

Die Rolle von regulatorischen T-Zellen in der autoimmunen anti-glomerulären Basalmembran-Glomerulonephritis

Dissertation

zum Erlangen des naturwissenschaftlichen Doktorgrades (*Dr. rer. nat.*)
eingereicht am Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

vorgelegt von
Stefanie Ahrens
aus Bremen

Hamburg, März 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfram Brune

Tag der Disputation: 27. Mai 2016

Datum der Druckfreigabe: 27. Mai 2016

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Februar 2013 bis März 2016 im Institut für Immunologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VII
Abstract	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Die Niere – Anatomie und Funktion	1
1.2 Glomerulonephritiden	3
1.2.1 Anti-GBM-GN und Goodpasture-Syndrom im Menschen	4
1.2.1.1 Das Goodpasture-Antigen	5
1.3 Tierexperimentelle Modelle zur Untersuchung der anti-GBM-GN	6
1.3.1 Die experimentelle autoimmune Glomerulonephritis	6
1.4 CD4 T-Zellen - Selektion, Differenzierung und Funktion	7
1.4.1 CD4 T-Zellen in autoimmunen Nierenerkrankungen.....	9
1.4.2 Regulatorische T-Zellen.....	10
1.4.2.1 Regulatorische T-Zellen in Autoimmunerkrankungen, insbesondere autoimmunen Nierenerkrankungen	12
2 Zielsetzung der Arbeit	13
3 Ergebnisse	14
3.1 Akkumulation von regulatorischen T-Zellen in der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis	14
3.2 Depletion der regulatorischen T-Zellen in der späten Phase der EAG	17
3.2.1 Krankheitsverlauf nach Induktion der EAG und Behandlung mit Diphtherietoxin in DEREK und wt Mäusen.....	18
3.2.2 Verlust der Nierenfunktion.....	19
3.2.3 Spezifische Autoantikörperantwort gegen $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$	21
3.2.4 Charakterisierung der T-Zellantwort.....	22
3.2.5 Renale Makrophageninfiltration	25
3.3 Blockade des IL-10 Signalweges in der späten Phase der EAG	28
3.3.1 Krankheitsverlauf nach Induktion der EAG und neutralisierender Blockade des IL-10R von Woche 7 bis 10 in DBA/1 wt Mäusen	29
3.3.2 Immunzellen in Milz und Niere.....	31
3.3.3 h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische T-Zellantwort in der Milz	32
3.4 Depletion der regulatorischen T-Zellen in der frühen Phase der EAG	35

3.4.1	Krankheitsverlauf bei Immunisierung mit h- α 3(IV)NC1 und paralleler Behandlung mit Diphtherietoxin in DERE α und wt Mäusen	36
3.4.2	Verlust der Nierenfunktion.....	37
3.4.3	m- α 3(IV)NC1-spezifische Antikörperantwort.....	38
3.4.4	T-Zellen und Makrophagen in Milz und Niere.....	39
3.4.5	h- α 3(IV)NC1-spezifische T-Zellantwort in der Milz	41
4	Diskussion.....	44
4.1	Die Rolle der regulatorischen T-Zellen in der späten Phase der EAG	45
4.1.1	Blockade der IL-10 Rezeptor Signalkaskade.....	48
4.2	Die Rolle der regulatorischen T-Zellen in der frühen Phase der EAG	49
4.3	Tregs in der anti-GBM-GN – NTN vs. EAG.....	52
5	Ausblick	54
6	Material und Methoden	55
6.1	Materialien	55
6.1.1	Geräte	55
6.1.2	Chemikalien.....	55
6.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	58
6.1.4	Kits.....	58
6.1.5	Primer	58
6.1.6	Antikörper	59
6.1.7	Software	60
6.1.8	Statistik.....	60
6.2	Methoden	62
6.2.1	Tierexperimentelle Methoden.....	62
6.2.1.1	Mauslinien.....	62
6.2.1.2	Induktion der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG).....	62
6.2.1.3	Verlaufskontrolle der EAG.....	62
6.2.1.4	Depletion der Foxp3 ⁺ Zellen mittels Diphtherietoxin.....	63
6.2.2	Zellbiologische Methoden.....	64
6.2.2.1	Präparation der Organe	64
6.2.2.2	Zellisolierung aus murinem Gewebe.....	64
6.2.2.3	in vitro Stimulation	64
6.2.2.4	Extrazelluläre und intrazelluläre Färbung für durchflusszytometrische Analysen	65
6.2.2.5	Analyse und Auswertung von durchflusszytomterischen Daten.....	65
6.2.2.6	Zellkultur	67
6.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	68
6.2.3.1	Proteinreinigung.....	68

