden Zellen, in den Kaede-roten bzw. grünen Zellpopulationen 3 Tage nach Photokonversion. Die Balken in den Diagrammen repräsentieren den Mittelwert der dargestellten einzelnen Messwerte. Für die statistische Analyse wurde ein t-Test verwendet. * $p < 0,05$.

Vier Tage nach Induktion der cGN wurde eine Niere bestrahlt und nach drei weiteren Tagen die T-Zellen nach Stimulation untersucht. Abb. 24 B zeigt exemplarisch die Produktion von IL-17A in den photokonvertierten Zellen (Kaede-rot) und den nicht photokonvertierten CD4⁺ T-Zellen (Kaede-grün). In der Kontrollgruppe mit cGN aber ohne vorherige Infektion waren die IL-17A produzierenden Zellen fast ausschließlich nicht photokonvertiert. Wohingegen sie in der zuvor infizierten Gruppe auch in signifikanter höherer Frequenz in der photokonvertierten Population vorhanden waren (Abb. 24B). Die Frequenz der IL-17A produzierenden CD4⁺ T-Zellen war in den Mäusen nach *S. aureus* Infektion und cGN stets signifikant erhöht, sowohl in photokonvertierten, als auch in den nicht photokonvertierten Zellen (Abb. 24C). Diese Experimente zeigen, dass CD4⁺ T-Zellen, die vor der Migration von Th17 Zellen im cGN Model bereits in der Niere lokalisiert sind, potentiell IL-17A produzieren können.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieses Abschnitts, dass sich eine vorhergehende ausgeheilte Infektion mit *S. aureus* auf eine nachfolgende Autoimmunerkrankung auswirkt und diese sogar verschlechtert werden kann.

Aufgrund der bekannten Migrationskinetik waren die T-Zellen wahrscheinlich bereits vor der cGN Induktion in der Niere³⁸. Es handelt sich bei ihnen vermutlich um *S. aureus* induzierte geweberesidente T-Zellen.

5.2.4 Der Einfluss einer vorhergehenden *S. aureus* Infektion auf die experimentelle autoimmune Glomerulonephritis (EAG)

Zusätzlich zu dem bisher verwendeten Krankheitsmodell für die cGN induziert durch nephrotoxisches Schafserum, wurde ein weiteres Modell für eine autoimmune Nierenerkrankung verwendet, das Modell der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG). Im Vergleich zur cGN beruht die EAG auf autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen und Autoantikörpern gegen eine Domäne des Kollagens ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) in der glomerulären Basalmembran, die durch eine mehrmaliges Immunisieren mit $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ induziert werden und erst nach einem deutlich längeren Zeitraum zu einer Glomerulonephritis führen (siehe Methoden 8.2.1.3).

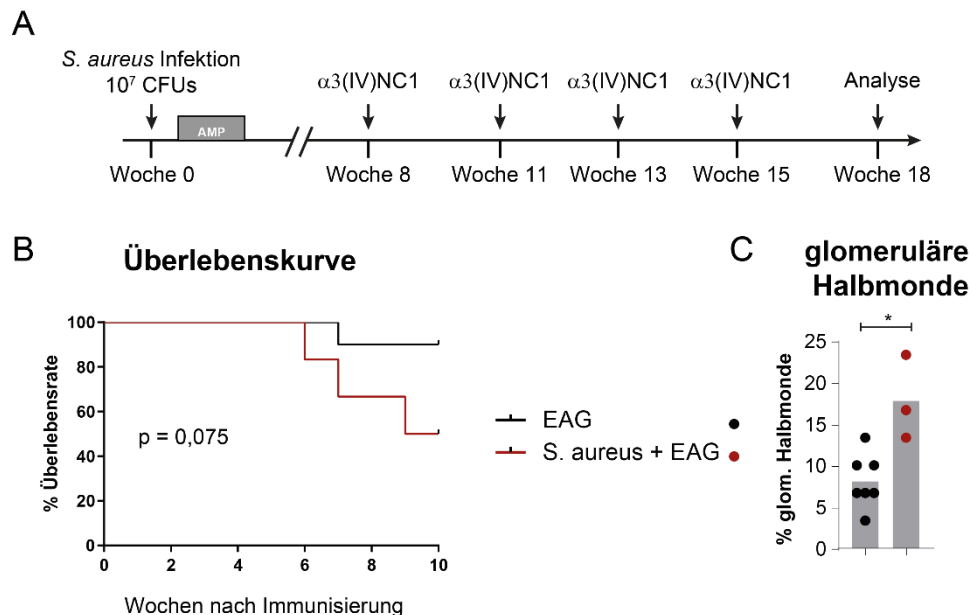


Abbildung 25: Der Einfluss einer vorherigen *S. aureus* Infektion auf den Verlauf der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG). DBA/1 Mäuse wurden intravenös mit 10⁶ *S. aureus* infiziert und 14 Tage mit Ampicillin behandelt. 8 Wochen nach Infektion wurden die Tiere mit m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ initial in KFA und anschließend drei weitere Male verstärkend mit m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ in IFA immunisiert. A) Schematische Darstellung des Versuchsvorhabens. B) Überleben der Mäuse nach EAG-Induktion. Analysiert wurden die Daten mit dem Mantel-Cox Test. C) Histologische Quantifizierung der glomerulären Halbmonde. Für die statistische Analyse wurde ein t-Test verwendet. *p < 0,05.

Die Mäuse wurden nach Infektion mit *S. aureus* mit dem murinen $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ immunisiert (Siehe Abb. 25 und ⁸³). Im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe, in denen ebenfalls die EAG induziert wurde, war das Überleben der infizierten Gruppe tendenziell schlechter, allerdings nicht signifikant (p=0,08). Im Einklang mit einer schlechteren Überlebensrate wiesen die zuvor infizierten Mäuse nach induzierter EAG eine höhere Frequenz an glomerulären Halbmonden auf. Analog zum vorherigen Modell wurde neben den Krankheitsparametern auch die T-Zellantwort analysiert.

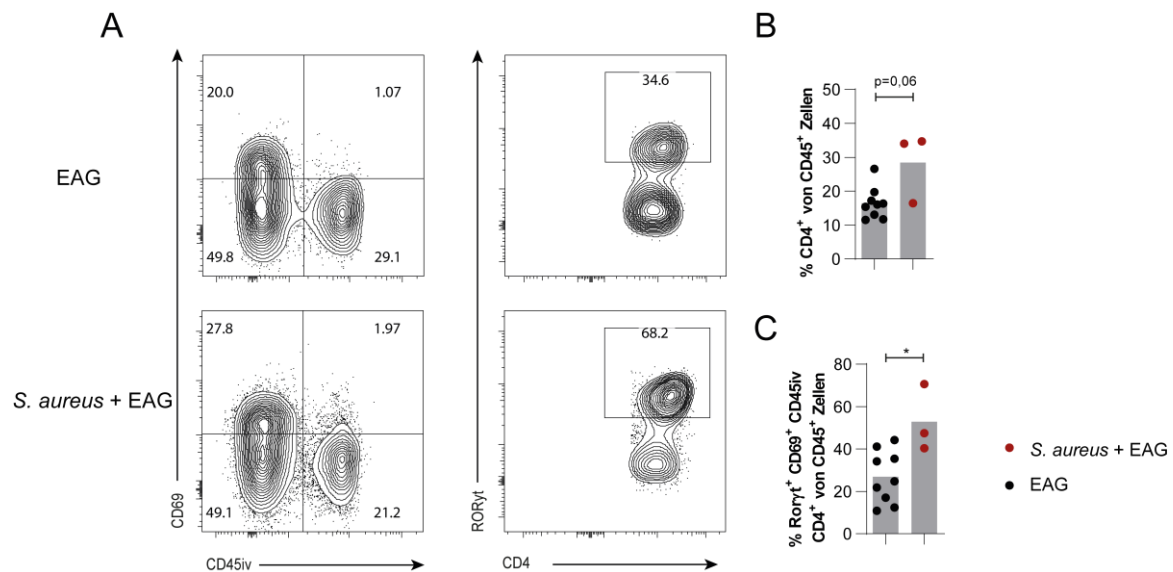


Abbildung 26: Analyse der T-Zellpopulationen in Mäusen mit EAG nach vorangegangener *S. aureus* Infektion. DBA/1 Mäuse wurden intravenös mit 10^6 *S. aureus* infiziert und 14 Tage mit Ampicillin behandelt. 8 Wochen nach Infektion wurden die Tiere mehrmals mit $\alpha 3(IV)NC1$ immunisiert. A) Exemplarische Darstellung von renalen CD4⁺ T-Zellen hinsichtlich ihrer Expression von CD69 und Lokalisation anhand der CD45iv Färbung sowie ihrer Expression des Transkriptionsfaktors RORyt. B) Quantifizierung der CD4⁺ T-Zellen D) Quantifizierung der RORyt⁺ CD4⁺ T-Zellen. Für die statistische Analyse wurde ein t-Test verwendet. * p<0,05.

Abbildung 25 zeigt exemplarisch die intravaskuläre Färbung von CD45 (CD45iv), und die Oberflächenfärbung von CD69 als Marker für gewebsständige CD4⁺ T-Zellen. Weiterhin ist der Transkriptionsfaktor RORyt dargestellt, der für Th17-Zellen charakteristisch ist. In der Auswertung (Abb. 26 B und C) zeigte sich eine erhöhte Frequenz an renalen CD4⁺T-Zellen (p=0,06) und auch an Th17-Zellen. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen waren in der Niere nach *S. aureus* Infektion und EAG im Vergleich zur EAG ebenfalls erhöht (Abb. 27 A). Die Analyse der Zytokinproduktion ergab, dass auch signifikant mehr IL-17A von renalen CD4⁺ T- und $\gamma\delta$ -T-Zellen produziert wurde. Die Produktion für IFN- γ und TNF- α war nicht signifikant verändert (Abb. 26).

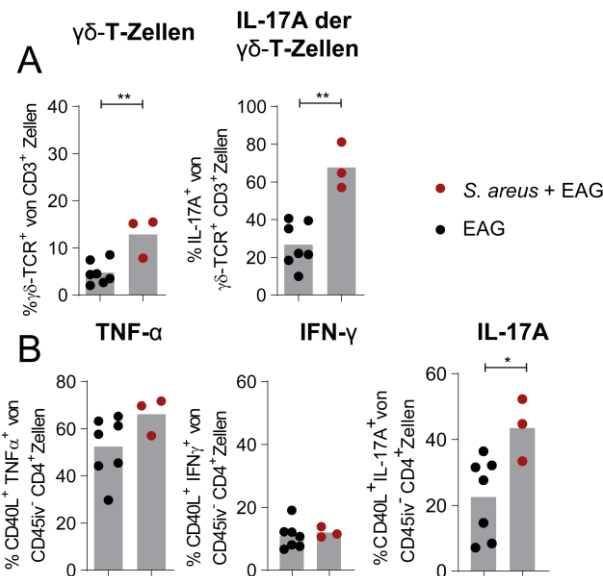


Abbildung 27: Analyse der T-Zellpopulationen in der EAG nach vorangegangener *S. aureus* Infektion. DBA/1 Mäuse wurden intravenös mit 10^6 *S. aureus* infiziert und 14 Tage mit Ampicillin behandelt. 8 Wochen nach Infektion wurden die Tiere mehrmals mit $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ immunisiert. Die renalen T-Zellen wurden mit PMA und Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A stimuliert. Anschließend wurde die Zytokinproduktion analysiert. A) Frequenz der $\gamma\delta$ -T-Zellen und der IL-17A produzierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen. B) Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Zellen für die Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-17A. Analysiert wurden die Ergebnisse mit einem t-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

Zusammenfassend zeigen diese experimentellen Daten, dass die durch die Staphylokokken induzierten Th17-Zellen mit der Schwere der Glomerulonephritis in verschiedenen Modellen positiv korrelieren und für die Produktion von IL-17A während der Nephritis verantwortlich sind.

5.2.5 Die Bedeutung von IL-17A in der durch die Infektion von *S. aureus* potenzierten cGN

In vorherigen Studien konnte die zentrale Bedeutung von IL-17A für die Nierenschädigung in der cGN bereits deutlich gezeigt werden⁸⁴. Im hier vorliegenden Modell der aggravierten cGN durch vorherige *S. aureus* Infektion, sollte untersucht werden, inwiefern das IL-17A von den durch die Infektion induzierten Th17- und $\gamma\delta$ -T-Zellen an der Verstärkung der Erkrankung beteiligt ist. Für den experimentellen Nachweis wurde das IL-17A *in vivo* durch die Applikation von monoklonalen anti-IL-17A-Antikörpern während der cGN in Mäusen mit und ohne vorherige Infektion neutralisiert (Abb. 28).

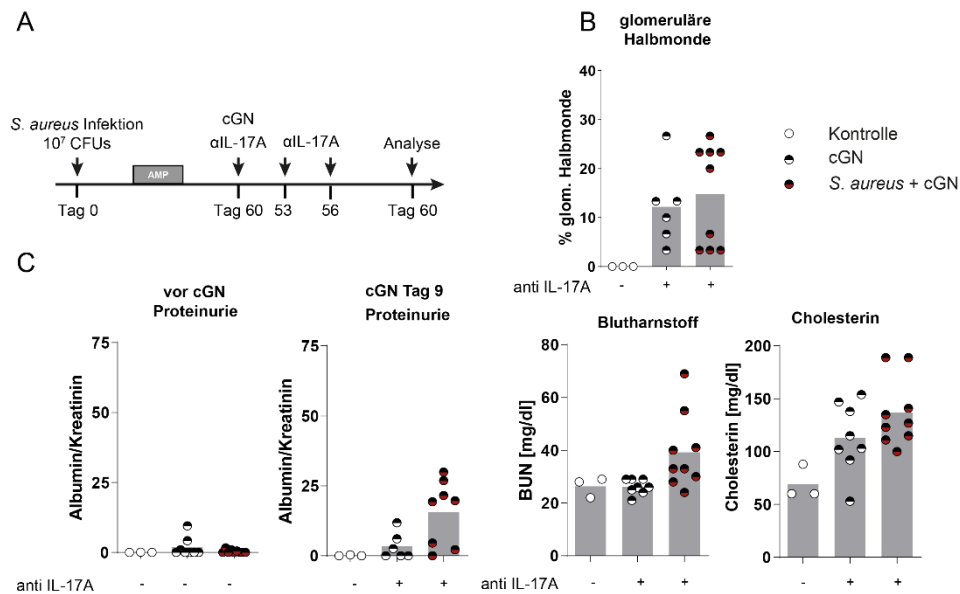


Abbildung 28: IL-17A Neutralisation während der cGN. 57BL/6 Mäuse wurden intravenös mit 4×10^7 *S. aureus* infiziert und anschließend mit Ampicillin behandelt (Tag 28-42). Nach überstandener Infektion wurde die cGN induziert und die Mäuse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit IL-17A neutralisierenden Antikörpern behandelt. A) Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs. B) Quantifizierung der glomerulären Halbmonde. C) Analyse der Proteinurie vor und an Tag 9 der cGN sowie der Harnstoff-(BUN) und Cholesterinkonzentration im Blut. Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's Posttest* statistisch analysiert. Die Diagramme stellen die Einzelwerte der Messungen sowie den Mittelwert als Balken dar.

Die Mäuse wurden analog zu den vorherigen Versuchen an Tag 10 der cGN analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass nach der Neutralisation von IL-17A kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der glomerulären Halbmonde zwischen den Versuchsgruppen mehr sichtbar war. Die Analyse der Proteinurie zeigte eine Tendenz hin zu höheren Proteinwerten, aber keinen signifikanten Unterschied. Eine ähnliche Tendenz ergab sich in der Analyse des Blutharnstoffs und des Cholesterins im Blut.

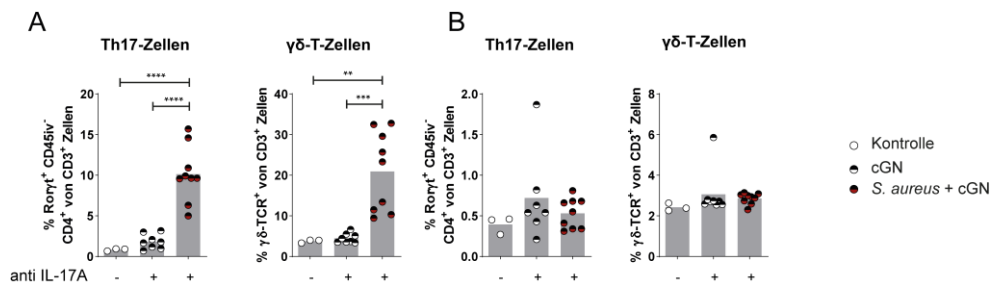


Abbildung 29: Untersuchung der T-Zellpopulationen in der cGN bei anti-IL-17A Behandlung. C57BL/6 Mäuse wurden iv. mit 4×10^7 *S. aureus* infiziert und anschließend mit Ampicillin behandelt (Tag 28-42). Nach überstandener Infektion wurde die cGN induziert und die Mäuse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit IL-17A neutralisierenden Antikörpern behandelt. Untersuchung der Th17 und $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Niere (A) und in der Milz (B). Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttest statistisch analysiert. Die Diagramme stellen die Einzelwerte der Messungen sowie den Mittelwert als Balken dar. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$.

Auch nach IL-17A Neutralisation wurde die T-Zellantwort untersucht (Abb. 29). Es konnte gezeigt werden, dass die Frequenz an $\gamma\delta$ -T-Zellen und ROR γ t⁺ Th17-Zellen nach der *S. aureus* Infektion trotz Neutralisation des IL-17A in der Niere signifikant erhöht waren. Zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und der cGN Gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede. In der Milz ließ sich in keiner der Gruppen ein Unterschied in der Frequenz der untersuchten T-Zellen detektieren. Die Fähigkeit zur Zytokinproduktion wurde ebenfalls untersucht. Abb. 30A zeigt exemplarisch stimulierte renale CD4⁺ T-Zellen, die IL-22 produzieren. Die renalen CD4⁺ Zellen aus Mäusen, die vor der cGN mit *S. aureus* infiziert wurden, zeigten für alle drei untersuchten Zytokine (IFN- γ , IL-17A und IL-22) signifikant mehr positive Zellen als die aus Mäusen, die nur von der Glomerulonephritis betroffen waren.

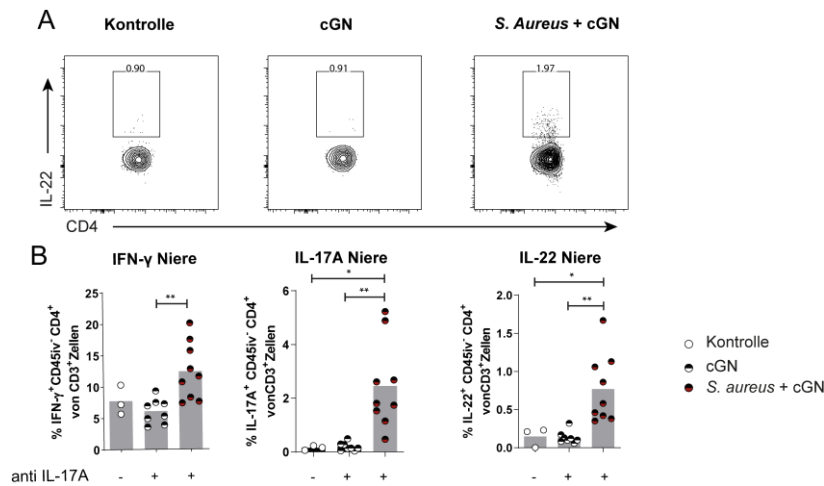


Abbildung 30: Untersuchung der T-Zellantwort in der cGN bei anti-IL-17A Behandlung. C57BL/6 Mäuse wurden iv. mit 4×10^7 *S. aureus* infiziert und anschließend mit Ampicillin behandelt (Tag 28-42). Nach überstandener Infektion wurde die cGN induziert und zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere mit IL-17A neutralisierenden Antikörpern behandelt. A) Repräsentative Darstellung der Produktion von IL-22 nach PMA und Ionomycin Stimulation in Gegenwart von Brefeldin A in den jeweiligen Versuchsgruppen. B) Quantifizierung der Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen in der Niere, untersucht wurden IFN- γ , IL-17A und IL-22. Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttest statistisch analysiert. Die Diagramme stellen die Einzelwerte der Messungen sowie den Mittelwert als Balken dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Die Zellen waren unabhängig von der Neutralisation des IL-17As vorhanden und potenziell in der Lage pro-inflammatorische Zytokine zu sekretieren. Zur Analyse der Wirkung von IL-17A *in vivo* wurde die renale Genexpression von *Cxcl5*, einem von IL-17A abhängigen Chemokin mittels qPCR untersucht (Abb. 31). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Mausgruppen. Für die Expression der mRNA von *Il17a* ergab sich ebenfalls kein Unterschied.

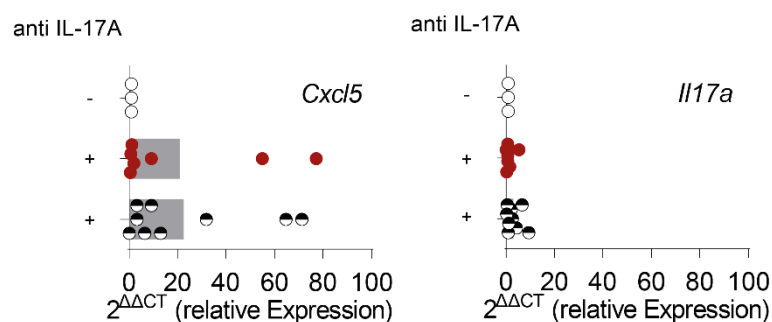


Abbildung 31: Genexpressionsanalysen in der cGN nach vorheriger *S. aureus* Infektion bei anti-IL-17A Behandlung. C57BL/6 Mäuse wurden iv. mit 4×10^7 *S. aureus* infiziert und anschließend mit Ampicillin behandelt (Tag 28-42). Nach überstandener Infektion wurde die cGN induziert und zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere mit IL-17A neutralisierenden Antikörpern behandelt. Dargestellt sind die jeweils in der cGN relevanten Gene als x-fache Expression zu den Tieren der Kontrollgruppe. Das *Housekeeping* Gen zur Normalisierung der Expression war die 18S rRNA. Angegeben sind die Expressionslevel der Einzelwerte und der Mittelwert als Balken. Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttest statistisch analysiert.