6.2.4	Immunologische Methoden	68
6.2.4.1	Indirekter Antikörper-ELISA	68
6.2.4.2	Albumin-ELISA.....	69
6.2.5	Histologie.....	69
6.2.5.1	PAS-Reaktion zur histochemischen Untersuchung von Halbmondbildungen, Fibrineinlagerung und Sklerose.....	69
6.2.5.2	Mac-2-Färbung zur immunhistochemischen Untersuchung der glomerulären Makrophagen	69
6.2.6	Molekularbiologische Methoden	70
6.2.6.1	RNA Isolation.....	70
6.2.6.2	cDNA Synthese.....	70
6.2.6.3	Quantitative Echtzeit-PCR.....	71
7	Literaturverzeichnis.....	72
8	Anhang.....	82
8.1	Tabellenverzeichnis	82
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	83
8.3	Sicherheit und Entsorgung.....	85
8.3.1	H-Sätze.....	86
8.3.2	P-Sätze.....	87
8.4	Publikationsliste und Kongressbeiträge.....	89
8.5	Danksagung.....	90
8.6	Eidesstattliche Erklärung	92

Zusammenfassung

Die anti-glomeruläre Basalmembran-Glomerulonephritis ist eine Autoimmunerkrankung, die gegen Strukturen des Typ IV Kollagens gerichtet ist. Es werden Antikörper gegen die $\alpha 3$ -Kette der nicht-Kollagendomäne 1 ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) gebildet, die sich entlang der Basalmembran in den Glomeruli ablagern und zu einem Verlust der Filterfunktion der Niere führen. Humane und tierexperimentelle Studien zeigen außerdem eine Beteiligung von T-Zellen in der Krankheitsentwicklung. Im Modell der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG) in DBA/1 Mäusen wurden $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische CD4 T-Zellen in der entzündeten Niere identifiziert, welche eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer halbmondförmigen und nekrotisierenden Glomerulonephritis spielen. Foxp3^+ regulatorische T-Zellen begrenzen immunpathologische Reaktionen und sind wichtige Mediatoren der peripheren Toleranz. Sie können über verschiedene Mechanismen die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen unterbinden und am Ort der Entzündung den Gewebeschaden limitieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte im EAG Modell die Rolle von regulatorischen T-Zellen in der Kontrolle der $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen Immunantwort und in der Begrenzung des Nierenschadens untersucht werden. Dazu wurden DEREK Mäuse mit h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ immunisiert und entweder in der späten Phase der EAG oder während der Immunisierung mit Diphtherietoxin behandelt. DEREK Tiere exprimieren unter der Kontrolle des *Foxp3* Promoters den humanen Diphtherietoxinrezeptor. Dies ermöglicht eine kontrollierte Depletion der Foxp3^+ Zellen durch die Injektion von Diphtherietoxin.

Eine Depletion der regulatorischen T-Zellen in einem späten Stadium der EAG resultierte in einer erhöhten mRNA Expression von *Cxcl9*, *Ifng* und *Il17a* in der Niere was auf eine vermehrte Aktivität von Th1 und Th17 Zellen hindeutet. Insgesamt zeigte sich aber nur ein leicht verstärkter Nierenschaden mit einem Trend zu mehr Makrophagen in der Niere. Die Depletion während der Immunisierungsphase führte zu höheren Titern an m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen Autoantikörpern und einem früher eintretenden Verlust der Nierenfunktion, bezogen auf die Entwicklung einer deutlichen Proteinurie. In der Niere von Mäusen im EAG Endstadium akkumulierten mehr CD4 T-Zellen und innerhalb dieser Population fanden sich höhere Frequenzen an CD4 T-Zellen, die nach Stimulation mit $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ sowohl $\text{IFN-}\gamma$ als auch $\text{TNF-}\alpha$ produzierten.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für eine protektive Rolle der regulatorischen T-Zellen beim Entstehen der Autoimmunität gegenüber $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ während der Immunisierung. In der späten Phase der EAG, beim Übergang der Erkrankung in eine halbmondförmige und nekrotisierende Glomerulonephritis, deuten unsere Ergebnisse nur auf eine untergeordnete Rolle von regulatorischen T-Zellen in der lokalen Unterdrückung des Entzündungsgeschehens hin.

Abstract

Anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis is an autoimmune disease characterized by the development of autoantibodies against the $\alpha 3$ -chain of type IV collagen ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) which deposit along the basement membrane and thereby cause loss of renal filter function. Beside $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -specific antibodies, there is also evidence for the involvement of $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -specific T cells in disease formation and progression. In the model of experimental autoimmune glomerulonephritis (EAG) in DBA/1 mice, which shows all important hallmarks of human anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -specific T helper cells could be identified in the inflamed kidney. These cells contribute to the progression of renal inflammation to a crescentic and necrotizing glomerulonephritis. Foxp3⁺ regulatory T cells restrict immune pathology and are central mediators of peripheral tolerance. Via diverse suppressive mechanisms, they are able to inhibit autoreactive T-cell responses and to limit tissue damage during local immune responses.

The aim of the present study was to characterize the role of regulatory T cells in the control of $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -specific T-cell responses and in disease progression in the EAG mouse model. For this purpose, DEREK mice were immunised with recombinant human $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ and regulatory T cells were depleted by injection of diphtheria toxin either during immunisation or in the late stage of EAG development. DEREK mice express the human diphtheria toxin receptor under the control of the *foxp3* promoter and injection of diphtheria toxin leads to depletion of Foxp3⁺ cells.