A

S. aureus Infektion
10⁷ CFUs

AMP

DT DT DT DT cGN cGN

Tag 0 Tag 60 Tag 62 Tag 64 Tag 67 Tag 78 Tag 88

Analyse Analyse

B

S. aureus *S. aureus* + DT

IL-17^{int} (eYFP)

7.54 19.4 0.46 1.15

CD69

33.6 50.2

C

glomeruläre Halbmonde

% glom. Halbmonde

DT + +

D

Zellnummer

IL-17A

17.3 16.9

E

IL-17A IFN-γ

% IL-17A⁺CD45⁺ von CD3⁺ Zellen

% IFN-γ⁺CD45⁺ von CD3⁺ Zellen

DT + +

● cGN ● *S. aureus* + cGN

In diesen Versuchen wurden Mäuse nach dem beschriebenen Schema mit *S. aureus* infiziert und nach ausgeheilter Infektion (inklusive Ampicillinbehandlung) mit dem Diphtherietoxin behandelt. Als Vergleichsgruppe diente eine nicht infizierte, ansonsten gleich behandelte Gruppe (Abb. 32A). Abb. 32B zeigt exemplarisch die Depletion von YFP⁺ Zellen, Zellen, die einmal IL-17A produziert hatten. In dem gezeigten Beispiel waren diese Zellen auch CD69⁺, ein Hinweis auf einen geweberesidenten Phänotyp. Die dreimalige Applikation des Diphtherietoxins führte zu einer fast vollständigen Depletion der YFP⁺ CD69⁺ Zellen (von 19% auf 1%)

Nach Induktion der cGN wurden die glomerulären Halbmonde quantifiziert. Hierbei zeigte sich nur ein geringer, nicht signifikanter Unterschied nach der Depletion der IL-17A produzierenden Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen (3% vs. 6% Halbmonde). Die Rate an Halbmonden war allerdings deutlich niedriger als in den bereits beschriebenen Versuchen ohne Depletion von IL-17A produzierenden Zellen durch das Diphtherietoxin. In Abb. 32D ist exemplarisch die IL-17A Produktion stimulierter CD4⁺ T Zellen dargestellt, diese produzierten IL-17A auf einem vergleichbaren Level. Die IFN- γ produzierenden Zellen waren in der nicht infizierten Gruppe in höherer Frequenz vertreten als in der anderen Gruppe, der Unterschied war aber nicht signifikant ($p=0,12$).

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass die Neutralisation des Interleukin 17A bzw. die Depletion IL-17A-produzierenden Zellen eine Verbesserung der Krankheitssymptome in der induzierten Glomerulonephritis zur Folge hat. IL-17A hat somit eine entscheidende Bedeutung für den Verlauf der Glomerulonephritis. Weiterhin wird durch beide Behandlungen der Unterschied in der Schwere der Erkrankung zwischen vorher *S. aureus* infizierten und nicht infizierten Tieren aufgehoben. Die durch *S. aureus* induzierten IL-17 produzierenden T-Zellen spielen daher eine entscheidende Rolle für die verstärkte Glomerulonephritis.

5.2.6 T-Zellrezeptorunabhängige Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen

Der normale Aktivierungsmechanismus von T-Zellen involviert Antigenpräsentierende Zellen, die ein Peptid präsentieren, welches dann von den T-Zellen durch den T-Zellrezeptor erkannt wird. Voraktivierte T-Zellen können aber auch unabhängig vom T-Zellrezeptor, z.B. über Zytokine aktiviert werden⁸⁸. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob die durch die Staphylokokken induzierten Zellen im Krankheitsmodell aktiviert werden und auf welche Art diese Aktivierung erfolgt. Um die Aktivierung der T-Zellen in der experimentellen cGN zu untersuchen wurden Reportermäuse, die sowohl das Kaedeprotein, als auch ein Reporterprotein (Katushka), das die Expression von IL-17A produzieren anzeigt, verwendet⁸⁹. Diese Mäuse wurden infiziert und anschließend mit Ampicillin behandelt. Nach 60 Tagen wurde eine Niere bestrahlt und anschließend wurde die cGN induziert. Abb. 33 zeigt den Versuchsablauf und den Analysezeitpunkt.

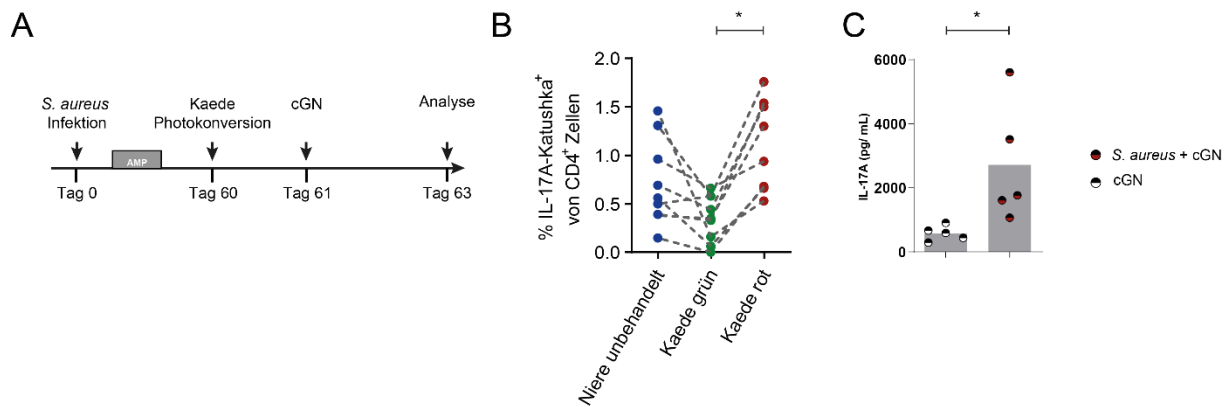


Abbildung 33: Analyse der *In vivo* IL-17A Produktion durch T-Zellen nach Induktion der cGN. A) 2×10^7 Kaede/IL17Kat Mäuse wurden mit *S. aureus* infiziert und mit Ampicillin behandelt (Tag 28-42). Nach 60 Tagen wurde eine Niere photokonvertiert. An Tag 61 erfolgte die Induktion der cGN und die Nieren wurden an Tag 63 analysiert. B) Analyse der IL-17A Produktion über das Reporterprotein Katushka. C) Analyse der Proteinkonzentrationen des IL-17As aus Nieren der jeweiligen Versuchsgruppen. Analysiert wurden die Ergebnisse mit einem t-Test. * $p < 0,05$.

Die Analyse der renalen Zellen ergab, dass in der bestrahlten Niere CD4⁺ T-Zellen aktiv das Reporterprotein für IL-17A (Katushka-Protein) produzierten und somit die Produktion IL-17A *in vivo* durch die Injektion von nephrotoxischem Schafserum induziert werden konnte. Zusätzlich konnte über die Photokonversion des Kaedeproteins gezeigt werden, dass sich diese Zellen schon vor der Induktion der cGN in der Niere befanden. In Abb. 33C konnte zudem noch auf Proteinebene nachgewiesen werden, dass IL-17A in höherer Menge in den Nieren der Mäuse produziert wird, die vor der cGN-Induktion zuvor mit *S. aureus* infiziert worden waren. In der cGN Gruppe wurde durchschnittlich 590 pg/ml IL-17A produziert, in der *S. aureus* + cGN Gruppe durchschnittlich 1770 pg/ml, was einem signifikanten Unterschied entspricht.

Im nächsten Schritt sollte die Aktivierung der Zellen *in vitro* untersucht werden. Basierend auf eigenen und publizierten Daten und eigenen in Kooperation erhobenen Daten (Anhang 10.2 D) wurden pro-inflammatorische Zytokine gewählt, die in frühen Stadien der experimentellen cGN exprimiert werden³⁹. Es wurden die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-18 und IL-23 ausgewählt und *in vitro* zur Stimulation FACS-sortierter CD4⁺ T-Zellen verwendet. Die Strategie zum Sortieren der Zellen ist in Abb. 34 dargestellt.

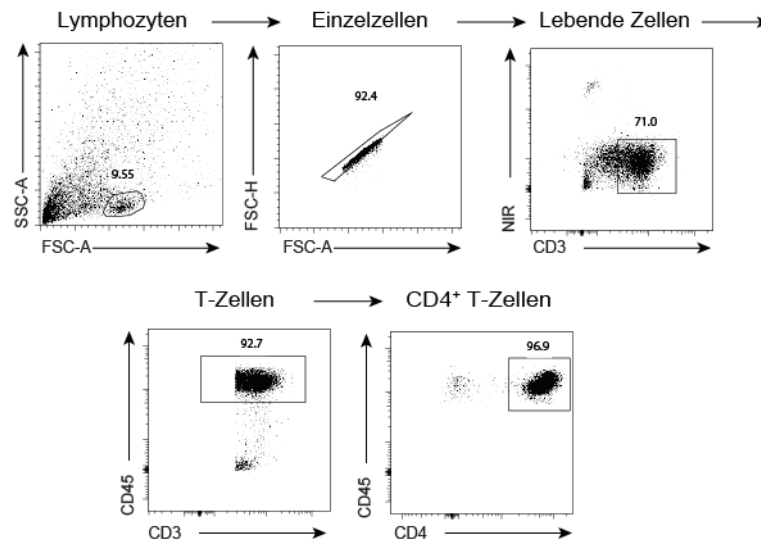


Abbildung 34: Darstellung der FACS-Sortierung von CD4⁺ T-Zellen aus der Niere. Mit *S. aureus* infizierte Mäuse wurden 4 Wochen nach Infektion 2 Wochen mit Ampicillin (Tag 28-42) behandelt. Zwei Wochen nach der Behandlung wurden Leukozyten aus der Niere isoliert und erst CD4⁺ T-Zellen magnetisch, dann durchflusszytometrisch angereichert. Zunächst wurde auf Lymphozyten (SSC-A gegen FSC-A) und Einzelzellen FSC-A gegen FSC-H eingegrenzt. Anschließend wurden tote Zellen ausgeschlossen und nur noch CD3⁺CD4⁺ T-Zellen und selektiert. Kontaminationen mit $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden durch die vorherige magnetische Selektion und durchflusszytometrische Sortierung ausgeschlossen. Die Anreicherung von Zellen aus der Milz erfolgte mit der gleichen Strategie.

Die sortierten Zellen aus der Milz und Niere von zuvor infizierten Tieren wurden mit den Zytokinen dann für 72 Stunden stimuliert und die Produktion von Zytokinen bestimmt. In Abbildung 35. ist die jeweils produzierte Proteinmenge von IL-17A, IFN- γ und GM-CSF dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit den zuvor genannten Zytokinen möglich ist, unabhängig von der Stimulation des TCRs, die Sekretion von IL-17A zu induzieren. Dabei zeigte sich signifikanter Unterschied in der Menge des produzierten IL-17A im Überstand CD4⁺ T-Zellen aus der Niere im Vergleich zur Kontrolle. Auch ohne Zugabe von IL-18 war, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine signifikante Steigerung des produzierten IL-17A festzustellen.

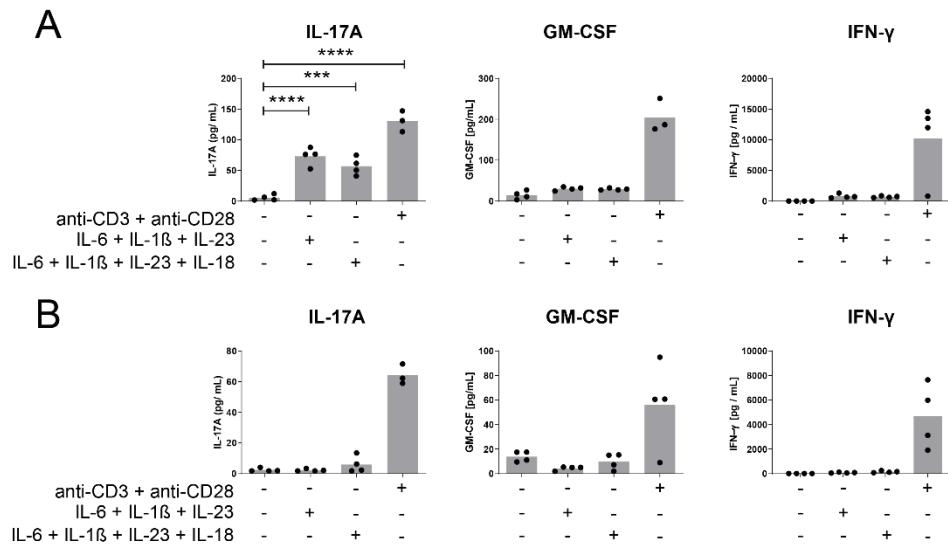


Abbildung 35: Zytokinproduktion von gereinigten CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen *in vitro*. Sortierte CD4⁺ T-Zellen aus zuvor mit 3×10^7 *S. aureus* infizierten Mäusen wurden *in vitro* mit den angegebenen Zytokinen oder Antikörpern stimuliert. Die produzierten Zytokine wurden im Kulturmedium der Zellen bestimmt. Zytokinproduktion für IL-17A, GM-CSF und IFN-γ in den Zellen aus der Niere (A) und Milz (B). Die Diagramme stellen die Einzelwerte der Messungen sowie den Mittelwert als Balken dar. Die Experimente wurden mittels *one-way-Anova* mit *Tukey's* Posttest statistisch analysiert. *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$.

Im Überstand der Milzzellen konnte kaum IL-17A nachgewiesen werden, lediglich die Positivkontrolle mit einer anti-CD3/CD28 Stimulation führte zu einer hohen Zytokinproduktion. Für GM-CSF und IFN-γ konnten ähnliche Ergebnisse festgehalten werden, sowohl im Überstand der Milz- als auch der Nierenzellen.

5.2.7 Neutralisierung aktivierender Zytokine als therapeutischer Ansatz in der experimentellen cGN

Basierend aus den zuvor erhobenen Daten wurde ein therapeutischer Ansatz gewählt, bei dem die in Abschnitt 5.2.6 identifizierten Zytokine mittels monoklonaler Antikörper neutralisiert wurden. Hierbei wurden die unter 8.2.1.10 beschriebenen Antikörper gegen IL-1β, IL-6 und IL-23 verwendet. Abbildung 35 zeigt den experimentellen Ablauf dieses Versuchsvorhabens. Die Infektion und Antibiotikabehandlung verlief analog zu bisherigen Versuchen, anschließend erfolgte die mehrmalige Neutralisierung der pro-inflammatorischen Zytokine in der frühen Phase der cGN (Tag 0, 3 und 6). Durch die histologische Analyse der glomerulären Halbmonde, 10 Tage nach cGN-Induktion, zeigte sich, dass die Behandlung mit den neutralisierenden Antikörpern zu einer signifikanten Reduktion des Nierenschadens führte (Abb. 36).

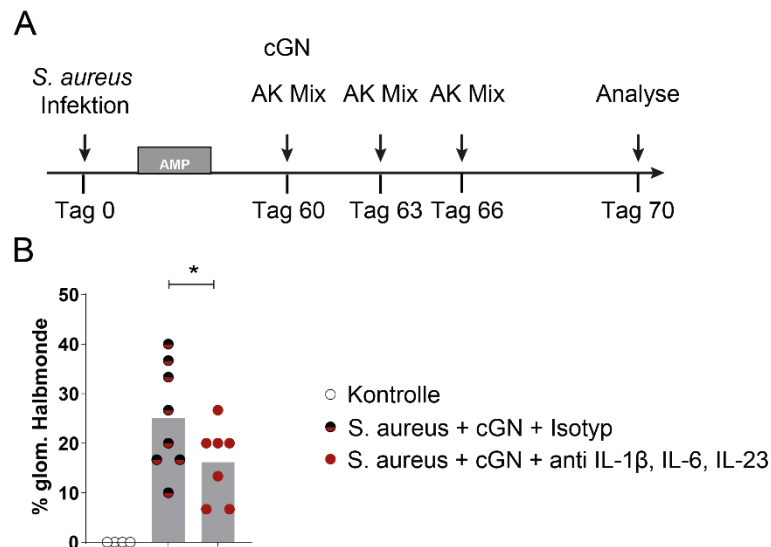


Abbildung 36: Behandlung der cGN durch Neutralisation von pro-inflammatorischen Zytokinen. C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^7 *S. aureus* infiziert und mit Antibiotika behandelt (Tag 28-42). Nach 60 Tagen wurde die cGN induziert. Die Antikörper gegen IL-1 β , IL-6 und IL-23 (AK Mix) wurden den Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten intraperitoneal injiziert. A) Schematische Darstellung des Versuchsvorhabens. B) Quantifizierung der glomerulären Halbmonde. Dargestellt sind die Einzelwerte, sowie der Mittelwert als Balkendiagramm. Die Interventionsgruppen wurden statistisch mit einem t-Test untersucht. *p<0,05

Auch in diesem Experiment wurde neben den Krankheitsparametern die T-Zellantwort charakterisiert. Nach Neutralisation der pro-inflammatorischen Zytokine konnte gezeigt werden, dass es eine Tendenz zu mehr renalen CD4⁺ T-Zellen in der mit dem Isotyp behandelten Gruppe gab (Abb. 37).

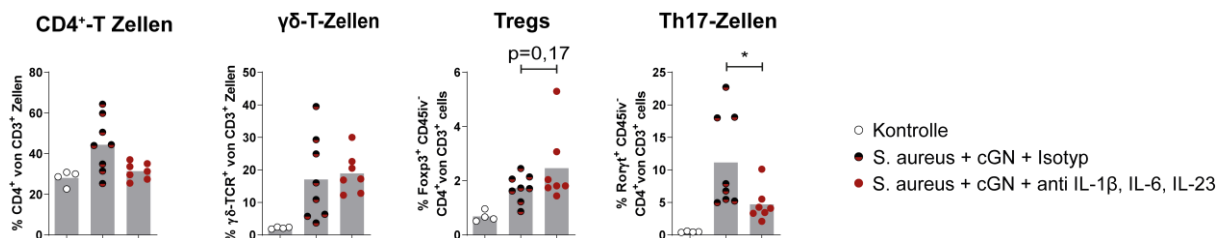


Abbildung 37: Analyse der T-Zellpopulationen nach Behandlung der cGN durch die Neutralisation pro-inflammatorischer Zytokine. C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^7 *S. aureus* infiziert, mit Antibiotika behandelt und anschließend die cGN induziert. Die Antikörper gegen IL-1 β , IL-6 und IL-23 (AK Mix) wurden an Tag 0, 3 und 6 der cGN appliziert. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte, die Balken im Diagramm repräsentieren den Mittelwert der ermittelten Werte. Die Interventionsgruppen wurden statistisch mit einem t-Test untersucht. *p<0,05

Die renalen γδ-T-Zellen waren in beiden Gruppen, die eine *S. aureus* Infektion überstanden hatten und bei denen eine cGN induziert wurde, unabhängig von der Applikation der neutralisierenden Antikörper, signifikant erhöht. Bei den renalen RORγt⁺ Th17-Zellen zeigte sich eine signifikante Reduktion in der mit neutralisierenden Antikörpern behandelten Gruppe. Im Gegensatz dazu fanden sich mehr regulatorische T-Zellen in dieser Gruppe.

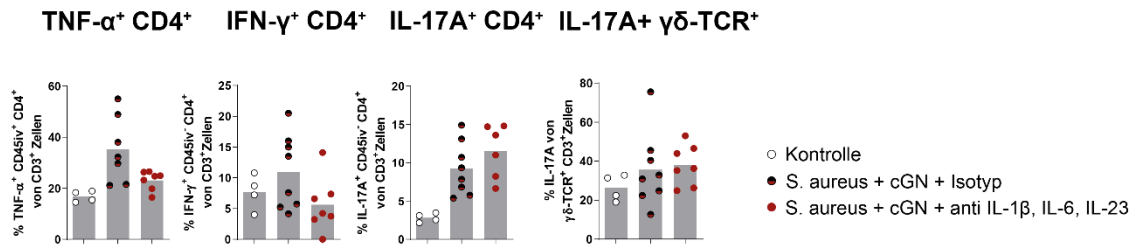


Abbildung 38: Analyse der T-Zellantwort nach Behandlung der cGN durch die Neutralisation pro-inflammatorischer Zytokine. C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^7 *S. aureus* infiziert, mit Antibiotika behandelt und anschließend die cGN induziert. Die Antikörper gegen IL-1 β , IL-6 und IL-23 (AK Mix) wurden an Tag 0, 3 und 6 der cGN appliziert. Isolierte Leukozyten wurden mittels PMA/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A stimuliert und die Zytokinproduktion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Analysiert wurden die TNF- α , IFN- γ und IL-17A produzierenden CD4 $^+$ T-Zellen sowie die IL-17A produzierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte, die Balken im Diagramm repräsentieren den Mittelwert der ermittelten Werte. Die Interventionsgruppen wurden statistisch mit einem t-Test untersucht.

Die Analyse der Zytokinproduktion zeigte, dass die renalen CD4 $^+$ T-Zellen aus den Mäusen der Gruppe mit applizierter Isotypkontrolle tendenziell mehr TNF- α und IFN- γ nach Stimulation produzierten. Für die IL-17A produzierenden renalen Th17-Zellen konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen mit überstandener Infektion und cGN, unabhängig von den neutralisierenden Antikörpern oder der Isotypkontrolle, festgestellt werden (Abb. 38). Die Frequenz der IL-17A produzierenden renalen $\gamma\delta$ -T-Zellen war in allen analysierten Versuchsgruppen auf vergleichbarem Niveau, es konnte kein Unterschied gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass CD4 $^+$ T-Zellen aus der Niere von zuvor infizierten Mäusen über pro-inflammatorische Zytokine, unabhängig vom TCR, stimuliert werden können. *In vivo* führt die Neutralisation dieser pro-inflammatorischen Zytokinen, zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufs der cGN und auch zu einer leichten Veränderung der renalen CD4 $^+$ T-Zellpopulationen. Die Fähigkeit zur Zytokinproduktion ist aber in keiner der Versuchsgruppen signifikant verändert.

5.3 Analysen von gesundem humanem Nierengewebe

Neben der Analyse von murinem Nierengewebe wurde auch humanes Nierengewebe aus Tumornephrektomien analysiert. Bei diesen Eingriffen werden teilweise ganze Nieren einschließlich des nicht vom Tumor betroffenen Gewebes entfernt. Aus dem „gesunden“ Teile wurden analog zu Mausgewebe T-Zellen isoliert und polyklonal stimuliert. Abbildung 39 zeigt hierbei exemplarisch eine durchflusszytometrische Analyse von humanen Leukozyten. In 39A und 39B wurden Blut und Nierenproben vom gleichen Spender analysiert, sowohl unbehandelte als auch stimulierte Zellen sind dargestellt. Sowohl im Blut als auch in der Niere konnten $CD4^+$ T-Zellen identifiziert werden. Nach Stimulation wurden in der Niere tendenziell mehr zytokinproduzierende T-Zellen beobachtet als im Blut. Abb. 39C zeigt für $TNF-\alpha$ eine Tendenz zu einer erhöhten Produktion in der Niere. Für das $IFN-\gamma$ zeigte sich ein vergleichbares Bild, allerdings waren weniger Zellen positiv für $IFN-\gamma$ als für $TNF-\alpha$. Das für Th2 Zellen charakteristische IL-4 war in signifikant mehr Zellen in der Niere als im Blut zu finden. Für das IL-17A zeigt sich ein ähnliches Bild, hier produzierten im Blut etwa 0,8% der Zellen IL-17A, während es in der Niere etwa 7% waren.

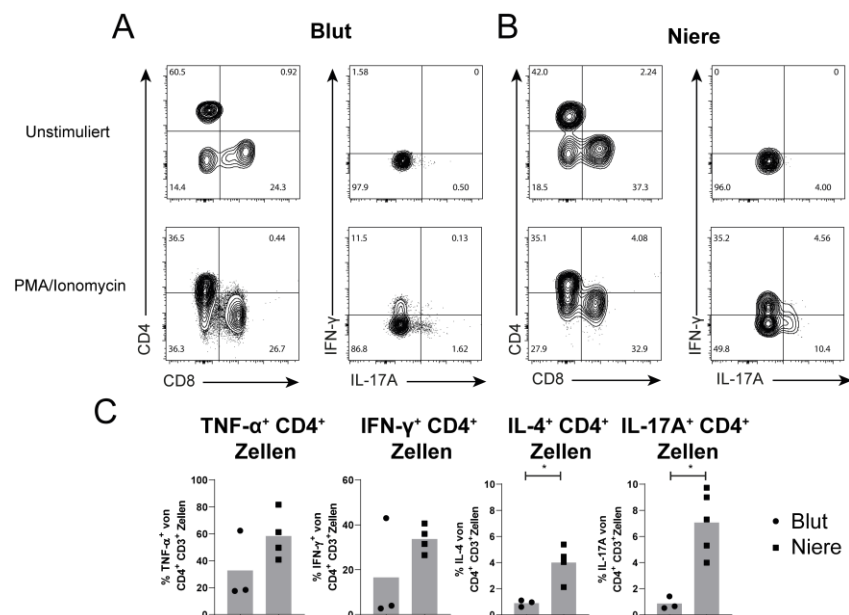


Abbildung 39: Durchflusszytometrische Analyse von gesundem humanem Nierengewebe. Aus gesundem Nierengewebe wurden Leukozyten isoliert und mittels PMA und Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A stimuliert. A und B zeigen exemplarische Konturplots von Leukozyten aus Blut und Niere des gleichen Spenders. Die Plots der IL-17A und $IFN-\gamma$ Analyse zeigen $CD4^+$ T-Zellen C) Darstellung der produzierten Zytokine. Diagramme stellen die Einzelwerte der Messungen sowie den Mittelwert als Balken dar. Statistische Analyse mittels t-Test. * $p < 0,05$.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch in gesunden humanen Nieren CD4⁺ T-Zellen identifizierbar sind, die nach Stimulation pro-inflammatorische Zytokine produzieren. Die CD4⁺ T-Zellen der Niere enthalten einen deutlich größeren Anteil an Zytokinproduzenten als die CD4⁺ T-Zellen im Blut und dieser Unterschied umfasst IFN- γ produzierende Th1-Zellen, IL-4 produzierende Th2-Zellen und auch IL-17A produzierende Th17-Zellen. Beim TNF- α , das von mehreren T-Zellsubtypen produziert werden kann, ist die Tendenz ebenfalls vorhanden.

6. Diskussion

Infektionen können das Immunsystem dauerhaft verändern, indem sie zur Generierung von Gedächtniszellen beitragen. Diese dienen dem Zweck bei erneuten Infektionen mit bereits bekannten Pathogenen eine rasche Immunantwort zu ermöglichen. Gedächtniszellen können in verschiedene Subtypen eingeteilt werden, je nach Funktion oder Lokalisation im Körper. Es existieren geweberesidente Gedächtniszellen, die in peripheren Organen und in Geweben mit Kontakt zur Umgebung, wie der Haut oder in den Schleimhäuten, vorkommen⁹⁰. Es wird vermutet, dass diese residenten Zellen eine ortsspezifische Immunantwort gewährleisten können⁹¹. In gesunden Labormäusen, gibt es nur geringe Mengen dieser Zellen, da sie durch ihre sehr saubere und kontrollierte Umgebung kaum Pathogenen ausgesetzt sind, die das Immunsystem verändern und diese Zellen induzieren⁷⁸. Daher können Infektionsmodelle zur Generierung von geweberesidenten Gedächtniszellen verwendet werden⁹².

In der vorliegenden Arbeit wurden bakterielle Infektionsmodelle verwendet, welche unterschiedliche Teile des Immunsystems für die Bekämpfung der Bakterien benötigen. Es wurden Listerien (*Listeria monocytogenes*) verwendet. Diese intrazellulären Bakterien induzieren sowohl CD8⁺ T-Zellen als auch CD4⁺ T-Zellen vom Typ Th1 gerichtet⁹³. Das zweite Infektionsmodell beinhaltet die Infektion mit Staphylokokken (*Staphylococcus aureus*). Infektionen mit den extrazellulären Staphylokokken ziehen normalerweise Immunantworten des Typs Th17 nach sich⁹⁴. Es werden aber auch Antworten durch Th1 und $\gamma\delta$ -T-Zellen beschrieben^{34,95}. Neben Studien in Mäusen sind auch in Menschen IL-17A abhängige Immunreaktionen gegen *S. aureus* beschrieben⁹⁶.

Infektionskrankheiten, bei denen das Immunsystem zur Abwehr der Erreger essentiell ist, stehen Autoimmunerkrankungen gegenüber, bei denen das eigene Immunsystem eine Reaktion gegen körpereigene Strukturen auslöst. In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf Autoimmunerkrankungen der Niere. Eine Art von Autoimmunerkrankung in der Niere sind die halbmondbildenden Glomerulonephritiden (cGN), die die Nierenkörperchen betreffen⁹⁷. In experimentellen Modellen für diese Art von Autoimmunerkrankungen, wie der Nephrotoxischen Nephritis (NTN), als Modell für eine cGN, sind T-Zellen stark involviert⁹⁸. Neben dem eher unspezifischen NTN-Modell, das durch nephrotoxisches Schafserum induziert wird, wird auch die experimentelle

autoimmune Glomerulonephritis (EAG) angewendet⁴². Hierbei wird die Maus mehrmals mit dem Antigen, das beim Goodpasture Syndrom erkannt wird, immunisiert, sodass diese über die Zeit eine Autoimmunerkrankung mit starker Nierenschädigung entwickelt⁸³. Dabei sind sowohl B- und T-Zellen involviert⁴⁶.

Generell sind Autoimmunerkrankungen auf eine gestörte Toleranz des Immunsystems zurückzuführen, allerdings sind viele Mechanismen noch ungeklärt⁹⁹. Der Einfluss von geweberesidenten T-Zellen, auf Autoimmunerkrankung ist weitgehend unerforscht. In aktuellen hochrangigen Publikationen werden erste Verbringungen zwischen geweberesidenten T-Zellen und dem Verlauf von chronisch-entzündlichen-Darmerkrankungen (Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa) beschrieben⁷³. Die Analyse der Rolle der geweberesidenten T-Zellen in Autoimmunerkrankungen, könnte potentiell neue Therapiestrategien aufdecken Gerade bei Patienten mit renalen Autoimmunerkrankungen wird bisher eher unspezifisch mit Immunsuppressiva (beispielweise Kortison oder Cyclophosphamid) behandelt wird, die oft eine Reihe von z.T. schweren Nebenwirkungen haben¹⁰⁰.

6.1 Die Generierung von geweberesidenten T-Zellen in der Niere nach bakteriellen Infektionen

Im ersten Teil der Arbeit wurden mit Bakterien (Staphylokokken und Listerien) das Immunsystem von Mäusen verändert und geweberesidente T-Zellen induziert. Hierbei lag der Fokus auf der Analyse der Niere und der Milz als Referenz für ein lymphatisches Organ. Wie in der Literatur beschrieben konnte auch hier gezeigt werden, dass Th17-Zellen entscheidend an der Bekämpfung der Staphylokokken beteiligt sind⁹⁴. Drei Tage nach intravenöser Infektion konnten in der Niere hohe Mengen an Bakterien isoliert werden, die Zahl war vergleichbar mit der der Infektionsdosis (Abb. 5.) Die Zahl der Bakterien verringerte sich im Laufe der Infektion, Bakterien waren aber nach 30 Tagen noch vorhanden, sodass zu vermuten ist, dass das Immunsystem der Mäuse nicht in der Lage war die Bakterien komplett zu bekämpfen und sich eine Art chronische Infektion manifestiert In der Milz war ein anderes Bild sichtbar, fast alle Mäuse beseitigten dort die Infektion rasch und die Zahl der Bakterien war zudem wesentlich geringer als in der Niere. Nach Ampicillinbehandlung konnten alle Mäuse geheilt werden. Die zweifelsfreie Identifikation von isolierten Bakterien erfolgte exemplarisch in anfänglichen Versuchen

mittels MALDI-TOF im Institut für Mikrobiologie am UKE (AG Prof. Dr. Rohde). Aufgrund des hohen Bakterienvorkommens in der Niere wurden neben den bakteriellen Titern auch funktionale Parameter der Niere untersucht, sowie histologische Untersuchungen vorgenommen. Als funktionaler Parameter lässt sich der Blutharnstoffgehalt heranziehen. Dieser war nach der Infektion leicht (aber statistisch signifikant) erhöht (Abb. 6), was zunächst auf einen funktionellen Schaden der Niere schließen lässt. In weiteren Experimenten (Abb. 17) ließ sich der erhöhte BUN allerdings nicht bestätigen. Aussagen über die Nierenfunktion lassen sich ebenfalls über den Proteinverlust im Urin treffen. Nach *S. aureus* Infektionen war diese Proteinurie nicht verändert im Vergleich zu den analysierten Kontrollen, sodass die Filtration des Blutes aufrechterhalten wurde und die Filtrationsbarriere intakt war. In der Niere ließen sich zudem Abszesse nachweisen, die bei einer Infektion mit *S. aureus* typisch sind (Anhang 10.2 A)⁷⁹. Diese Abszesse sind klar strukturiert und organisiert und nicht willkürlich entstanden. Die Staphylokokken kapseln sich so vor dem Immunsystem des Wirtes ab und verhindern eine effektive Bekämpfung⁷⁹. In den Abszessen ließ sich in Nieren der Mäuse ohne Behandlung mit Antibiotika auch mittels einer Gramfärbung die Präsenz von Gram-positiven Bakterien nachweisen (Anhang 10.2 B). Zusätzlich wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie (Prof. Dr. Torsten Wiech) elektronenmikroskopisch die Basalmembran der Kapillaren in den Glomeruli untersucht. Dabei sollten dort Ablagerungen analysiert werden, wie sie bei anderen bakteriellen Infektionen (z.B. Streptokokken) vorkommen, die langfristig die Nierenfunktion beeinträchtigen können⁸⁰. Diese Untersuchungen zeigten keine Ablagerungen nach ausgeheilter *S. aureus* Infektion. Im Anhang 10.2 D sind exemplarisch EM-Aufnahmen aufgeführt. Neben den funktionellen und strukturellen Analysen lag der Fokus vor allem auf der adaptiven Immunantwort, hierbei speziell auf den T-Zellen. Die langfristigen Folgen einer chronisch verlaufenden Infektion auf die Funktionsfähigkeit der Niere sind bisher noch nicht untersucht worden.

In Abbildung 7 wird aufgezeigt, dass die Infektion mit einer hohen Dosis an *S. aureus* eine starke Akkumulation von Th17-Zellen und auch $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Niere, dem Ort der stärksten bakteriellen Last, nicht aber in der Milz, nach sich zieht. Die analysierten Zellen zeigten zu einem großen Teil einen Phänotyp von geweberesidenten T-Zellen mit der Expression des Markers CD69 und der negativen intravaskulären Färbung, was auf eine Lokalisation im Parenchym hindeutet. Bei der Verwendung der Oberflächenmarker für geweberesidente Zellen muss allerdings beachtet werden,

dass diese Marker selten eindeutig sind, da beispielsweise CD69 auch als Aktivierungsmarker beschrieben wurde. Allerdings konnte gezeigt werden, dass geweberesidente, CD69-positive Zellen im Menschen, nicht dieselben Charakteristika wie aktivierten T-Zellen haben¹⁰¹. Des Weiteren muss bei dem Oberflächenprotein CD69 beachtet werden, dass dieser Marker alleine nicht ausreicht um das Verweilen der Zellen im Gewebe zu belegen¹⁰². Aus diesem Grund wird die intravenöse Färbung von CD45 als weitere Informationsquelle über das Verbleiben im Gewebe genutzt. Marker von geweberesidenten Zellen, wie CD103, welcher standardmäßig in der Literatur beschrieben wird, waren in den Nieren der Versuchstiere nicht zu detektieren. CD103 wird vor allem auf CD8⁺ T-Zellen exprimiert, weniger auf CD4⁺ Zellen¹⁰³. Zudem ist CD103 eher in mukosalem Gewebe wie dem weiblichen Reproduktionstrakt oder dem Darm zu finden¹⁰¹. Die Akkumulation von Th17- und $\gamma\delta$ -T-Zellen in den Nieren der Versuchstiere ist ein Hinweis auf ihre essentielle Bedeutung in der Abwehr der Infektion. Th17- und $\gamma\delta$ -T-Zellen sind *in vitro* und *in vivo* in der Lage IL-17A zu produzieren, welches im Anschluss für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist. Für die Beseitigung von überwiegend extrazellulären Bakterien, wie den Staphylokokken, sind neutrophile Granulozyten von essentieller Bedeutung¹⁰⁴. Für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist allerdings anzumerken, dass Mäuse wesentlich weniger Neutrophile im Blut haben als Menschen (10-25% in Mäusen vs. 50-70% im Menschen)¹⁰⁵. Daher ist nicht sicher, ob bei Infektionen im Menschen ebenfalls im gleichen Maße die Akkumulation von Th17- und $\gamma\delta$ -T-Zellen auftritt, da direkt mehr Neutrophile für die Bekämpfung der Infektion zu Verfügung stehen und die Bakterien möglicherweise direkt bei Eintritt in die Blutbahn effektiver bekämpft werden können. Die stark expandierenden Th17- und $\gamma\delta$ -T-Zellen waren nach polyklonaler Stimulation in der Lage *in vitro* IL-17A und IFN- γ zu produzieren (Abb. 8). Diese Zellen akkumulierten hauptsächlich in der Niere, in der Milz waren generell wenig IL-17A-produzierende Zellen vorhanden, unabhängig von der Infektion. Dies lässt auf eine spezifische Immunantwort in der Niere, dem Ort der stärksten Infektion, durch die induzierten Th17- und $\gamma\delta$ -T-Zellen schließen. Welche Rolle den Th17- und $\gamma\delta$ -T-Zellen im Detail zukommt, lässt sich anhand dieser Daten nicht endgültig klären, da in den hier verwendeten Modellen immer beide Zelltypen zugleich vorhanden waren. Für diese Art Fragestellung ist die Verwendung von genetisch veränderten Mäusen notwendig, denen entweder $\gamma\delta$ -T-Zellen oder Th17-Zellen fehlen. Des Weiteren könnte auch das zentrale Zytokin, IL-17A, ausgeschaltet

werden, um den entsprechenden Beitrag der Zellen zu bestimmen. Bei den gesamten Infektionsversuchen muss allerdings auch die Rolle der humoralen Immunantwort mit beachtet werden. In eigenen Versuchen (Daten nicht gezeigt) konnte beispielsweise auch während der Infektion ein höherer Titer an *S. aureus*-spezifischen Maus IgG Antikörpern gezeigt werden.

Im analysierten Infektionszeitraum (maximal 120 Tage, ohne Ampicillin) wurde neben Milz und Niere auch noch die Leber untersucht. Auffällig ist hierbei, dass die Niere die höchste Frequenz an $\gamma\delta$ -T-Zellen aufwies, wie auch schon in den früheren analysierten Zeitpunkten. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen aus der Niere produzierten fast vollständig IL-17A, während dies in den anderen untersuchten Organen nicht der Fall ist. Dies lässt auf eine andere Art von $\gamma\delta$ -T-Zellen schließen³⁹. Die Frequenz der Th17-Zellen war auch in einer chronischen Infektion nach 120 Tagen, erhöht. Die langfristige Verweildauer unterstreicht ihre Bedeutung für die Kontrolle der Infektion. Die Infektion mit Listerien veränderte das Immunmilieu in der Niere ebenfalls. Allerdings verursachte die Infektion mit Listerien nur einen leichten Anstieg von Th1- und $\gamma\delta$ -T-Zellen, auf einem wesentlich geringeren Niveau als im Staphylokokken-Infektionsmodell. Es ließen sich T-Zellen, die spezifisch für Listerien waren, nach der Infektion in der Niere nachweisen. Der Nachweis war nicht nur kurz nach der Infektion (Tag 9) möglich, sondern auch 2 Monate nach Infektion. Dies spricht erneut für die Generierung langlebiger T-Gedächtniszellen (Abb. 11). Th17-Zellen wurden nach Listerien-Infektion nicht generiert, da IL-17A praktisch keine Relevanz in der Bekämpfung der intrazellulären Bakterien hat und daher auch keine Th17-Zellen benötigt werden. Die Infektion mit Listerien wird von den Mäusen in der Regel nach 10-14 Tagen komplett durch das eigene Immunsystem beseitigt, sodass hier keine chronische Infektion wie im Infektionsmodell mit dem *S. aureus* entsteht. Außerdem sind die primär betroffenen Organe einer Infektion mit Listerien die Milz und die Leber, nicht die Niere. Trotzdem konnte auch in der Niere die Entstehung der T-Gedächtniszellen nachgewiesen werden. Es konnten in der Niere erhöhte Frequenzen auch an $\gamma\delta$ -T-Zellen identifiziert werden. Dies geht mit Studien einher, die eine Relevanz dieser $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Listerieninfektionen belegen, sodass die Beobachtungen hier in dieselbe Richtung gehen^{106,107}.

6.2 Analyse der Persistenz von *S. aureus* induzierten residenten Gedächtniszellen

Charakteristische Merkmale von geweberesidenten T-Zellen sind ihre lange Verweildauer und geringe Teilungsrate in den jeweiligen Organen. Mit den oben beschriebenen Infektionsmodellen zur Generierung von Gedächtniszellen, lassen sich diese Zellen induzieren und auch nach längerer Zeit nachweisen. Allerdings ist dadurch nicht bewiesen, dass es wirklich genau die Zellen sind, die auch induziert wurden und, dass die Zellen nicht aus anderen Geweben einwandern. Der Goldstandard für die Untersuchung von geweberesidenten Gedächtniszellen sind Parabiose-Experimente, bei denen die Blutkreisläufe von zwei Organismen über lange Zeit verbunden werden. Mäuse können unter diesen Bedingungen über Wochen gehalten und im Anschluss die Verteilung der untersuchten Zellen zwischen den Mäusen untersucht werden¹⁰⁸. Aus Tierschutzrechtlichen Gründen sind diese Experimente in Deutschland nicht möglich, daher wurde ein alternativer Ansatz mit transgenen Kaede-Mäusen gewählt. Wie zuvor beschrieben, wurden Kaede-Mäuse infiziert und mit Ampicillin behandelt. 60 Tage nach der Infektion wurde eine Niere während einer Operation freigelegt und mit blauen Licht (385 nm) bestrahlt¹⁰⁹. Die Photokonversionsrate von CD4⁺ T-Zellen in der bestrahlten Niere lag an Tag 1 nach der Bestrahlung bei knapp 50%, in den anderen untersuchten Organen wurden keine Zellen photokonvertiert. Die Frequenz der markierten Zellen ging über die Dauer des Experiments zurück, was sich entweder durch das Auswandern der Zellen erklären lässt oder durch Abbau und die Neuproduktion des Kaedeproteins, welches im Anschluss wieder grün und nicht rot ist. Die Auswanderung der Zellen würden dem Konzept der geweberesidenten Zellen widersprechen, während auch in den residenten Zellen mit verändertem Metabolismus ein regulärer Auf- und Abbau von Proteinen anzunehmen ist⁶⁴. Trotz Abnahme der Frequenz an photokonvertierten Zellen lassen sich aber über die noch markierten Zellen Aussagen treffen. So waren die CD4⁺ T-Zellen mindestens drei Wochen im Gewebe zu finden, zudem haben diese markierten Zellen einen residenten Th17-Phänotyp (CD69⁺ CD45iv⁻ RORγt⁺). Vier Wochen nach der Photokonversion war zudem eine signifikant höhere Frequenz an Th17-Zellen in der photokonvertierten Fraktion im Vergleich zur nicht konvertierten Fraktion nachweisbar. Für diese CD4⁺ T-Zellen lässt sich also annehmen, dass diese Zellen nach der Photokonversion mindestens vier Wochen stabil in dem Gewebe verweilen können. Die Photokonversion fand acht Wochen nach Infektion statt. Dies deutet

daraufhin, dass diese Zellen in der akuten Phase der Infektion, lange vor der Photokonversion, generiert worden sind und somit noch länger als die untersuchten vier Wochen stabil im Gewebe verbleiben. Für die $\gamma\delta$ -T-Zellen ließ sich im Untersuchungszeitraum von drei Wochen nach Photokonversion eine noch höhere Rate an in der Niere verbleibenden photokonvertierten Zellen nachweisen. Daraus kann geschlossen werden, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen ebenfalls lange im Gewebe verweilen können. Neben dem Aspekt unbekannten Haltbarkeit der Photokonversion durch Protein Auf- bzw. Abbau ist die relativ geringe Penetrationstiefe des blauen Lichts von knapp 100 nm ein Nachteil. In der Niere wird so nur ein Teil der Rinde photokonvertiert, tiefer in der Niere sitzende Zellen werden nicht markiert. Allerdings befinden sich die meisten Glomeruli in der Rinde, sodass dieser Bereich auch von besonderem Interesse für die Analyse von T-Zellen ist. Die höhere Photokonversionsrate von $\gamma\delta$ -T-Zellen kann somit auch mit der Lokalisation dieser Zellen in Zusammenhang stehen. Es ist möglich, dass die $\gamma\delta$ -T-Zellen eher am Rand der Niere zu finden sind und die $CD4^+$ T-Zellen tiefer im Gewebe vorliegen. Zur genauen Analyse würden sich bildgebende Verfahren anbieten, bei denen die Lokalisation der geweberesidenten T-Zellen besser untersucht werden kann. Die Langlebigkeit der geweberesidenten Zellen ist in verschiedenen Publikationen ebenfalls beschrieben^{110,70}. Auch in transplantierten Organen konnten im Menschen langlebige geweberesidente T-Zellen nachgewiesen werden¹¹¹.

6.3 Der Einfluss bakteriell induzierter geweberesidenten T-Zellen auf renale Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen basieren auf einer gestörten Toleranz des Immunsystems die dazu führt, dass das Immunsystem körpereigene Strukturen angreift. Wie im bisherigen Verlauf gezeigt verändern bakterielle Infektionen das Immunsystem und speziell das „immunologische Gedächtnis“ von ansonsten gesunden Labormäusen. Der Einfluss dieses veränderten Immunsystems, das im Menschen durch den ständigen Kontakt zu Pathogenen gegeben ist, auf nachfolgende Autoimmunerkrankungen sollte im Folgenden weiter untersucht werden.

In Studien konnte bereits ein Einfluss von geweberesidenten Gedächtniszellen auf Autoimmunerkrankungen sowohl im Menschen, als auch in Mausmodellen gezeigt werden^{73,74,112}. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass meist keine Mechanismen beschrieben werden, die zur Generierung dieser geweberesidenten T-Zellen beitragen. Turner et al. nutzen Extrakte aus *Dermatophagoides pteronyssinus* zur Generierung von geweberesidenten CD4⁺ T-Zellen in der Lunge und nachfolgenden asthmatischen Erkrankungen⁷⁴. Zundler et al. untersuchen die Rolle von geweberesidenten T-Zellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Menschen und Mäusen, zeigen hier aber meist artifizielle Systeme basierend auf T-Zelltransferexperimenten in RAG Mäuse⁷³. Nachweise zu beschriebenen Charakteristika der geweberesidenten T-Zellen fehlen. Dennoch ist auch hier eine erhöhte Anzahl von geweberesidenten T-Zellen mit dem Krankheitsverlauf assoziiert, sodass mehr geweberesidente Zellen auf einen aggravierten Krankheitsverlauf hindeuten⁷³. In der hier vorliegenden Arbeit wurden nun die bisher beschriebenen Infektionsmodelle mit Autoimmunmodellen für Nierenerkrankungen kombiniert. Mäusen wurde nach ausgeheilter Listerieninfektion eine Glomerulonephritis induziert und mit einer Kontrollgruppe ohne Infektion verglichen. Hier zeigt sich (Abb. 15), dass eine vorherige Infektion mit Listerien zu keinem veränderten Krankheitsverlauf führt. Die Zahl der Halbmonde in den Glomeruli war nicht erhöht, die Proteinurie nicht signifikant verstärkt und der Blutharnstoff nicht verändert. Die listerienspezifischen Zellen waren mittels antigenspezifischer Stimulation in der Niere insgesamt 70 Tage nach der ursprünglichen Infektion noch nachweisbar. Dies zeigt, dass diese Zellen noch in der Niere lokalisiert waren. Im NTN-Modell für die cGN sind in der frühen Phase die Th17-Zellen maßgeblich für den renalen Schaden verantwortlich. Diese Zellen sind

aber bei der Kontrolle der Listerieninfektionen nicht entscheidend beteiligt und sind somit nur marginal verändert¹¹³. An späteren Zeitpunkten der cGN im NTN-Modell (ab Tag 10 nach Induktion) sind die Th1-Zellen für den Schaden verantwortlich, die auch zur Bekämpfung von Listerien nötig sind⁹⁷. Hier scheint aber kein verstärkender Einfluss auf die cGN vorzuliegen. Nach antigenspezifischer Stimulation ließ sich bei allen Gruppen mit induzierter Nephritis keine signifikant veränderte Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Zellen feststellen, unabhängig von der vorherigen Listerieninfektion.

Die zuvor beschriebene Infektion mit *S. aureus* führte im Gegensatz zu einer Infektion mit Listerien in den Labormäusen ohne Ampicillinbehandlung zu einer chronischen Infektion, bei der die Bakterien in einigen Mäusen nicht komplett beseitigt wurden. Diese vorherige Infektion führte zu einer verstärkten nachfolgenden cGN (Abb. 18). Der Nierenschaden war stark erhöht, ebenso der Blutharnstoff. Hierbei ist allerdings nicht klar, ob nun noch Bakterien in der Niere vorhanden waren. Daher wurde in weiteren Versuchen die Ampicillinbehandlung in den experimentellen Ablauf eingeführt. In einem ähnlich aufgebauten Versuch mit *S. aureus* Infektion, Antibiotikabehandlung und anschließender cGN Induktion zeigte sich ein vergleichbares Bild. Mäuse mit vorheriger Infektion hatten im Vergleich zur cGN Versuchsgruppe ohne Infektion eine leicht erhöhte Proteinurie (Abb. 19) und erneut eine erhöhte Zahl an Halbmonde. Diese Krankheitssymptome waren im Vergleich zu Versuchen ohne Antibiotikabehandlung allerdings auf einem verringerten Level.

Die Charakterisierung der T-Zellantwort zeigte auch in Versuchen mit Ampicillinbehandlung und cGN Induktion eine erhöhte Frequenz an Th17-Zellen mit geweberesidentem Phänotyp in der Niere, aber nicht der Milz. Diese Zellen konnten nach Stimulation in hohem Maße IL-17A produzieren. An allen Mäusen mit cGN war, unabhängig von der Infektion, auch die IFN- γ Produktion an Tag 10 der cGN erhöht. Die Milz zeigte nur eine leichte Zunahme an IL-17A-produzierenden Zellen. Die Zunahme an IL-17A konnte auch über die von mRNA- Expression aus dem renalen Cortex bestätigt werden (Abb. 23). Hierbei zeigte sich auch eine stark erhöhte Expression der mRNA des Chemokins CXCL5, wenn auch nicht signifikant, welches vom IL-17A abhängig ist und bei der Rekrutierung von Neutrophilen eine Rolle spielt. Des Weiteren waren auch die mRNAs von verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen erhöht, was auf eine stärkere Entzündung in der gesamten Niere hindeutet, ausgelöst durch die Induktion der Nephritis nach überstandener

Infektion. Diese Versuche zeigen, dass eine Induktion von geweberesidenten Zellen in der Niere, ausgelöst durch die Infektion mit Staphylokokken, einen Einfluss auf die später ablaufende Autoimmunerkrankung in der Niere hat. Lee et al. haben in einem Modell der autoimmunen Encephalomyelitis ebenfalls einen Einfluss von CD4⁺ T-Zellen auf eine Autoimmunerkrankung gezeigt, allerdings in einem Transfermodell und ohne Fokus auf geweberesidente T-Zellen, die durch Pathogene induziert wurden¹¹⁴. Allerdings ist in dem verwendeten cGN Modell nicht klar, ob die Zellen, die durch den *S. aureus* induziert werden, auch in der späteren Phase der Nephritis durch die Produktion von IL-17A eine Rolle spielen. Um diese Frage zu beantworten wurden Kaede-Mäuse infiziert, mit Ampicillin behandelt und anschließend wurde die cGN induziert. Vier Tage nach cGN Induktion wurde eine Niere photokonvertiert und die Maus drei Tage später an Tag 7 der Nephritis untersucht. Im normalen Verlauf der experimentellen cGN beginnt ab Tag 5 eine Migration von Th17-Zellen aus anderen Geweben, unter anderem dem Dünndarm, in die Niere³⁸. Durch die Photokonversion an Tag 4 der cGN, können Zellen in der Niere markiert werden, die sich zu diesem Zeitpunkt bereits dort befanden. Dies ermöglicht es, die bereits vor Ort vorhandenen Zellen von denen zu unterscheiden, die im Verlauf der Nephritis erst in die Niere einwandern. Die photokonvertierten Zellen waren in der Lage sind IL-17A nach Stimulation zu produzieren. Dies zeigt, dass die Zellen, die durch den *S. aureus* in der Niere induziert wurden, auch in der cGN eine Rolle spielen können, da sie in der Lage sind für die Pathogenese wichtige pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren. Eine Verstärkung des Nierenschadens nach Infektion konnte auch für eine Infektion mit *Citrobacter Rodentium* gezeigt werden³⁸. Hierbei ist allerdings nicht die Niere von der Infektion betroffen.

6.4 Der Einfluss einer vorhergehenden *S. aureus* Infektion auf die experimentelle autoimmune Glomerulonephritis (EAG)

Neben dem NTN-Modell für die cGN wurde ein weiteres renales Autoimmunmodell analysiert, bei dem der gesamte Krankheitsverlauf von der Entstehung der Autoantikörper bis hin zur Entwicklung einer starken Nierenerkrankung. Die von T-Zellen mitgetragen wird, abgedeckt ist. Das hier verwendete Modell für die experimentelle autoimmune Glomerulonephritis (EAG) wurde in der Arbeitsgruppe intensiv untersucht und es konnte unter anderem eine essentielle Rolle für Th17-Zellen nachgewiesen werden⁴⁵. Die Mäuse, die zuvor mit *S. aureus* infiziert wurden, zeigten in diesen Versuchen ein vermindertes Überleben und einen stärkeren Nierenschaden (Abb. 25) sowie eine Zunahme an Th17-Zellen mit geweberesidentem Phänotyp. Für die renalen $\gamma\delta$ -T-Zellen konnte ebenfalls eine Zunahme gezeigt werden, ähnliches gilt für die IL-17A Produktion von $\gamma\delta$ - und CD4⁺ T-Zellen. Der Einfluss einer vorhergehenden *S. aureus* Infektion auf die EAG ist also ähnlich wie beim NTN Modell der cGN. Eine vorherige Infektion verschlimmert die Autoimmunerkrankung. Hier ist auch davon auszugehen, dass dies zum Teil durch die stark expandierten Th17- und $\gamma\delta$ -T-Zellen begründet ist. Die beiden Zelltypen sind in der Lage die in diesem Model wichtigen pro-inflammatorischen Zytokine zu produzieren.

6.5 Die Bedeutung von IL-17A in der durch die Infektion von *S. aureus* potenzierten cGN

In bisherigen Studien konnte die Bedeutung von IL-17A für renale Autoimmunerkrankungen bereits gezeigt werden^{45,55,39}. Da die bakterielle Infektion mit Staphylokokken große Mengen an IL-17A produzierenden Zellen induziert, sollte zunächst untersucht werden, ob die erhöhte Menge an IL-17A ursächlich für den erhöhten Schaden ist. Hierzu wurde ein therapeutischer Ansatz gewählt, bei dem die Mäuse mit IL-17A-neutralisierenden Antikörpern im frühen Verlauf der cGN behandelt wurden. Dies sorgte für eine Reduktion des Schadens in der cGN, sodass kein Unterschied mehr zwischen einer infizierten und einer nicht infizierten Maus mit cGN bestand. Die Proteinurie war in der zuvor infizierten Versuchsgruppe tendenziell noch höher, ebenso Blutharnstoff und Cholesterinlevel, allerdings nicht signifikant. Der reduzierte Gewebeschaden in der infizierten Gruppe mit anschließender cGN deutet auf eine pathogene Rolle des IL-17A hin. Allerdings wurden die Mäuse trotz der

neutralisierenden Antikörper noch krank und bildeten glomeruläre Halbmonde. Dies könnte daran liegen, dass nicht das gesamte IL-17A neutralisiert wurde. Ebenso tritt mit induzierter cGN eine Proteinurie auf, durch die auch die neutralisierenden Antikörper über den Urin ausgeschieden werden könnten. Die T-Zellantwort wurde ebenfalls charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die Frequenz an $\gamma\delta$ -T-Zellen und Th17-Zellen, wie in bisherigen Experimenten, nach vorheriger Infektion in der Niere signifikant erhöht waren, aber nicht in der Milz. Für die produzierten Zytokine nach Stimulation zeigte sich ein ähnliches Verhalten. Mittels *real-time* PCR zeigte sich kein signifikanter Unterschied der *Cxcl5* Expression in der Niere. Dies deutet daraufhin, dass die Blockade des IL-17A funktioniert und *in vivo* den verringerten Schaden erklären könnte, da IL-17A seine Wirkung nicht entfalten kann. Des Weiteren ist zu beachten, dass Th17-Zellen nicht nur IL-17A produzieren, sondern auch TNF- α , teils IFN- γ oder auch IL-17F und IL-22. Diese Zytokine können auch pro-inflammatorisch wirken und den Krankheitsverlauf beeinflussen. Daher wurde zusätzlich zu dem bisherigen Ansatz ein weiterer Ansatz gewählt, bei dem die induzierten Zellen depletiert werden sollten. Hierzu wurden Fate_Deleter Mäuse verwendet, die eine gezielte Depletion der vormals IL-17A produzierenden Zellen über die Injektion von Diphtherietoxin erlauben. In Abb. 32 zeigt sich, dass nach dreimaliger Applikation von Diphtherietoxin eine deutliche Depletion der Th17-Zellen mit geweberesidenten Phänotyp sichtbar ist. Die Induktion der cGN in infizierten Mäusen bzw. Kontrollen nach Depletion führte zu einem stark reduzierten Schaden in den Nieren und keinem Unterschied zwischen den Versuchsgruppen, wobei dies auch für die IL-17A Produktion nach Stimulation gilt.

Alle Experimente zeigen deutlich, dass eine zuvor überstandene Infektion mit *S. aureus* zu einem aggravierten Schaden einer nachfolgenden Autoimmunerkrankung in der Niere führen kann. Dies ist auf die vermehrte Präsenz von Th17-Zellen zurückzuführen, die in der cGN IL-17A und andere pro-inflammatorische Zytokine produzieren können. Die Neutralisierung des IL-17A oder die Depletion der IL-17A produzierenden Zellen verbessert den Krankheitsverlauf und hebt den zuvor starken Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Gruppen im Verlauf der cGN auf. Allerdings ist aus den vorliegenden Ergebnissen nicht klar zu schließen, dass nach der Infektion Th17, $\gamma\delta$ -T-Zellen oder beide Zellpopulationen für die Beobachtungen verantwortlich sind. Die generelle Relevanz von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Modell der cGN konnte bereits belegt werden³⁹. Zur Klärung der Fragestellung sind Studien

mit KO-Mäusen für die jeweiligen Zelltypen notwendig. Idealerweise wären dies Mäuse, in denen man die Zelltypen durch Diphtherietoxin depletieren kann, um sie erst nach überstandener Infektion dann vor oder während der cGN zu entfernen. Alternative Ansätze wären auch die Depletion via NAD⁺ Injektion, um gezielt residente Zellen mit hoher Expression von P2X7 oder ART2 zu depletieren⁷³. In diesem Ansatz ist allerdings keine große Spezifität für einen Zelltyp vorhanden^{115,116}. Es wären auch Studien denkbar, in denen mit RAG-defizienten Mäusen, Tiere ohne T- und B-Zellen gearbeitet wird, hierbei könnten gezielt CD4⁺ oder $\gamma\delta$ -T-Zellen durch T-Zelltransfer in die Mäuse gebracht werden, um die Bedeutung des jeweiligen Zelltyps zu untersuchen¹¹⁷. Diese Modelle sind allerdings wieder artifizieller als andere Modelle, da in RAG-defizienten Mäusen nur ein begrenzt mit der Realität vergleichbares Immunsystem vorhanden ist.

6.6 T-Zellrezeptorunabhängige Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt klassischerweise über den TCR sowie kostimulatorische Signale. Erst diese Stimulation über mehrere Wege führt zur vollen Aktivierung der T-Zelle. Es gibt allerdings Studien zu CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die eine Aktivierung ohne klassisches T-Zellrezeptorsignal beschreiben^{88,118}. Im hier verwendeten Modell für die cGN wird Schafserum in die Mäuse injiziert, wodurch die cGN ausgelöst wird. Hierbei sollte zunächst untersucht werden, ob die Zellen, die sich im Gewebe befinden, durch die Injektion des Serums aktiviert werden. Die verwendeten Reportermäuse (Kaede/IL-17A-Katushka) besitzen das photokonvertierbare Kaedeprotein sowie ein Reporterprotein für IL-17A. Durch den Einsatz dieser Reportermäuse konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die vor Induktion der cGN vorhanden waren, zwei Tage nach cGN Induktion aktiv IL-17A produzieren. Durch die Analyse des produzierten IL-17A direkt aus homogenisierten Nieren, konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die *S. aureus* infiziert waren, im Vergleich zu reinen cGN Gruppe an Tag 2 der cGN mehr IL-17A produzierten. Die frühe Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen zeigt, dass die T-Zellen vermutlich über einen anderen Weg, als über den klassischen T-Zellrezeptorsignalweg aktiviert wurden. Die Analyse des produzierten IL-17A über die direkte Bestimmung des Proteins zeigt zudem, in welchen Mengen das IL-17A früh in der Nephritis produziert wird. Allerdings ist hier keine Zuteilung zum produzierenden Zelltyp möglich. Hierfür würden sich

Western Blot-Analysen aus gereinigten CD4⁺ oder $\gamma\delta$ -T-Zellen im frühen Stadium der cGN eignen oder der Einsatz von Mäusen, die durch Reporterproteine ohne Stimulation die Analyse der Zytokinproduktion ermöglichen.

Die *in vivo* gewonnenen Erkenntnisse sollten zunächst *in vitro* reproduziert werden. Basierend auf früheren Publikationen und eigenen Daten (Anhang 10.2 D) wurden pro-inflammatorische Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-18 und IL-23) ausgewählt, die in der frühen Phase der Nephritis in der Niere vorhanden sind³⁹. Diese wurden genutzt, um durchflusszytometrisch gereinigte CD4⁺ T-Zellen *in vitro* zu stimulieren. Die stimulierten Zellen aus der Niere produzierten IL-17A, aber kein GM-CSF. In der Milz konnten nach Stimulation mit den verwendeten Zytokinen lediglich geringe Mengen an IL-17A detektiert werden. Dies lässt auf unterschiedliche T-Zellpopulationen in Niere und Milz schließen, wie es nach *S. aureus* Infektion zuvor beschrieben wurde. Die nach Infektion in der Niere vermehrt auftretenden Th17-Zellen, scheinen auf einem alternativen Weg ohne Stimulation des T-Zellrezeptors aktiviert zu werden und pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren. Durch die durchflusszytometrische Sortierung konnte eine Kontamination mit $\gamma\delta$ -T-Zellen, die ebenfalls viel IL-17A produzieren, ausgeschlossen werden. Für diese $\gamma\delta$ -T-Zellen könnte ein ähnlicher Ansatz durchgeführt werden, um dort ggf. ebenfalls die Aktivierung über Zytokine zu untersuchen. Generell passt die Beobachtung der T-Zellrezeptorunabhängigen Aktivierung durch pro-inflammatorische Zytokine in das NTN-Model der experimentellen cGN. In diesem Modell sind gerade in der frühen Phase pro-inflammatorische Zytokine in der Niere vorhanden (Anhang 10.2 D), die bereits anwesende T-Zellen aktivieren können. In zuvor gesunden Mäusen würde diese Aktivierung zu nur geringem Schaden führen, da in diesem Zustand wenig residente T-Zellen in der Niere und in anderen peripheren Organen vorhanden sein sollten. Sind allerdings durch Pathogene induzierte T-Zellen bereits vor Ort kann dies zu einer frühen und starken Aktivierung der vorhandenen T-Zellen führen, welche den durch die cGN induzierten Schaden massiv erhöhen. Lee et al. zeigen ähnliche Aktivierungsexperimente für T-Zellen *in vitro* mit pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-7, IL-23 und IL-1 β), unterscheiden hierbei aber zwischen naiven und Gedächtniszellen und nicht nach Zellen verschiedenen Ursprungs¹¹⁴. Im Menschen, der üblicherweise zahlreiche Kontakte zu Pathogenen hat lässt sich ähnliches vermuten, da hier bereits viele T-Zellen in den Geweben vorliegen. Im hier analysierten NTN-Model findet eine Aktivierung der T-Zellen statt, die nicht dem klassischen

Konzept entspricht. Die Zellen werden durch *S. aureus* induziert und im späteren Verlauf nach induzierter cGN durch ein anderes „Signal“ als die ursprünglich bekämpften Staphylokokken aktiviert. Dies lässt darauf schließen, dass geweberesidente T-Zellen sowohl positive Funktionen, wie die rasche lokale Immunantwort, als auch negative Funktionen haben können. Negativ ist wie hier gezeigt die Aktivierung durch ein anderes Ereignis, in diesem Fall die Induktion der renalen Autoimmunerkrankung, was zu einer verstärkten Immunpathologie führen kann. Somit konnte durch verschiedene methodische Ansätze gezeigt werden, dass T-Zellen nach Induktion der cGN *in vivo* durch einen TCR unabhängigen Mechanismus aktiviert werden können. Im Model einer autoimmunen Nierenerkrankung zeigt sich dieser Mechanismus auch als relevant in einem Krankheitsmodel.

Aufgrund der Identifikation dieses TCR-unabhängigen Aktivierungsweges sollte ein therapeutischer Ansatz in der cGN untersucht werden. Hierbei sollten eben jene zur Aktivierung genutzten pro-inflammatorische Zytokine *in vivo* durch monoklonale Antikörper neutralisiert und somit im Idealfall eine Aktivierung der T-Zellen verhindert werden. In Abb. 36 zeigt sich nach mehrmaliger Applikation der neutralisierenden Antikörper in der frühen Phase der cGN, dass ein verstärkter Schaden der Niere verhindert werden kann. Der verringerte Schaden lässt sich durch eine fehlende Aktivierung der T-Zellen im Gewebe durch die identifizierten Zytokine erklären. Die Analyse der T-Zellantwort nach Neutralisation der Zytokine zeigte eine leicht verringerte Frequenz an residenten Th17-Zellen und eine erhöhte Frequenz an regulatorischen T-Zellen. Die neutralisierten Zytokine sind zum Teil auch in der Differenzierung von naiven T-Zellen hin zu Th17-Zellen beteiligt, was eventuell die leicht verringerte Frequenz dieses T-Zellsubtyps erklären könnte. Verschiebt sich das Verhältnis nun von pro-inflammatorischen T-Zellen hin zu den regulatorischen, anti-inflammatorischen T-Zellen, könnte dies eine weitere Erklärung der verringerten Schadens sein, da Tregs pro-inflammatorische T-Zellen regulieren und in ihrer Aktivität hemmen können¹¹⁹. Dies ist allerdings experimentell nicht bestätigt worden, hierfür würde sich eine tiefere Analyse der produzierten Zytokine anbieten, um auch anti-inflammatorische Zytokine zu untersuchen. Theoretisch bieten sich aber auch durch dieses Konzept therapeutische Ansätze, da eine *in vivo* Expansion von regulatorischen T-Zellen bereits in der Erprobung ist, um das anti-inflammatorische Potential dieser Zellen auszunutzen¹²⁰. Um die Rolle der Aktivierung der residenten T-Zellen im Detail zu untersuchen wäre der Ansatz von Reportermäusen sinnvoll, die bei der Produktion

von Zytokinen auch fluoreszierende Reporterproteine exprimieren. Diese wiederum könnten durchflusszytometrisch ohne vorherige Stimulation analysiert werden, um einen Überblick über die Zytokinproduktion *in vivo* zu bekommen. Auch in dieser Art von Versuchen bleibt die Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen zunächst ungeklärt, da ihre Beteiligung am induzierten Nierenschaden im Falle der vorherigen *S. aureus* -Infektion nicht bekannt ist.

Zusammenfassend zeigt sich, dass durch die Applikation von monoklonalen Antikörpern, welche die pro-inflammatorische Zytokine neutralisieren, die Aktivierung von T-Zellen im Modell der cGN verhindert und der verursachte Gewebeschaden der Niere somit reduziert werden kann. Damit allgemeine Aussagen getroffen werden können, wären vergleichbare Versuche im EAG Model denkbar, um auch hier die Aktivierung verhindern zu können. Allerdings sind derartige Studien experimentell um Einiges anspruchsvoller. Dennoch ist eine Charakterisierung in weiteren Modellen der Autoimmunität sinnvoll, eventuell auch unter Nutzung von anderen Bakterien und anderen Autoimmunmodelle, die nicht die Niere betreffen und trotzdem IL-17A

6.7 Analysen von gesundem Humanem Nierengewebe

Die Analyse von humanem Nierengewebe ist neben den Mausmodellen für renale Autoimmunerkrankungen eine wichtige Informationsquelle zum Verständnis der Biologie der untersuchten Erkrankungen. Bisherige Studien zeigten eine Assoziation von Th17-Zellen und der ANCA-Vasculitis³⁸. Hierbei konnte ein gehäuftes Vorkommen, von Th17-Zellen in der Niere der Patienten nachgewiesen werden. Diese Beobachtung beruhte auf Analysen von Nierenbiopsien von Patienten. In den entsprechenden Blutproben war die Assoziation aber nicht nachweisbar³⁸. Allerdings ist es von besonderem Interesse neben Gewebe aus Patienten auch gesundes Material zu analysieren, um einen Überblick über die normale physiologische Situation vor einer Erkrankung zu gewinnen. Die Verfügbarkeit von gesundem Nierengewebe ist generell gering, da Nieren gut transplantierbar sind und so nahezu jede gesunde Niere von Organspendern Verwendung findet. Die Analyse von Nierengewebe aus Biopsien, wobei generell nur geringe Mengen an Probenmaterial gewonnen werden, ist aus ethischen Gründen nur bei Patienten, nicht aber bei gesunden Probanden möglich. Tumornephrektomien, bei denen die gesamte Niere einschließlich des nicht vom Tumor befallenen Gewebes entnommen wird, bieten die Möglichkeit gesundes

Nierengewebe zu untersuchen. Für einige dieser Proben konnte zusätzlich Blut des gleichen Patienten analysiert werden, was den direkten Vergleich zwischen zirkulierenden Zellen und Zellen aus dem Gewebe ermöglichte. In diesen Proben wurde die Fähigkeit der T-Zellen zur Produktion von Zytokinen analysiert. Abb. 39 zeigt, dass IL-17A von mehr CD4⁺ T-Zellen aus der Niere produziert wurde als aus den Zellen im Blut. Vergleichbares gilt für das von Th2-Zellen produzierte IL-4. Mit 7% IL-17A produzierenden Zellen lag die Frequenz dieser Th17-Zellen in der Niere über der von Nieren aus gesunden Mäusen. Dies könnte unter anderem auf den bereits erwähnten Effekt von zuvor überstandenen Infektionen zurückzuführen sein, die wiederum geweberesidenten Gedächtniszellen induziert haben. Für die pro-inflammatorischen Zytokine TNF-α und IFN-γ ließ sich nur eine Tendenz zu einer erhöhten Produktion in der Niere nachweisen. Dies zeigt, dass auch in gesundem menschlichem Nierengewebe T-Zellen zu finden sind, die pro-inflammatorische Zytokine produzieren können. Es lassen sich bei humanen Proben generell schwerer Aussagen treffen, ob die Zellen geweberesident sind oder nicht, da viele experimentelle Möglichkeiten aus Mausmodellen bei humanen Probanden nicht anwendbar sind. Es werden in der Regel ähnliche Marker für die Identifizierung geweberesidenter T-Zellen genutzt, wie in der Maus, vor allem CD69 und CD103. Allerdings wurden auch Zellen mit geweberesidenten Phänotyp beschrieben, die im Menschen in der Zirkulation zu finden sind¹²¹. Eine bessere Identifizierung als über die alleinige Analyse von Oberflächenmarkern lässt sich über die Sequenzierung des Transkriptoms vornehmen. Kumar et al. konnten eine Gruppe von Genen identifizieren, die vor allem in humanen geweberesidenten T-Zellen vorhanden ist und beispielsweise im CD4⁺ T-Zellen aus dem Blut weniger stark exprimiert ist¹⁰¹. Für die Analyse der humanen Nieren ist ein Ansatz mit Sequenzierung der residenten Zellen ebenfalls anwendbar und würde sich auch für den Vergleich von Patienten und gesunden Probanden anbieten, um ähnlich zu Zundler et al., eine Korrelation von geweberesidenten T-Zellen und Krankheitsverläufen nachzuweisen⁷³. Auch eine Analyse von Nieren nach Transplantationen wäre denkbar, um im Menschen genauer die Langlebigkeit von geweberesidenten T-Zellen zu untersuchen, analog zu Snyder et al. in der Lunge¹¹¹.

Generell ist der Einfluss von geweberesidenten T-Zellen auf Erkrankungen im Menschen noch weitgehend unerforscht, ebenso der Einfluss von bakteriellen Infektionen auf nachfolgende Autoimmunerkrankungen. In Studien konnte eine

Assoziation von *S. aureus* mit der Granulomatöse Polyangiitis (auch cANCA-assoziierte Vaskulitis oder früher Wegener-Granulomatose) gezeigt werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine Beteiligung von Th17-Zellen sein, zumal eine Behandlung mit Antibiotika eine Besserung zeigte^{60,122,123}. Auch im Mausmodell konnte ein abgeschwächter Krankheitsverlauf nach Antibiotikatherapie beobachtet werden, wodurch eine chronische Infektion der Nieren in den Mäusen verhindert wurde (Abb. 18 und 19), was sich in einer geringeren Menge an Halbmonden niederschlägt. Denkbar wären frühere Behandlungszeitpunkte mit Ampicillin, um die Dauer der Bakteriellen Infektion mit der Schwere der nachfolgend induzierten Autoimmunerkrankung zu vergleichen. Um einen generellen Einfluss von Bakterien, auch normal auftretenden Umweltkeimen und des Mikrobioms auszuschließen, wäre die Verwendung von komplett keimfreien Mäusen denkbar, bei denen dann eine cGN induziert werden würde¹²⁴. Hinsichtlich des Mikrobioms gibt es große Unterschiede zwischen freilebenden Mäusen und kontrolliert gehaltenen Versuchstieren, was sich auch auf das Immunsystem der Mäuse auswirkt^{78,125}. Ebenso wäre der Einsatz anderer Krankheitserreger als Bakterien möglich, beispielsweise *Candida albicans*, einem pathogenen Pilz, welcher ebenfalls eine Th17 Antwort auslöst¹²⁶. Es sind auch Infektionsmodelle mit Viren oder Würmern, wie Helminthen, möglich, um gezielt CD8⁺ T-Zellen bzw. Th2-Zellen, die bei der Bekämpfung von Würmern eine Rolle spielen, zu induzieren und ihren Einfluss auf Autoimmunerkrankungen zu untersuchen. Diese Arbeit liefert einen bisher nicht bekannten Hinweis, auf die Assoziation von Infektionen sowie der daraus folgenden Entwicklung von geweberesidenten T-Zellen und Autoimmunerkrankungen in der Niere.

7. Ausblick

Die hier vorliegende Arbeit zeigt einhergehend mit vorherigen Publikationen eine Rolle von geweberesidenten T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen^{73,74}. Allerdings ist der exakte Mechanismus, wie geweberesidente T-Zellen Autoimmunerkrankungen beeinflussen noch nicht im Detail aufgedeckt. Die Arbeit liefert der Beobachtung der unabhängig vom T-Zellrezeptor stattfindenden Aktivierung von CD4⁺T-Zellen durch pro-inflammatorische Zytokine einen ersten Hinweis. Die Aktivierung von T-Zellen durch Zytokine, auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, wurde zwar schon vorher beschrieben, für geweberesidente T-Zellen war dies aber bisher nicht bekannt¹¹⁴. Unsere Beobachtung zeigt auch, dass geweberesidente T-Zellen nicht nur positive Rollen im Immunsystem einnehmen können, sondern auch an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind. Eine vollständige Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus liefert unsere aktuelle Studie aber noch nicht. Die Aufklärung der Mechanismen ist von entscheidender Bedeutung und sollte in zukünftigen Studien adressiert werden, beispielsweise durch die Nutzung von Einzelzellsequenzierung und/oder Proteomanalysen in frühen Stadien von experimentellen Modellen von Autoimmunerkrankungen. Dies könnte detaillierte Informationen über Prozesse in den Zellen ermöglichen, die an den Krankheiten beteiligt sind.

Die Information über die Aktivierung von geweberesidenten Zellen in Autoimmunerkrankungen könnte neue Ansätze für therapeutische Interventionen liefern. Durch die detaillierte Analyse von Signalwegen, die in den entsprechenden Zellen ablaufen und zur Aktivierung beitragen, könnten unterschiedliche potentielle Ziele für Therapeutika identifiziert werden. Denkbare Ansätze könnten die gezielte Depletion der geweberesidenten Zellen beinhalten. Dafür ist es allerdings nötig diese Zellen sehr gezielt mit Therapeutika attackieren zu können, beispielsweise durch monoklonale Antikörper oder Nanobodies. Erste Studien zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, bei denen Adhäsionsmoleküle von geweberesidenten T-Zellen als Ziel von Therapeutika dienen, laufen bereits^{127,128,129}. Zudem sollten verschiedene Autoimmunerkrankungen untersucht werden, um zu analysieren, ob ein konservierter Mechanismus für die Aktivierung von geweberesidenten T-Zellen in unterschiedlichen Erkrankungen und Geweben vorliegt.

8. Material und Methoden

8.1 Materialien

8.1.1 Geräte

Die in der Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit standardmäßig verwendeten Laborgeräten durchgeführt. Besondere Geräte finden sich in der folgenden Auflistung:

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Spezialgeräte

Gerät	Hersteller
Countess™ Automated Cell Counter	Invitrogen, Carlsbad, USA
FACS Cantoll	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Celesta	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS LSR Fortessa	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS AriaIII	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
GentleMACS Octo Dissociator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
TissueLyser II	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Viktor3 Multilabel Reader	Perkin Elmer, Inc., Waltham, USA
10X Genomics Chromium Controller	10x Genomics, San Francisco, USA

8.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien zur Herstellung von Gebrauchslösungen wurden von den Firmen Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) und ThermoFisher Scientific (Waltham, USA) bezogen. Chemikalien für besondere Verfahren und selbst hergestellte Puffer und Lösungen sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung verwendeter Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
BD FACS™ Lysing Solution 10x Konzentrat Brefeldin A	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland Sigma-Aldrich Chemie GmbH , München, Deutschland
Collagenase D	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Diphtheria Toxin (DT)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
DNAase I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Easycoll, Dichte 1.124g/ml	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd, 37% (V/V)	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Freunds inkomplettes Adjuvant (IFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Freunds komplettes Adjuvant (KFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
MultistixR 10 SG	Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland
Normales Rattenserum (NRS)	STEMCELL Technologies SARL, Köln, Deutschland
Pacific Orange™ Succinimidyl Ester (PacO)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Phosphat-gepuffertes Salz (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
SYBRR Green JumpStart™ Taq Ready Mix™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Erythrozytenlysepuffer pH 7.2	Vollentsalztes H ₂ O (VE H ₂ O) 155 mM Ammoniumchlorid 10 mM Kaliumhydrogencarbonat 100 µM EDTA
FACS-Puffer	0,25 M EDTA 2% BSA PBS
IMDM Komplettmedium	IMDM Medium 5% (v/v) Fetales Kälberserum 2 mM L-Glutamin 50 µg/ml Gentamycin 50 µM β-Mercaptoethanol
Saponinpuffer	PBS 0.1% (w/v) BSA 0.3% (w/v) Saponin

8.1.3 Verbrauchsmaterialien

Materialien für den allgemeinen Laborbedarf wurden bei den Firmen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland), Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich), Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold, Deutschland), BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) und Miltenyi Biotec GmbH, (Bergisch Gladbach, Deutschland) geordert.

8.1.4 Kits

Die für die Experimente verwendeten Kits wurden nach Herstellerangaben eingesetzt, bei Abweichungen sind diese im Methodenteil aufgeführt. In Tabelle 4 sind die verwendeten Kits mit Herstellern ausgewiesen.

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Kits

Bezeichnung	Hersteller
Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience, San Diego, USA
Legendplex Mouse Inflammation Panel	BioLegend, San Diego, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Miltenyi CD4	
Mouse Albumin ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA
LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
NucleoSpinR RNA Plus	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Duren, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA
StemCell CD4 Isolation Kit	STEMCELL Technologies SARL, Köln, Deutschland

8.1.5 Primer

Tabelle 5: Primer für quantitative PCR

Primer	Sequenz (5' > 3')
18S frw	CAC GGC CGG TAC AGT GAA AC
18S rev	AGA GGA GCG AGC GAC CAA A
<i>Cxcl1</i> frw	GCA CCC AAA CCG AAG TCA TAG
<i>Cxcl1</i> rev	CAA GGG AGC TTC AGG GTC AA
<i>Cxcl2</i> frw	CAC TGC GCC CAG ACA GAA
<i>Cxcl2</i> rev	CAG GGT CAA GGC AAA CTT TTT G
<i>Cxcl5</i> frw	TGG CAT TTC TGT TGC TGT TCA
<i>Cxcl5</i> rev	TTG CGG CTA TGA CTG AGG AA
<i>Il6</i> fw	TGGAAATCGTGGAATGAGAA
<i>Il6</i> rev	AAGTGCATCATCGTTGTTCTACA
<i>Il23a</i> fw	TCC CTA GGA CTC AGC CAA C
<i>Il23a</i> rev	TGG GCA TCT GTT GGG TCT
<i>Rorc</i> fw	ACC TCT TTT CAC GGG AGG A
<i>Rorc</i> rev	TCC CAC ATC TCC CAC ATT G

Tabelle 6: QuantiTect Primer Assays (Qiagen)

Zielgen	Katalognummer
<i>Il17a</i>	QT00103278
<i>Tbx21</i>	QT00129822

8.1.6 Antikörper

Mit Fluorochromen konjugierte Antikörper wurden für durchflusszytometrische Anwendungen ausgetitriert, um die einzusetzende Menge zu bestimmen.

Tabelle 7: Antikörper für die Durchflusszytometrie (Maus)

Zielantigen	Klon	Fluorochrom	Hersteller
CD3	eBio500A2	eFluor450	eBioscience, San Diego, USA
CD4	RM4-5	BV605	BioLegend, San Diego, USA
CD4	RM4-5	BV785	BioLegend, San Diego, USA
CD4	RM4-5	Alexa Fluor 700	BioLegend, San Diego, USA
CD4	RM4-5	APC	BioLegend, San Diego, USA
CD8 α	53-6.7	BV650	BioLegend, San Diego, USA
CD8 α	53-6.7	BV711	BioLegend, San Diego, USA
CD45	30-F11	PerCP	BioLegend, San Diego, USA
CD45	30-F11	Alexa Fluor 700	BioLegend, San Diego, USA
CD45	30-F11	APCCy7	BioLegend, San Diego, USA
CD49a	Itga1	BV785	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD69	H1.2F3	PECy7	BioLegend, San Diego, USA
CD103	M290	Alexa Fluor 700	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD154/CD40L	MR1	APC	BioLegend, San Diego, USA
GATA3	16E10A23	BV421	BioLegend, San Diego, USA
IL-17A	TC11-18H10.1	BV785	BioLegend, San Diego, USA
IL-17A	TC11-18H10.1	PE	BioLegend, San Diego, USA
IL-22	Poly5164	PE	BioLegend, San Diego, USA
IFN- γ	XMG1.2	APCCy7	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Ki-67	B56	BV785	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
ROR γ t	Q31-378	PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
ROR γ t	Q31-378	BV785	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Zielantigen	Klon	Fluorochrom	Hersteller
Tbet	eBio4B10	APC	eBioscience, San Diego, USA
TNF- α	MP6-XT22	PECy7	BioLegend, San Diego, USA
$\gamma\delta$ -TCR	GL3	BV421	BioLegend, San Diego, USA
$\gamma\delta$ -TCR	GL3	BV605	BioLegend, San Diego, USA
$\gamma\delta$ -TCR	GL3	PE/Texas Red-X	BioLegend, San Diego, USA

Tabelle 8: Antikörper für die Durchflusszytometrie (Human)

Zielantigen	Klon	Fluorochrom	Hersteller
TNF- α	Mab11	PE	eBioscience, San Diego, USA
CD3	145-2C11	V500	BioLegend, San Diego, USA
CD4	L200	PerCP	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD8	HIT8a	Alexa Fluor 700	BioLegend, San Diego, USA
CD45	HI30	BV785	BioLegend, San Diego, USA
CD45RA	UCHL-1	PECy7	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD154	5C8	Alexa Fluor 647	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
HLA-DR	L243	BV785	BioLegend, San Diego, USA
IFN- γ	4s.B3	APCCy7	eBioscience, San Diego, USA
IL-4	MP4-25D2	BV605	BioLegend, San Diego, USA
IL-17A	BL168	BV450	BioLegend, San Diego, USA
TNF α	Mab11	PE	eBioscience, San Diego, USA

Tabelle 9: Antikörper für ELISA

Zielantigen	Wirt	Konjugat	Hersteller
Maus-IgG	Schaf	HRP	Amersham Biosciences, Amersham, USA

Tabelle 10: Antikörper für die Stimulation von murinen Zellen

Zielantigen	Klon	Hersteller
CD3	145-2C11	BioLegend, San Diego, USA
CD28	37.51	BioLegend, San Diego, USA

Für Experimente bei denen Zellen durchflusszytometrisch sortiert wurden, wurde den Mäusen 30 min vor der Organentnahme ein Nanobody (S+16, AG Nolte), der gegen ART2 gerichtet ist, intraperitoneal injiziert (50 µg pro Maus). Dies verhindert den NAD-induzierten Zelltod und somit den Verlust von Zellen während der Präparation der Einzelsuspension^{115,116}.

8.1.7 Software:

Tabelle 11: Auflistung genutzter Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator Artwork 16.0	Adobe Systems, San José, USA
FACSDivaTM Software V.8.0.1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FlowJo V.10.5.3	FlowJo, LLC, Ashland, USA
GraphPad Prism V5.0b	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
LEGENDplex Software v8	BioLegend, San Diego, USA

Für standardmäßige Auswertungen wurden Microsoft Office Programme verwendet.

8.1.8 Statistik

Die Statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism durchgeführt. Es wurde für den Vergleich von zwei Proben, bei nicht zu erwartender Gaußverteilung, der von Mann und Whitney eingeführte U-Test angewandt. Bei mehreren Vergleichsgruppen, mit zwei unabhängigen untersuchten Parametern, wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*) (ANOVA) angewandt. Die Signifikanzen wurde wie folgt gekennzeichnet: In den Graphen sind Einzelwerte dargestellt sowie der Durchschnitt als Balkendiagramm. Nicht signifikante Unterschiede zwischen Gruppen sind nicht gesondert gekennzeichnet.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$; **** = $p < 0,00001$

8.2 Methoden:

8.2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

Alle verwendeten Tiere wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) gezüchtet und gehalten oder von externen Lieferanten (JANVIER LABS, Frankreich) erhalten. Alle durchgeführten Versuche unterlagen den gesetzlichen Vorgaben (TierSchG) und wurden in den Anlagen der zentralen Versuchstierhaltung durchgeführt. Die Mäuse wurden in individuell belüfteten Käfigen gehalten und unterlagen einem zwölf Stunden Hell-Dunkel-Zyklus. Wasser und Futter wurden ad libitum gegeben. Die Tierversuche wurden von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Tierversuchsantrag 97/17). Operative Eingriffe wurden von dazu berechtigten Personen durchgeführt.

8.2.1.1 Mauslinien

Tabelle 12: Auflistung Verwendeter Mauslinien

Mauslinie	Herkunft
C57BL/6J	Jackson Labs, JANVIER LABS
DBA/1	Charles River
FATE_Deleter (<i>Il17a^{cre}xR26^{eYFP}R26^{DTR}</i>)	AG Gagliani
Kaede ¹⁰⁹	AG Panzer
Kaede/ <i>Il17a^{Kat}</i>	AG Gagliani
<i>Il17a^{cre}xR26^{eYFP}</i> 38	AG Krebs

8.2.1.2 Induktion der Nephrotoxischen Nephritis

Das Model basiert auf der Injektion von nephrotoxischem Schafserum in Mäuse. Die Schafe wurden zuvor mit Bestandteilen von Mausnieren immunisiert⁹⁸. Um die nephrotoxische Nephritis (NTN) zu induzieren wurde chargenabhängig den Mäusen das Serum intraperitoneal (Volumen zwischen 200 – 800 µl) injiziert. Das Serum wurde von Prof. Dr. Panzer, III Med., UKE bereitgestellt. Für die Versuche wurden Mäuse im Alter von 8 – 20 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden täglich untersucht und bei Bedarf Wärmeplatten und Weichfutter eingesetzt. Urin wurde vor NTN Induktion und je nach Versuch an Tag 3 und 9 der NTN gesammelt.

8.2.1.3 Induktion der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG)

Für die Induktion der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis wurden DBA Mäuse im Alter von 20 Wochen mit murinem (m)-α3(IV)NC1 in 50 µl PBS und äquivalentem Volumen an komplettem Freund Adjuvans (KFA) subkutan (s.c.) immunisiert. Weitere Immunisierungen mit inkompletten Freund Adjuvans (IFA) wurden nach drei, fünf und sieben Wochen durchgeführt. Im Verlauf der Krankheit wurden Urin und Blutproben gesammelt zur Analyse der Proteinurie und der entstehenden Autoantikörper. Die Herstellung des rekombinanten Proteins wurde in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe bereits beschrieben^{46,42}.

8.2.1.4 Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Die Infektion von Mäusen erfolgte mit einer nicht letalen Dosis von 2×10^4 Listerien in 200 µl sterilem PBS über die Schwanzvene. Es wurden Bakterien verwendet, die rekombinant Ovalbumin exprimieren, um eine antigenspezifische Stimulation der jeweiligen Zellen zu ermöglichen¹³⁰. Nach Infektion wurde der Infektionstiter in drei Verdünnungsstufen auf *Tryptic-Soy-Broth* (TSB)-Agarplatten überprüft.

8.2.1.5 Infektion mit *Staphylococcus aureus*

Für die Infektion mit *Staphylococcus aureus* (Stamm SH1000) wurden die Bakterien einen Tag vor Infektion aufgetaut und auf einer LB-Agarplatte ausplattiert¹³¹. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37° C. Anschließend wurden mit einer Impfföse Kolonien von der Platte abgenommen und in 10 ml sterilem PBS gelöst. Die optische Dichte (OD600) der Bakteriensuspension wurde bestimmt und auf 0,7 eingestellt. Diese Konzentration entspricht einer Konzentration von ca. 10^8 Bakterien pro Milliliter. Vor der Infektion wurde die Infektionslösung für 20 s im Ultraschallbad behandelt, um eine Aggregation der Bakterien zu verhindern. Die Mäuse wurden mit 100 µl der Bakterienlösung intravenös infiziert. Aus der Bakterienlösung wurde über das Ausplattieren von Verdünnungen der genaue Infektionstiter bestimmt. In der Regel bewegt sich der Infektionstiter zwischen $1-5 \times 10^7$ colony forming units (CFU) pro Maus. Für die Infektion von DBA1 Mäusen wurde eine verringerte Infektionsdosis von 10^6 CFU *S. aureus* gewählt.

8.2.1.6 Depletion von IL-17A produzierenden Zellen mittels Diphtherietoxin

Das Model des „*toxin receptor-mediated cell knockout*“ wurde von Saito et al. beschrieben⁸⁷. FATE_Deleter Mäuse (*Il17a^{cre}xR26^{eYFP}R26^{DTR}*) exprimieren den Diphtherietoxinrezeptor in Zellen, die zuvor IL-17A produziert haben. Durch die Injektion von Diphtherietoxin (DT) in die entsprechende Maus lassen sich die IL-17A produzierenden Zellen selektiv depletieren. Die Injektion des DT erfolgte intraperitoneal (i.p.). Das DT wurde dreimal injiziert, dabei wurden jeweils 0,25 µg pro Maus in 100 µl sterilem PBS verwendet. Der genaue Versuchsablauf ist in Abb. 32 dargestellt.

8.2.1.7 Photokonversion von Nierenzellen in Kaede-Mäusen

Das Kaedeprotein ist ein grün fluoreszierendes Reporterprotein, das durch die Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 385 nm seine fluoreszierende Eigenschaft verändert und anschließend rot fluoresziert¹⁰⁹. Die Kaede-Mäuse sind transgen für dieses Protein, eine gezielte Bestrahlung erlaubt die Markierung von gewünschten Zellen am Ort der Bestrahlung. Zur Bestrahlung der Niere werden die Mäuse zunächst subkutan mit Buprenorphin (0,1mg/kg Körpergewicht) behandelt. Anschließend mittels Isofluran (4 vol-%) narkotisiert, die linke Flanke rasiert, und nach einem Einschnitt eine Niere freigelegt. Der Körper der Maus wurde von der Niere abgeschirmt, um ungewünschte Photokonversion von anderen Geweben zu verhindern. Die Niere wurde zweimal für 30 s, von jeder Seite einmal mit ca. 4 cm Abstand, mit Licht der Wellenlänge 385 nm bestrahlt. Während der Bestrahlung wurde steriles PBS auf die Niere geträufelt, um das Austrocknen zu vermeiden. Nach der Bestrahlung wurde die Niere wieder eingesetzt, die Wunde mittels Nähen und Klammern versorgt und die Mäuse mit Tramadol (12,5 mg/100ml) als Analgetikum im Trinkwasser ausgestattet. Alle Operationen wurden von PD. Dr. C. Krebs durchgeführt. Die Käfige der Mäuse wurden zur besseren Genesung nach der Bestrahlung auf Wärmeplatten platziert³⁸.

8.2.1.8 Behandlungen mit Ampicillin

Zur Therapie von bakteriellen Infektionen wurde den Mäusen Ampicillin (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) für 14 Tage ins Trinkwasser (1 g/L) gegeben. Das Antibiotikum wurde alle drei Tage ausgetauscht.

8.2.1.9 Intravenöse Injektionen von αCD45

Zur Unterscheidung der zirkulierenden von den gewebsständigen Zellen wurde den Mäusen drei Minuten vor der Organentnahme, unter Narkose, retrobulbär 2,5 µg eines Fluorochrom-konjugierten anti-CD45 Antikörpers in 100 µl sterilem PBS injiziert⁷¹.

8.2.1.10 Neutralisation von Zytokinen *in vivo*

Zur Neutralisation von pro-inflammatorischen Zytokinen *in vivo* wurden die jeweiligen Antikörper (Tabelle 13) am Tag der cGN Induktion, Tag 3 sowie Tag 6 nach cGN i.p. appliziert.

Tabelle 13: Antikörper für die Neutralisation von Zytokinen *in vivo*

Zielantigen	Klon	Hersteller	Menge pro Applikation pro Maus (µg)
IL-1β	B122	BioxCell, West Lebanon, USA	200
IL-6	MP5-20F3	BioxCell, West Lebanon, USA	300
IL-12/23 p40	R1-5D9	BioxCell, West Lebanon, USA	300
IL-17A	17F3	BioxCell, West Lebanon, USA	500
Maus IgG1 Isotyp-Kontrolle	MOPC-21	BioxCell, West Lebanon, USA	300

8.2.2 Zellbiologische Methoden:

8.2.2.1 Organentnahme und Zellisolation

Für die Organentnahme wurden die Mäuse zunächst mittels O₂/CO₂ und anschließend durch zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurde aus dem Herzen mit einer Spritze Blut für Analysen entnommen. Die Bauchdecke der Maus wurde geöffnet und je nach Versuch zunächst die Leber, ohne Gallenblase, die Milz und die Nieren ohne Kapsel entnommen. Für die Isolation von RNA wurden entsprechend kleine Gewebestücke bei -80°C gelagert. Der Großteil der Organe wurde für die durchflusszytometrische Analyse entnommen und in PBS auf Eis gelagert.

8.2.2.2 Zellisolation aus Organen der Maus

Für durchflusszytometrische Analysen war es nötig Einzelzellsuspensionen aus den entsprechenden Geweben herzustellen. In der vorliegenden Arbeit wurden Nieren und Milzzellen analysiert. Um eine Einzelzellsuspension aus der Milz herzustellen wurde die gesamte Milz durch ein Sieb mit 70 µm großen Maschen gedrückt. Im Anschluss erfolgte eine Erythrozytenlyse für 3 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen und Filtration über ein 40 µm Zellsieb wurde die Zellzahl bestimmt. Die Nieren wurden nach der Entnahme ohne Kapsel in kleine Stücke zerteilt und für 45 min bei 37° C mit 0,25 mg Collagenase D (0,25 mg/ml) und DNase I (10 U/ml) unter Rühren verdaut. Nach dem Verdau wurden die Nieren mechanisch Zerkleinert (GentleMACS Octo Dissociator, Programm Spleen 1.1 und Lung 2.1). Anschließend wurden störende Bestandteile mittels Dichtegradientenzentrifugation (37 % Percoll) entfernt. Die erhaltenen Zellen wurden gewaschen, die Erythrozyten lysiert und die verbleibenden Zellen über ein 30 µm Zellsieb filtriert. Blut wurde für die

durchflusszytometrischen Analysen in Reaktionsgefäßen mit Heparin bis zur weitergehenden Analyse gelagert. Die Leber wurde analog zur Niere prozessiert, es wurde lediglich auf das GentleMACS Programm Lung 2.1 verzichtet.

8.2.2.3 Zellisolation aus humanem Gewebe

Aus tumorfreien Bestandteilen einer im Rahmen einer Tumornephrektomie entfernten Niere wurden Zellen analog zur Mausniere isoliert. Das entsprechende Gewebe wurde zerkleinert und für 45 min mit Collagenase D (0,325 mg/ml) und DNase I (13 U/ml) bei 37°C verdaut. Der Gradient und die Erythrozytenlyse wurden analog zur Isolation von Leukozyten aus murinen Nieren durchgeführt.

8.2.2.4 *In vitro* Stimulation

Zellen aus Milz, Niere und auch Blut wurden in 1 ml IMDM Kompletmedium (5% FCS, 1% Glutamin, 0,1% β -Mercaptoethanol, 0,1% Gentamicin) mit 50 ng/ ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1 μ M Ionomycin polyklonal stimuliert. Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 37°C. 30 min nach Beginn der Stimulation wurde 10 μ g/ml Brefeldin A zugegeben. Humane Zellen wurden für fünf Stunden unter denselben Bedingungen stimuliert. Alle Inkubationen erfolgten bei 37 C mit 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in Röhrchen für die Durchflusszytometrie.

Für die Analyse der Zytokinproduktion im Überstand wurden die Zellen (6000 sortierte CD4⁺ T-Zellen pro Well) für 72 Stunden (37° C mit 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) in 96 Well-Platten mit folgenden Zytokinen stimuliert:

Tabelle 14: Zytokine für die *in vitro* Stimulation

Zytokin	Konzentration final	Hersteller
IL-1 β	20 ng/ml	BioLegend, San Diego, USA
IL-2	10 ng/ml	BioLegend, San Diego, USA
IL-6	20 ng/ml	BioLegend, San Diego, USA
IL-7	10 ng/ml	BioLegend, San Diego, USA
IL-18	0,05 ng/ml	BioLegend, San Diego, USA
IL-23	40 ng/ml	BioLegend, San Diego, USA

Nach der Stimulation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

8.2.2.5 Extrazelluläre und intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie

Um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu vermeiden wurde die Einzelzellsuspension mit 1% normalem Rattenserum und 0,25 µg anti-CD16/CD32 Antikörpern für 5 min im Dunkeln bei 4° C inkubiert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz die entsprechenden Antikörper zugegeben und weitere 20-30 min im Dunkeln inkubiert und anschließend gewaschen. Der lebend/tot Farbstoff Pacific Orange™ wurde zusammen mit den jeweils verwendeten Antikörpern verwendet. Bei Bedarf wurde der NIR lebend/tot-Farbstoff 1:1000 in PBS verdünnt und davon 500 µl für 20 min auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden direkt für Analysen verwendet oder zusätzlich intrazellulär gefärbt. Für die Färbung von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen zunächst mit 2% Paraformaldehyd für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach anschließendem Waschen und erneutem Blocken, analog zur extrazellulären Färbung, wurden die Zellen permeabilisiert. Für die Färbung von Zytokinen erfolgte die Permeabilisierung mittels Saponinpuffer, für die Färbung von Transkriptionsfaktoren wurde das *Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set* nach Herstellerangaben verwendet. Nach der Färbung wurden die Zellen erneut gewaschen und anschließend analysiert. In den Abbildungen 40 und 41 sind die Strategien zur Eingrenzung der jeweiligen zu analysierenden Zellen abgebildet. Abbildung 40 zeigt die Analyse von Zellen nach Stimulation. Abbildung 41 die Analyse von geweberesidenten Zellen ohne vorherige Stimulation. Die erhaltenen Daten wurden mit FlowJo ausgewertet.

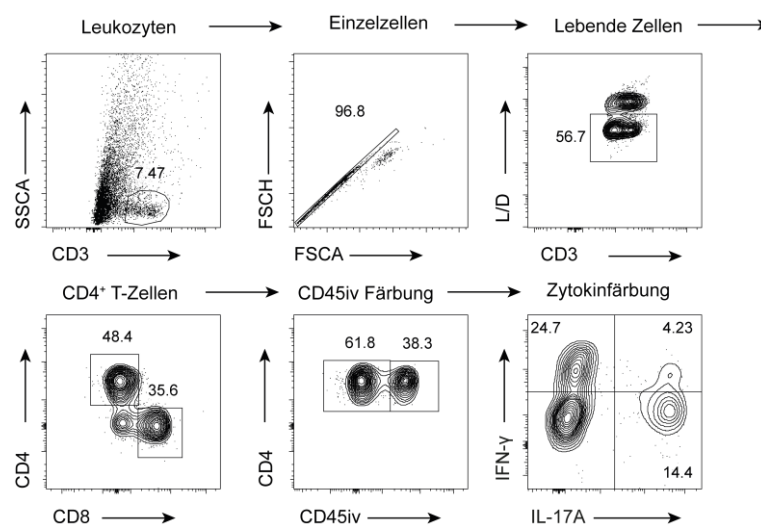


Abbildung 40: Eingrenzung von CD4⁺ T-Zellen und ihrer Zytokinproduktion. Für die Analyse der Zytokinproduktion wurden isolierte Leukozyten mit PMA und Ionomycin in der Gegenwart von Brefeldin A für 4 Stunden stimuliert und anschließend mittels fluorochromgekoppelter Antikörper markiert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte im Anschluss. Zunächst wurden über die Granularität (SSC) und die Signale für CD3 die T-Zellen und im Anschluss über die Größe (FSC) die Einzelzellen eingegrenzt. Über einen Lebend/Tot Farbstoff (PacificOrange) wurden tote Zellen ausgeschlossen. Anschließend wurden CD4⁺ T-Zellen identifiziert und über den intravenös applizierten anti-CD45 Antikörper die Zellen im Gewebe dargestellt. Zuletzt wurden die jeweils produzierten Zytokine identifiziert. Statt wie hier IL-17A und IFN-γ konnten auch TNF-α und IL-22 bzw. IL-4 auf diese Weise identifiziert werden.

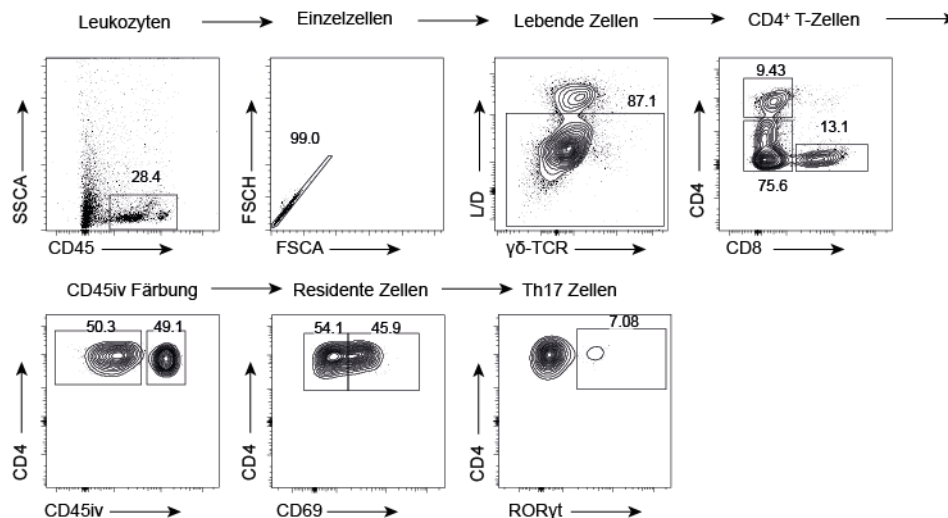


Abbildung 41: Eingrenzung von Gewebe-residenten CD4⁺ T-Zellen. Für die Analyse der Zytokinproduktion wurden isolierte Leukozyten mittels fluorchromgekoppelter Antikörper markiert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte im Anschluss. Zunächst wurden über die Granularität (SSC) und die Signale für CD45 die Leukozyten und im Anschluss über die Größe (FSC) die Einzelzellen eingegrenzt. Über einen Lebend/Tot Farbstoff (PacificOrange) wurden tote Zellen ausgeschlossen. Anschließend wurden CD4⁺ T-Zellen identifiziert und über den intravenös applizierten anti-CD45 Antikörper die Zellen im Gewebe dargestellt. Nachfolgend wurden über den Marker CD69 die geweberesidenten T-Zellen untersucht. Im letzten Schritt wurden Transkriptionsfaktoren zur Identifizierung von T-Zellsubtypen analysiert. Anstelle von RORγt wurden analog auch Tbet und Foxp3 analysiert.

8.2.2.6 Zellsortierung

Für die Sortierung von Zellen mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) wurden die Zellen wie oben beschrieben extrazellulär gefärbt und anschließend in FACS-Puffer überführt. Die Zellen wurden entsprechend ihrer Oberflächenmarker sortiert (siehe Ergebnissteil). Alle Zellsortierungsarbeiten wurden in der FACS-Core-Facility des UKEs (Leitung Prof. Dr. B. Fehse) durchgeführt.

8.2.2.7 Zellzahlbestimmung.

Bestimmungen von Zellzahlen erfolgten unter Färbung mit Trypanblau (1:10 in PBS verdünnt) mit der Neubauerzählkammer (Kammerfaktor 10⁴) oder mittels eines Zellzählgeräts (Countess, Invitrogen, Carlsbad, USA).

8.2.3 Molekularbiologische Methoden

8.2.3.1 RNA Isolation

Das Nierengewebe wurde mittels mechanischer Methoden zerkleinert (Qiagen TissueLyser 1 min mit 30 Bewegungen pro Sekunde, unter Benutzung von Wolframcarbid Kugeln, 3 mm Durchmesser, ebenfalls Qiagen). Aus dem Gewebe wurde RNA mittels NucleoSpin® RNA Plus Kits von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) isoliert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte schließlich photometrisch mittels des NanoDrop 2000c von Thermo Fisher Scientific Inc. (Wilmington, USA). RNA wurde bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

8.2.3.2 cDNA Synthese

Aus der isolierten RNA wurde mittels des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* Kits von Applied Biosystems (Foster City, USA) cDNA hergestellt. Für die Synthese der cDNA wurde das folgende Programm im Thermocycler verwendet:

Tabelle 15: cDNA Syntheseprogramm

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur/°C	25	37	85	4
Zeit (min)	10	120	5	∞

Die cDNA wurde langfristig bei -20°C gelagert.

8.2.3.3 Quantitative Real-time-PCR

Um mRNA aus Nierengewebe oder sortierten Zellen zu vergleichen wurde die Real-time-PCR eingesetzt. Für die Quantifizierung der Zielgene wurden 20 ng cDNA, für das Haushaltsgen 0,04 ng cDNA eingesetzt. Für die Quantifizierung der Genexpressionen wurde der SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix nach Herstellerangaben eingesetzt. Das PCR Programm entsprach folgendem Muster:

Tabelle 16: Programm für die Real-time-PCR

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3 (x40)	Schritt 4 (x40)
Temperatur/°C	50	95	95	60
Zeit (min:s)	2	10	0:15	1

8.2.4 Proteinbiochemische Methoden

8.2.4.1 Proteinisolation aus Nierengewebe

Zur Isolation von renalen Proteinen wurde der RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren verwendet. Die entsprechenden Nieren wurden im Puffer aufgenommen und anschließend in M-Tubes (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) auf dem GentleMACS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland, Programm Protein 01-01) zerkleinert, zentrifugiert und der Überstand bei -80° C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA Tests bestimmt

8.2.4.2 Quantifizierung von Proteinen

Die aus den Nieren isolierten Proteine wurden mittels LEGENDplex-Assays nach Herstellerangaben analysiert.

8.2.5 Immunologische Methoden

8.2.5.1 Albumin-ELISA

Die Albuminkonzentration im Urin von Mäusen wurde mit dem Mouse Albumin ELISA Quantitation Set von Bethyl Laboratories, Inc., (Montgomery, USA) bestimmt. Das Kreatinin, ein weiterer für die Nierenfunktion wichtiger Parameter, wurde im Zentrallabor des UKEs bestimmt.

8.2.6 Histologie:

Zur histologischen Untersuchung wurden quer geschnittene Scheiben einer Niere (Ca. 4 mm) in 4% Formaldehyd für 24 h bei 4° C fixiert und anschließend dreimal für 30 min mit PBS gewaschen. Die Einbettung in Paraffin erfolgte in der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

8.2.6.1 PAS-Reaktion zur histologischen Untersuchung der Nierenschädigung

Die in Paraffin eingebetteten Nieren wurden am Mikrotom geschnitten (III. Med. UKE) und anschließend mittels PAS-Reaktion (periodic acid-Schiff reaction) gefärbt. Dazu wurden die Schnitte Mittels Xylol und absteigender Ethanolreihe (100% EtOH, 96%, 70%) sowie H₂O gewässert. Anschließend mit 1% Perjodsäure (15 min, RT), Schiff'schem Reagenz (40 min, RT) und Hämatoxylin nach Böhmer (42 s) behandelt. Danach erfolgte die Differenzierung mit HCL-Ethanol und das entwässern mittels aufsteigender Ethanolreihe (70%, 96%, 100% sowie Xylol). Die Schnitte wurden nach der Färbung mit Eukitt eingedeckelt.

8.2.6.2 Schadensermittlungen durch Auszählen der glomerulären Halbmonde

Zur Untersuchung der Nierenschädigung wurden in jedem Nierenschnitt 30 Glomeruli analysiert und die Frequenz an glomerulären Halbmonden ermittelt. Die histologische Auswertung erfolgte durch Prof. Ulf Panzer (III. Med. UKE)

9. Literaturverzeichnis

1. Keller, G., Zimmer, G., Mall, G., Ritz, E. & Amann, K. Nephron Number in Patients with Primary Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **348**, 101–108 (2003).
2. Jarad, G. & Miner, J. H. Update on the glomerular filtration barrier. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **18**, 226–232 (2009).
3. Kurts, C., Panzer, U., Anders, H. J. & Rees, A. J. The immune system and kidney disease: Basic concepts and clinical implications. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 738–753 (2013).
4. Stein, J. H. & Fadem, S. Z. The Renal Circulation. *JAMA* **239**, 1308–1312 (1978).
5. Goodpasture, E. W. Landmark Publication from The American Journal of the Medical Sciences: The Significance Of Certain Pulmonary Lesions In Relation To The Etiology Of Influenza. *Am. J. Med. Sci.* **338**, 148–151 (2009).
6. Jennette, J. C. & Nachman, P. H. ANCA glomerulonephritis and vasculitis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 1680–1691 (2017).
7. Dörner, T., Jacobi, A. M. & Lipsky, P. E. B cells in autoimmunity. *Arthritis Res. Ther.* **11**, (2009).
8. Palmer, M. T. & Weaver, C. T. Autoimmunity: Increasing suspects in the CD4 + T cell lineup. *Nat. Immunol.* **11**, 36–40 (2010).
9. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. & Hafler, D. A. FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 490–500 (2010).
10. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 833–844 (2009).
11. Zhu, J. & Paul, W. E. CD4 T cells : fates , functions , and faults ASH 50th anniversary review CD4 T cells : fates , functions , and faults. *Immunobiology* **112**, 1557–1569 (2009).
12. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., De Sauvage, F. J. & Gurney, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* **278**, 1910–1914 (2003).
13. Liew, F. Y. TH1 and TH2 cells: a historical perspective. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 55–60 (2002).
14. Kaplan, M. H. The transcription factor network in Th9 cells. *Semin. Immunopathol.* **39**, 11–20 (2017).
15. Plank, M. W. *et al.* Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. *J. Immunol.* **198**, 2182–2190 (2017).
16. Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L. & Glimcher, L. H. Molecular Mechanisms RegulatinG Th1 Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 713–758 (2003).

17. Walker, J. A. & McKenzie, A. N. J. TH2 cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 121 (2017).
18. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4 + effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123–1132 (2005).
19. Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* **6**, 1133–1141 (2005).
20. Mansouri, M., Mansouri, P., Raze, A. A. & Jadali, Z. The potential role of Th17 lymphocytes in patients with psoriasis. *An. Bras. Dermatol.* **93**, 63–66 (2018).
21. Yadav, M., Stephan, S. & Bluestone, J. A. Peripherally induced tregs - role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front. Immunol.* **4**, 232 (2013).
22. Zhang, N. & Bevan, M. J. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* **35**, 161–168 (2011).
23. Zhou, L., Chong, M. M. W. & Littman, D. R. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* **30**, 646–655 (2009).
24. Chien, Y., Meyer, C. & Bonneville, M. $\gamma\delta$ T Cells: First Line of Defense and Beyond . *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 121–155 (2014).
25. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: Unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 88–100 (2013).
26. Geginat, J. *et al.* The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Semin. Immunol.* **25**, 252–262 (2013).
27. Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L. & Fowler, V. G. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 603–61 (2015).
28. David, M. Z. & Daum, R. S. Treatment of Staphylococcus aureus Infections. in *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis* (eds. Bagnoli, F., Rappuoli, R. & Grandi, G.) 325–383 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/82_2017_42
29. Turner, N. A. *et al.* Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 203–218 (2019).
30. Bröker, B., Mrochen, D. & Péton, V. The T Cell Response to Staphylococcus aureus. *Pathogens* **5**, 31 (2016).
31. Thomer, L., Schneewind, O. & Missiakas, D. Pathogenesis of Staphylococcus aureus Bloodstream Infections . *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **11**, 343–364 (2016).
32. Cho, J. S. *et al.* IL-17 is essential for host defense against cutaneous Staphylococcus aureus infection in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 1762–1773 (2010).
33. Cheng, P. *et al.* Role of gamma-delta T cells in host response against Staphylococcus aureus-induced pneumonia. *BMC Immunol.* **13**, 1 (2012).

34. Brown, A. F. *et al.* Memory Th1 Cells Are Protective in Invasive *Staphylococcus aureus* Infection. *PLoS Pathog.* **11**, 1–32 (2015).
35. Montgomery, C. P. *et al.* Protective Immunity against Recurrent *Staphylococcus aureus* Skin Infection Requires Antibody and Interleukin-17A. *Infect. Immun.* **82**, 2125–2134 (2014).
36. Boss, R. *et al.* Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. *J. Dairy Sci.* **99**, 515–528 (2015).
37. Krüger, T. *et al.* Identification and Functional Characterization of Dendritic Cells in the Healthy Murine Kidney and in Experimental Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 613–621 (2004).
38. Krebs, C. F. *et al.* Autoimmune Renal Disease Is Exacerbated by S1P-Receptor-1-Dependent Intestinal Th17 Cell Migration to the Kidney. *Immunity* **45**, 1078–1092 (2016).
39. Turner, J.-E. *et al.* IL-17A Production by Renal $\gamma\delta$ T Cells Promotes Kidney Injury in Crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1486–1495 (2012).
40. Paust, H.-J. *et al.* Regulatory T cells control the Th1 immune response in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* **80**, 154–164 (2011).
41. Panzer, U. *et al.* Chemokine Receptor CXCR3 Mediates T Cell Recruitment and Tissue Injury in Nephrotoxic Nephritis in Mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 2071–2084 (2007).
42. Hopfer, H. *et al.* The importance of cell-mediated immunity in the course and severity of autoimmune anti-glomerular basement membrane disease in mice. *FASEB J.* **17**, 860–868 (2003).
43. Hopfer, H. *et al.* Characterization of the renal CD4⁺ T-cell response in experimental autoimmune glomerulonephritis. *Kidney Int.* **82**, 60–71 (2012).
44. Klinge, S. *et al.* Role of regulatory T cells in experimental autoimmune glomerulonephritis. *Am. J. Physiol. Physiol.* **316**, F572–F581 (2019).
45. Hünemörder, S. *et al.* T_{H1} and T_{H17} Cells Promote Crescent Formation in Experimental Autoimmune Glomerulonephritis. *J. Pathol.* n/a-n/a (2015). doi:10.1002/path.4559
46. Hopfer, H. *et al.* Characterization of the renal CD4⁺ T-cell response in experimental autoimmune glomerulonephritis. *Kidney Int.* **82**, 60–71 (2012).
47. Ivanov, I. I. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17⁺ T Helper Cells. *Cell* **126**, 1121–1133 (2006).
48. Muranski, P. & Restifo, N. P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* **121**, 2402–2414 (2013).
49. Acosta-Rodriguez, E. V *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* **8**, 639 (2007).
50. Esplugues, E. *et al.* Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* **475**, 514–518 (2011).

51. Iezzi, G. *et al.* CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 876–881 (2009).
52. Ranasinghe, R. & Eri, R. Modulation of the CCR6-CCL20 Axis: A Potential Therapeutic Target in Inflammation and Cancer. *Medicina (B. Aires)*. **54**, 88 (2018).
53. Flannigan, K. L. *et al.* IL-17A-mediated neutrophil recruitment limits expansion of segmented filamentous bacteria. *Mucosal Immunol.* **10**, 673–684 (2017).
54. Disteldorf, E. M. *et al.* CXCL5 Drives Neutrophil Recruitment in TH17-Mediated GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1–12 (2014). doi:10.1681/ASN.2013101061
55. Paust, H.-J. *et al.* The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 969–79 (2009).
56. Paust, H.-J. *et al.* Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* **82**, 72–83 (2012).
57. Komiyama, Y. *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **177**, 566–73 (2006).
58. Patel, D. D. & Kuchroo, V. K. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. *Immunity* **43**, 1040–1051 (2015).
59. Patel, D. D., Lee, D. M., Kolbinger, F. & Antoni, C. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, iii116 LP-iii123 (2013).
60. Glasner, C. *et al.* Genetic loci of Staphylococcus aureus associated with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA)-associated vasculitides. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
61. Jameson, S. C. & Masopust, D. Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity* **48**, 214–226 (2018).
62. Turner, J.-E., Becker, M., Mittrücker, H.-W. & Panzer, U. Tissue-Resident Lymphocytes in the Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **29**, 389–399 (2018).
63. Schenkel, J. M. & Masopust, D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity* **41**, 886–897 (2014).
64. Pan, Y. & Kupper, T. S. Metabolic reprogramming and longevity of tissue-resident memory T cells. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
65. Rosato, P. C., Beura, L. K. & Masopust, D. Tissue resident memory T cells and viral immunity. *Curr. Opin. Virol.* **22**, 44–50 (2017).
66. Beura, L. K. *et al.* Intravital mucosal imaging of CD8⁺ resident memory T cells shows tissue-autonomous recall responses that amplify secondary memory. *Nat Immunol* **19**, 173–182 (2018).
67. Castellanos, C. *et al.* Expression of the Leukocyte Early Activation Antigen CD69 Is Regulated. (1997).

68. Mackay, L. K. *et al.* The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat. Immunol.* **14**, 1294–301 (2013).
69. Martrus, G. *et al.* Proliferative capacity exhibited by human liver-resident CD49a+CD25+ NK cells. *PLoS One* **12**, e0182532 (2017).
70. Mackay, L. K. *et al.* Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science* (80-.). **352**, 459–463 (2016).
71. Anderson, K. G. *et al.* Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nat. Protoc.* **9**, 209–22 (2014).
72. Mueller, S. N. & Mackay, L. K. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 1–11 (2015).
73. Zundler, S. *et al.* Hobit- and Blimp-1-driven CD4 + tissue-resident memory T cells control chronic intestinal inflammation. *Nat. Immunol.* **20**, 288–300 (2019).
74. Turner, D. L. *et al.* Biased Generation and In Situ Activation of Lung Tissue-Resident Memory CD4 T Cells in the Pathogenesis of Allergic Asthma. *J. Immunol.* [ji1700257](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700257) (2018). doi:10.4049/jimmunol.1700257
75. Allie, S. R. *et al.* The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter. *Nat. Immunol.* **20**, 97–108 (2019).
76. Sagebiel, A. F. *et al.* Tissue-resident Eomes + NK cells are the major innate lymphoid cell population in human infant intestine. *Nat. Commun.* **10**, 1–13 (2019).
77. Turner *et al.* CCR6 recruits regulatory T cells and Th17 cells to the kidney in glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **21**, 974–985 (2010).
78. Beura, L. K. *et al.* Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature* **532**, 512–516 (2016).
79. Cheng, A. G., DeDent, A. C., Schneewind, O. & Missiakas, D. A play in four acts: Staphylococcus aureus abscess formation. *Trends Microbiol.* **19**, 225–232 (2011).
80. Balasubramanian, R. & Marks, S. D. Post-infectious glomerulonephritis. *Paediatr. Int. Child Health* **37**, 240–247 (2017).
81. Dudakov, J. A., Hanash, A. M. & van den Brink, M. R. M. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 747–785 (2015).
82. Frentsch, M. *et al.* Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat. Med.* **11**, 1118–1124 (2005).
83. Hopfer, H. *et al.* The importance of cell-mediated immunity in the course and severity of autoimmune anti-glomerular basement membrane disease in mice. *FASEB J.* **17**, 860–868 (2003).
84. Schmidt, T., Luebbe, J., Paust, H. J. & Panzer, U. Mechanisms and functions of IL-17 signaling in renal autoimmune diseases. *Mol. Immunol.* **104**, 90–99 (2018).

85. Nagai, T. *et al.* A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* **20**, 87–90 (2002).
86. Hirota, K. *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Publ. Gr.* **12**, (2011).
87. Saito, M. *et al.* Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* **19**, 746–750 (2001).
88. Gagnon, J. *et al.* IL-6, in Synergy with IL-7 or IL-15, Stimulates TCR-Independent Proliferation and Functional Differentiation of CD8+ T Lymphocytes. *J. Immunol.* **180**, 7958–7968 (2014).
89. Shcherbo, D. *et al.* Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat. Methods* **4**, 741 (2007).
90. Szabo, P. A., Miron, M. & Farber, D. L. Location, location, location: Tissue resident memory T cells in mice and humans. *Sci. Immunol.* **4**, eaas9673 (2019).
91. Steinbach, K., Vincenti, I. & Merkler, D. Resident-Memory T Cells in tissue-restricted immune responses: For better or worse? *Front. Immunol.* **9**, 1–15 (2018).
92. Glennie, N. D. *et al.* Skin-resident memory CD4+ T cells enhance protection against *Leishmania major* infection. *J. Exp. Med.* **212**, 1405–14 (2015).
93. Zenewicz, L. A. & Shen, H. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. *Microbes Infect.* **9**, 1208–15 (2007).
94. Cho, J. S. *et al.* IL-17 is essential for host defense. **120**, (2010).
95. Mölne, L., Mölne, L., Corthay, A., Holmdahl, R. & Tarkowski, A. Role of gamma/delta T cell receptor-expressing lymphocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin Exp Immunol* **132**, 209–215 (2003).
96. Zielinski, C. E. *et al.* Pathogen-induced human T H17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature* **484**, 514–518 (2012).
97. Kurts, C., Panzer, U., Anders, H.-J. & Rees, A. J. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 738–53 (2013).
98. Tipping, P. G., Huang, X. R., Berndt, M. C. & Holdsworth, S. R. A role for P selectin in complement-independent neutrophil-mediated glomerular injury. *Kidney Int.* **46**, 79–88 (1994).
99. Cheng, M. & Anderson, M. S. Thymic tolerance as a key brake on autoimmunity. *Nat. Immunol.* **19**, 659–664 (2018).
100. Floege, J. & Amann, K. Primary glomerulonephritides. *Lancet* **387**, 2036–2048 (2016).
101. Sites, M. *et al.* Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Article Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *CellReports* **20**, 2921–2934 (2017).

102. Beura, L. K. *et al.* T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells. *Immunity* (2018). doi:10.1016/j.immuni.2018.01.015
103. Beura, L. K. *et al.* CD4⁺; resident memory T cells dominate immunosurveillance and orchestrate local recall responses. *J. Exp. Med.* **216**, 1214 LP – 1229 (2019).
104. Guerra, F. E., Borgogna, T. R., Patel, D. M., Sward, E. W. & Voyich, J. M. Epic Immune Battles of History: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 1–19 (2017).
105. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731–8 (2004).
106. Romagnoli, P. A., Sheridan, B. S., Pham, Q.-M., Lefrançois, L. & Khanna, K. M. IL-17A-producing resident memory $\gamma\delta$ T cells orchestrate the innate immune response to secondary *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 8502 LP – 8507 (2016).
107. Munk, M. E., Elser, C. & Kaufmann, S. H. Human gamma/delta T-cell response to *Listeria monocytogenes* protein components in vitro. *Immunology* **87**, 230–235 (1996).
108. Kamran, P. *et al.* Parabiosis in Mice: A Detailed Protocol. *J. Vis. Exp.* 1–5 (2013). doi:10.3791/50556
109. Tomura, M. *et al.* Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein 'Kaede' transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 10871–10876 (2008).
110. Borges Da Silva, H. *et al.* The purinergic receptor P2RX7 directs metabolic fitness of long-lived memory CD8 + T cells. *Nature* **559**, 264–268 (2018).
111. Snyder, M. E. *et al.* Generation and persistence of human tissue-resident memory T cells in lung transplantation. *Sci. Immunol.* **4**, 1–17 (2019).
112. Park, C. O. & Kupper, T. S. The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. *Nat. Med.* **21**, 688–697 (2015).
113. Krebs, C. F., Schmidt, T., Riedel, J.-H. & Panzer, U. T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease. *Nat. Rev. Nephrol.* (2017). doi:10.1038/nrneph.2017.112
114. Lee, H.-G. *et al.* Pathogenic function of bystander-activated memory-like CD4+ T cells in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Commun.* **10**, 709 (2019).
115. Seman, M. *et al.* NAD-Induced T Cell Death: ADP-Ribosylation of Cell Surface Proteins by ART2 Activates the Cytolytic P2X7 Purinoceptor. *Immunity* **19**, 571–582 (2003).
116. Rissiek, B. *et al.* In vivo blockade of murine ARTC2.2 during cell preparation preserves the vitality and function of liver tissue-resident memory T cells. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
117. Mombaerts, P. *et al.* RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* (1992). doi:10.1016/0092-8674(92)90030-G

118. Morales Del Valle, C. *et al.* Costimulation Induces CD4 T Cell Antitumor Immunity via an Innate-like Mechanism. *Cell Rep.* **27**, 1434-1445.e3 (2019).
119. Ostmann, A. *et al.* Regulatory T cell-derived IL-10 ameliorates crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 930–42 (2013).
120. Webster, K. E. *et al.* In vivo expansion of T reg cells with IL-2–mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J. Exp. Med.* **206**, 751–760 (2009).
121. Klicznik, M. M. *et al.* Human CD4⁺ CD103⁺ cutaneous resident memory T cells are found in the circulation of healthy individuals. *Sci. Immunol.* **4**, eaav8995 (2019).
122. Van Putten, J. W. G., Van Haren, E. H. J. & Lammers, J. W. J. Association between Wegener's granulomatosis and Se Staphylococcus aureus infection? *Eur. Respir. J.* **9**, 1955–1957 (1996).
123. C.A., S. *et al.* Association of chronic nasal carriage of Staphylococcus aureus and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Ann. Intern. Med.* **120**, 12–17 (1994).
124. Mizutani, A. *et al.* Pristane-induced autoimmunity in germ-free mice. *Clin. Immunol.* **114**, 110–118 (2005).
125. Rosshart, S. P. *et al.* Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses. *Science (80-.)*. **365**, 4361 (2019).
126. Bacher, P. *et al.* Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against *Candida albicans* *Cell* **176**, 1340-1355.e15 (2019).
127. Zundler, S. *et al.* Blockade of $\alpha\epsilon\beta 7$ integrin suppresses accumulation of CD8⁺ and Th9 lymphocytes from patients with IBD in the inflamed gut in vivo. *Gut* **66**, 1936–1948 (2017).
128. Vermeire, S. *et al.* Etrolizumab as induction therapy for ulcerative colitis: A randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet* **384**, 309–318 (2014).
129. Feagan, B. G. *et al.* Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* **369**, 699–710 (2013).
130. Foulds, K. E. *et al.* Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. *J. Immunol.* **168**, 1528–32 (2002).
131. Horsburgh, M. J. *et al.* σB Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance: Characterization of a Functional rsbU Strain Derived from Staphylococcus aureus 8325-4. **184**, 5457–5467 (2002).

10. Anhang.

10.1 Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS (Gefahrensymbole, H- und P-Sätze)

Tabelle 17: Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS

Chemikalie	CAS-Nr.	GHS Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	54827-17-7		315-319-335	261-305+351+338
β-Mercaptoethanol	60-24-2	   	301-310-330- 315- 318-410	280-273-302+352- 304+340- 305+351+338-309- 310
Ampicillin	69-52-3	 	317+334	261+280+342+311
Brefeldin A	20350-15-6		301	301+310
Buprenorphin	52485-79-7	 	302-361	281
DNase I	9001-12-1		315-319-334- 335	261-280-284- 304+340+312- 337+313-342+311
Ethanol	64-17-5	 	225	210
Ethylendiamintetraessigsäure	60-00-4		319	305+351+338
EUKITT		  	226-312-325- 319-335-373	210-241-260-280- 303+361+353- 305+351+338-405- 501

Chemikalie	CAS-Nr.	GHS Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Formaledhyd	50-00-0	 	301-311-314-317- 331-341-350	201-260-280- 301+310+330- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338- 308+311-403+233
Gentamicin	1403-66-3		317-334	261-280-342+311
Hämatoxylin	517-28-2		302-315-319-335	261-305+351+338
Ionomycin	56092-82-1		302	-
Isofluran	26675-46-7	 	336	304+340-312- 403+223-405-501
Kollagenase D	9001-12-1	 	317-334	261-280-302+352- 304+341-342+311
Lysogeny Broth			315-319-335	
Paraformaldehyd	30525-89-4	   	228- 302+332- 315-317-318- 335-350	201-210-280- 302+352- 305+351+338
Perjodsäure	10450-60-9		271-314	210-221- 301+330+331- 305+351+338- 309+310
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	16561-29-8		315	264-280-302+352- 332+313-362
Salzsäure	7647-01-0	 	290-314-335	234-260-304+340- 303-361+353- 305+351+338- 309+311-501

Chemikalie	CAS-Nr.	GHS Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Saponin Quillaja sp.	8047-15-2		319-335	361-305+351+338
Schiffs-Reagenz für die Mikroskopie			350	281-308+313
Schwefelsäure	7664-93-9		290-314	280-301+330+331- 309+310-
Tramadol	27203-92-5		302-319	305+351+338
Trypanblau	72-57-1		350	301-308+313
Tryptic Soy Broth			315-319	
Xylol	1330-20-7	  	226-304- 312+332- 315-319-335- 412	210-261-273- 301+310-302+352- 312-331

10.2 Zusätzliche Abbildungen in Kooperation erhobener Daten

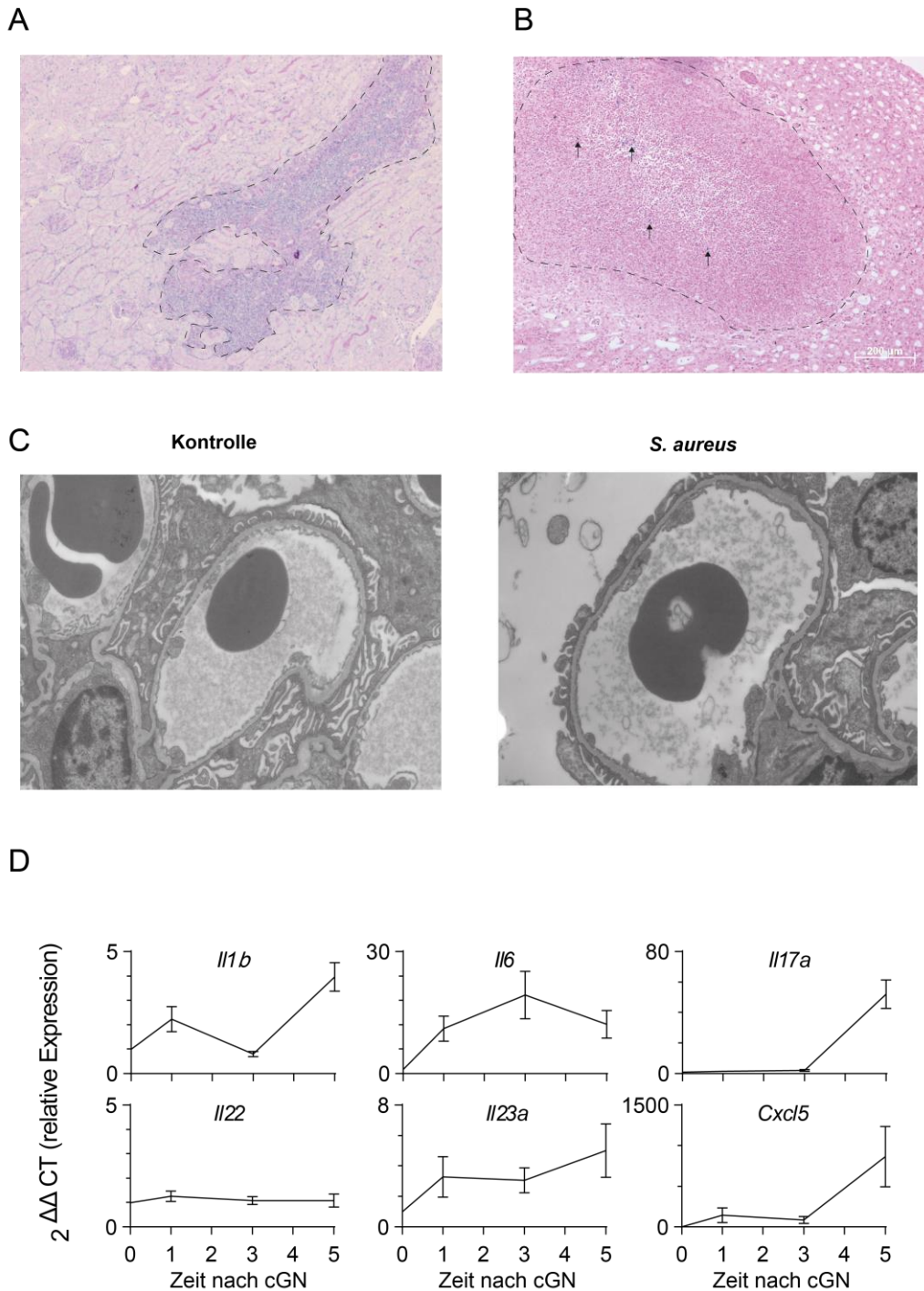


Abbildung 39: Histologische Untersuchung der Nieren nach *S. aureus* Infektion sowie Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine in der frühen Phase der cGN. A) PAS Färbung der infizierten Niere. Der Abszess wird durch gestrichelte Linie gekennzeichnet. B) Gram + HE –Färbung der infizierten Niere. Der Abszess wird durch gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die Pfeile markieren grampositive Bakterienkolonien. C) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von glomerulären Kapillaren gesunder und infizierter Tiere 30 Tage nach Infektion. Es sind keine Ablagerungen an der Basalmembran sichtbar. D) Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-22, IL-23) und des Chemokins CXCL5 in der frühen Phase der cGN via qPCR. Alle im Anhang gezeigten Daten wurden in Kooperation mit der III. Med. Klinik (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Panzer bzw. PD Dr. Krebs) und des Instituts für Pathologie (Prof. Dr. Wiech) des UKEs erhoben und die Analysen auch jeweils dort ausgeführt.

10.3 Tabellenverzeichnis

Benennung	Seite
Tabelle 1: Auflistung verwendeter Spezialgeräte	77
Tabelle 2: Auflistung verwendeter Chemikalien	78
Tabelle 3: Auflistung verwendeter Puffer und Lösungen	79
Tabelle 4: Auflistung verwendeter Kits	80
Tabelle 5: Primer für quantitative PCR	80
Tabelle 6: QuantiTect Primer Assays (Qiagen)	80
Tabelle 7: Antikörper für die Durchflusszytometrie (Maus)	81
Tabelle 8: Antikörper für die Durchflusszytometrie (Human)	82
Tabelle 9: Antikörper für ELISA	83
Tabelle 10: Antikörper für die Stimulation von murinen Zellen	83
Tabelle 11: Auflistung genutzter Software	83
Tabelle 12: Auflistung Verwendeter Mauslinien	84
Tabelle 13: Antikörper für die Neutralisation von Zytokinen <i>in vivo</i>	87
Tabelle 14: Zytokine für die <i>in vitro</i> Stimulation	88
Tabelle 15: cDNA Syntheseprogramm	91
Tabelle 16: Programm für die Real-time-PCR	91
Tabelle 17: Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS	101

10.4 Abbildungsverzeichnis

Benennung	Seite
Abbildung 1: Schematische Darstellung der Niere	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der T-Helferzellsotypen	9
Abbildung 3 <i>Staphylococcus aureus</i> im Blutkreislauf und die Invasion angrenzender Gewebe	10
Abbildung 4: Subtypen von T Gedächtniszellen und ihr Migrationsmuster	15
Abbildung 5: <i>Staphylococcus aureus</i> Infektionen in Milz und Niere	19
Abbildung 6: Funktionelle Untersuchung der Nieren von <i>S. aureus</i> infizierten Mäusen	21
Abbildung 7: Akkumulation von Th17 und $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Niere nach <i>S. aureus</i> Infektion	22
Abbildung 8: Akkumulation von Th17 und gleichbleibende <i>Th1-Zellen</i> in der Niere nach <i>S. aureus</i> Infektion	23
Abbildung 9: Veränderte T-Zellpopulationen nach chronischer <i>S. aureus</i> Infektion	24
Abbildung 10: T-Zellpopulationen in der Niere nach <i>Listeria monocytogenes</i> Infektion	26
Abbildung 11: Nachweis von listerienspezifischen T-Zellen in der Niere	27
Abbildung 12: Spezifische Markierung der Leukozyten in der Nieren von transgenen Kaede-Mäusen	29
Abbildung 13: Persistenz der nach <i>S. aureus</i> induzierten Th17-Zellen in der Niere	30
Abbildung 14: Persistenz der $\gamma\delta$ -T-Zellen nach <i>S. aureus</i> Infektion	31
Abbildung 15: Der Einfluss einer vorherigen Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> auf eine nachfolgende Autoimmunerkrankung	33
Abbildung 16: Analyse der T-Zellpopulationen in der cGN nach Listerieninfektion	34
Abbildung 17: Charakterisierung der T-Zellantwort in der cGN nach vorheriger Listerieninfektion	35
Abbildung 18: Der Einfluss einer vorherigen Infektion mit <i>Staphylococcus aureus</i> auf den Verlauf der Glomerulonephritis	36
Abbildung 19: Der Einfluss einer vorherigen Infektion mit <i>Staphylococcus aureus</i> auf den Verlauf der Glomerulonephritis	37

Abbildung 20: Histologische Untersuchungen von vormals mit <i>S. aureus</i> infizierten Mäusen in der cGN	38
Abbildung 21: Der Einfluss einer vorherigen Infektion mit <i>Staphylococcus aureus</i> auf die T-Zellpopulationen in der Glomerulonephritis	39
Abbildung 22: Der Einfluss einer vorherigen Infektion mit <i>Staphylococcus aureus</i> auf die T-Zellantwort in der Glomerulonephritis	40
Abbildung 23: Genexpressionsanalysen von in der cGN relevanten Genen nach vorheriger <i>S. aureus</i> Infektion	41
Abbildung 24: Analyse der Lokalisierung der IL-17A produzierenden Zellen in der cGN	42
Abbildung 25: Der Einfluss einer vorherigen <i>S. aureus</i> Infektion auf den Verlauf der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG)	43
Abbildung 26: Analyse der T-Zellpopulationen in Mäusen mit EAG nach vorangegangener <i>S. aureus</i> Infektion.	44
Abbildung 27: Analyse der T-Zellpopulationen in der EAG nach vorangegangener <i>S. aureus</i> Infektion	45
Abbildung 28: IL-17A Neutralisation während der cGN	46
Abbildung 29: Untersuchung der T-Zellpopulationen in der cGN bei anti-IL-17A Behandlung	47
Abbildung 30: Untersuchung der T-Zellantwort in der cGN bei anti-IL-17A Behandlung	48
Abbildung 31: Genexpressionsanalysen relevanter Gene in der cGN nach vorheriger <i>S. aureus</i> Infektion bei anti-IL-17A Behandlung	48
Abbildung 32: Der Einfluss der Depletion der IL-17A produzierenden Zellen für den Verlauf der cGN nach vorheriger Infektion mit <i>S. aureus</i>	49
Abbildung 33: In vivo Analyse der IL-17A Produktion durch T-Zellen nach Induktion der cGN	51
Abbildung 34: Darstellung der FACS-Sortierung von CD4 ⁺ T-Zellen aus der Niere	52
Abbildung 35: Zytokinproduktion von gereinigten CD4 ⁺ T-Zellen nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen in vitro	53
Abbildung 36: Behandlung der cGN durch Neutralisation von pro-inflammatorischen Zytokinen	54
Abbildung 37: Analyse der T-Zellpopulationen nach Behandlung der cGN durch die Neutralisation pro-inflammatorischer Zytokine	54
Abbildung 38: Analyse der T-Zellantwort nach Behandlung der cGN durch die Neutralisation pro-inflammatorischer Zytokine	55

Abbildung 39: Durchflusszytometrische Analyse von gesundem humanen Nierengewebes	56
Abbildung 40: Eingrenzung von CD4 ⁺ T-Zellen und ihrer Zytokinproduktion	89
Abbildung 41: Eingrenzung von Gewebe-residenten CD4 ⁺ T-Zellen	90

10.5 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
<	kleiner als
>	größer als
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANCA anti	Neutrophile zytoplasmatische Antikörper
ANOVA	analysis of variance
anti-GBM-GN	anti-glomeruläre Basalmembran-Glomerulonephritis
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BSA	bovines Serumalbumin
BUN	blood urea nitrogen
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CFU	colony forming units
cGN	crescentic Glomerulonephritis
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxinrezeptor

EAG	experimentelle autoimmune Glomerulonephritis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein
Foxp3	forkhead box protein 3
frw	forward
FSC	forward scattered light
g	gramm
GBM	glomeruläre Basalmembran
GM-CSF	granulocyte and macrophage colony-stimulation factor
GN	Glomerulonephritis
H	hour
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFA	inkomplettes Freund's Adjuvant
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
Kat	Katushka

KFA	komplettes Freunds Adjuvant
KO	knock out
L	Liter
LB	lysogeny broth
LLO	Listeriolysin
M	Molar
m	murin
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
ng	Nanogramm
NRS	normales Rattenserum
NTN	nephrotoxische Nephritis
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PacO	pacific orange
PAS	periodic acid-Schiff
PBS	Phosphat-gepuffertes Salz
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin

PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
rev	reverse
RNA	ribonucleic acid
ROR γ t	RAR-related orphan receptor
RPGN	rasch progrediente Glomerulonephritis
s.c.	subkutan
SSC	side scattered light
STAT	signal transducer and activator of transcription
T-bet	T-box transcription factor
TCR	T-cell receptor
Th-Zelle	T-Helferzelle
TierSchG	Tierschutzgesetz
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	regulatorische T-Zelle
TSB	Tryptic soy broth
U	unit
WT	Wildtyp
YFP	yellow fluorescent protein
α 3(IV)NC1	nicht-Kollagendomäne 1 der α 3-Kette von Kollagen IV
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

10.6 Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker für die Bereitstellung und Finanzierung des interessanten Themas sowie die Möglichkeit die Arbeit am Institut für Immunologie anzufertigen. Vielen Dank für viele anregende fachliche Diskussionen und natürlich auch die gute Betreuung, Unterstützung und alltäglichen Unterhaltungen beim Kaffee oder gemeinsamen Mittagspausen.

Für die Übernahme der Betreuung während meiner Promotion möchte ich Prof. Dr. Wolfram Brune danken. Zusätzlich gilt mein Dank Prof. Dr. Hartmut Schlüter für die Begutachtung meiner Dissertation.

Für die tolle Atmosphäre und Stimmung in der Arbeitsgruppe innerhalb und natürlich auch außerhalb des Labors möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Mittrücker bedanken. Vielen Dank für unzählige lustige und schöne Kaffee- und Mittagspausen. Natürlich auch für Konferenzteilnahmen, Sommerfeste und Unternehmungen außerhalb des Labors. Vielen Dank Joanna für die Unterstützung, Hilfe und schöne Gespräche. Danke Steffi für das Aufräumen und tatkräftige Unterstützung gerade am Anfang. Danke Karsten, Niels, Alexandra, Fredi für die schöne Zeit, Hilfe und Stimmung im Labor. Mein Dank gilt natürlich auch Moritz, Aenne, Karen, Max, Tabea und Constantin, die auch zur tollen Atmosphäre beigetragen und mich unterstützt haben. Danke Constantin für den gesteigerten espressokonsum. Ich möchte mich natürlich auch noch bei allen anderen Mitgliedern des Instituts für Immunologie für die Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt auch den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Ulf Panzer, PD Dr. Jan-Eric Turner und PD Dr. Christian Krebs aus der Nephrologie. Vielen Dank Christian für die Hilfe bei den Experimenten und die guten Zusammenarbeit. Vielen Dank an Alina, Anett und Anna für technische Unterstützung, besonders bei der Histologie. Vielen Dank Malte und Patricia für viele interessante Stunden bei verschiedensten *S. aureus* Experimenten. Mein besonderer Dank gilt Dr. Hans-Joachim Paust für die exzellente Unterstützung in allen möglichen technischen Fragestellungen und schönen nichttechnischen Gesprächen.

Diese Arbeit wurde durch den SFB1192 „Immune-Mediated Glomerular Diseases“ ermöglicht und finanziert. Daher auch noch einmal vielen Dank an die Organisatoren, für die Finanzierung des Projekts und die Möglichkeit Kongresse zu besuchen.

Vielen Dank an alle, die sich beim Korrigieren durch meine Arbeit gequält haben, besonders Sven und Steffi.

Vielen Dank auch an alle Freunde, die mich unterstützt haben. Entweder direkt bei der Arbeit oder durch Ablenkung von der Arbeit.

Für die lange Unterstützung in der Schule, im Studium und natürlich auch während der Doktorarbeit möchte ich mich bei meinen Eltern und Großeltern herzlichst bedanken, ebenso bei meinem Bruder Sven. Vielen Dank, ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Zuletzt möchte ich natürlich auch Svenja für die tolle Zeit, Verständnis und Unterstützung bedanken.

10.7 Publikationsliste und Kongressbeiträge

Beteiligte Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

„Role of regulatory T cells in experimental autoimmune glomerulonephritis“

Stefanie Klinge, Karsten Yan, Daniel Reimers, Karen-Maria Brede, Joanna Schmid, Hans-Joachim Paust, Christian F. Krebs, Ulf Panzer, Helmut Hopfer, Hans-Willi Mittrücker. Am J Physiol Renal Physiol 316: F572–F581, 2019.

Teile dieser Arbeit sind in folgender vorbereiteter Publikation verwendet worden:

„Pathogen-induced tissue-resident memory T cells amplify organ-specific autoimmunity“

Christian F. Krebs*, Daniel Reimers*, Yu Zhao , Hans-Joachim Paust, Patricia Bartsch, Sarah Nuñez, Mariana V. Roseblatt , Malte Hellmig, Christoph Kilian, Alina Borchers, Leon U. B. Enk, Michael Zinke, Martina Becker, Joanna Schmid, Stefanie Klinge, Milagros N. Wong, Victor G. Puelles, Maja T. Lindenmeyer, Clemens D. Cohen, Michael Rink, Sören Franzenburg, Friedrich Nolte, Jan-Eric Turner, Jan-Hendrik Riedel, Samuel Huber, Nicola Gagliani, Tobias B. Huber, Thorsten Wiech, Holger Rohde, Maria Rosa Bono, Stefan Bonn, Ulf Panzer, Hans-Willi Mittrücker

* geteilte Erstautorenschaft

Kongressbeiträge:

„Autoreactive T-cell responses in Membranous Nephropathy“

Poster, 47. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie, Erlangen, 2017

„*Staphylococcus aureus* induced Th17 cell accumulation aggravates renal autoimmune disease“

Poster, ECI Congress Amsterdam, 2018

„*Staphylococcus aureus-induced* tissue-resident memory T helper 17 cells (T_{RM}17 cells) drive renal autoimmune disease“

Poster, IUIS, Peking, 2019, akzeptiert

„*Staphylococcus aureus-induced* tissue-resident memory T helper 17 cells (T_{RM}17 cells) drive renal autoimmune disease“

Vortrag, II Joint Meeting of the German Society for Immunology (DGfI) and the Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology (SIICA),

München, 2019, akzeptiert

10.8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Datum, Unterschrift

Korrekturen

In Abbildung 8 auf Seite 23 wurden analog zu Abbildung 7 auf Seite 22 die Zeitpunkte der Analyse (Kontrolle, 3, 10, 30, 30) eingefügt.