Depletion in the late stage of EAG development resulted in a higher mRNA expression of *Cxcl9*, *Ifng* and *Il17a* which indicated an increased activity of Th1 and Th17 cells in the inflamed kidney. Nevertheless, only a trend to a more aggravated tissue pathology and a to more pronounced macrophage recruitment into the kidney could be observed. Depletion of regulatory T cells during the immunisation led to higher titers of murine $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -specific autoantibodies and an accelerated loss of renal filter function with marked proteinuria. In the inflamed kidney, enhanced accumulation of CD4 T cells could be detected. Within this population, a higher frequency of CD4 T cells produced IFN- γ and TNF- α after stimulation with $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$.

Taken together, these results indicate a protective role for regulatory T cells during the development of autoimmunity against $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. In the late phase of EAG development regulatory T cells seem to play only a minor role in preventing local immune

responses and in inhibiting progression of disease to a crescentic and necrotizing glomerulonephritis.

Abkürzungsverzeichnis

-/-	<i>knockout</i>
%	Prozent
°C	Grad Celsius
<	kleiner als
>	größer als
A	Fläche
AK	Antikörper
ANCA	anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper
anti-GBM-GN	anti-glomeruläre Basalmembran-Glomerulonephritis
AP	alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
BUN	<i>blood urea nitrogen</i>
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>cyclic deoxyribonucleic acid</i>
CTLA4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
CXCL9	CXC-Chemokinligand 9
DC	dendritische Zelle
DEREG	<i>depletion of regulatory T cells</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DN	doppelt negative Thymozyten
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DP	doppelt positive Thymozyten
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
E _A	immunogenes Epitop A
EAG	experimentelle autoimmune Glomerulonephritis
E _B	immunogenes Epitop B

eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein
Foxp3	<i>forkhead box protein 3</i>
frw	<i>forward</i>
FSC	<i>forward scattered light</i>
GBM	glomeruläre Basalmembran
GM-CSF	<i>granulocyte and macrophage colony-stimulation factor</i>
GN	Glomerulonephritis
H	Höhe
h	human
HCL	Salzsäure
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
i.p.	intraperitoneal
IFA	inkomplettes Freud's Adjuvant
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-10R	Interleukin-10 Rezeptor
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
IPEX	<i>immunodysregulation polyendocrinopathy X-linked syndrome</i>
kDa	Kilodalton
KFA	komplettes Freud's Adjuvant
l	Liter
LAG3	Lymphozyten-aktivierendes Gen 3
M	molar
m	murin
MCP1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>

MIG	<i>monokine-induced by gamma interferon</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS	Multiple Sklerose
NC1	nicht-Kollagendomäne 1
ng	Nanogramm
NRS	normales Rattenserum
ns	nicht signifikant
NTN	nephrotoxische Nephritis
OD	optische Dichte
PacO	<i>pacific orange</i>
PAS	<i>periodic acid-Schiff</i>
PBS	Phosphat-gepuffertes Salz
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
rev	<i>reverse</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROR γ t	<i>RAR-related orphan receptor</i>
RPGN	rasch progrediente Glomerulonephritis
S=N	Sulfiliminbindung
s.c.	subkutan
SEM	<i>standard error of mean</i>
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SSC	<i>side scattered light</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T-bet	<i>T-box transcription factor</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
Th-Zelle	T-Helferzelle
TierSchG	Tierschutzgesetz
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zellrezeptor
U	<i>unit</i>
wt	Wildtyp
$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$	nicht-Kollagendomäne 1 der $\alpha 3$ -Kette von Kollagen IV
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Die Niere – Anatomie und Funktion

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, dessen Hauptaufgabe es ist das Blut zu filtern und toxische Stoffwechselprodukte aus dem Kreislauf zu entfernen. Zu den weiteren Funktionen zählen die Aufrechterhaltung der Homöostase, die Regulation des Wasser- und Säure-Basen-Haushalts sowie die Produktion verschiedener Hormone.

Jede Niere enthält ca. 1 Million funktionelle Einheiten, die sogenannten Nephrone. Sie umfassen je ein Nierenkörperchen, das in der Nierenrinde liegt und das dazugehörige Tubulussystem, welches bis ins Nierenmark reicht. Im Nierenkörperchen befindet sich der Glomerulus, ein Kapillarknäuel, das von der Bowman-Kapsel umgeben ist. In den dazwischenliegenden Kapselraum wird der Primärharn filtriert. Der dafür benötigte glomeruläre Filter besteht aus den fenestrierten Endothelzellen der Blutkapillare, der kollagenhaltigen glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten, die mit ihren Fußfortsätzen eine Schlitzmembran bilden. Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 60 Kilodalton (kDa) können den glomerulären Filter passieren und fließen mit dem Primärharn in das Tubulussystem, welches in den proximalen und distalen Tubulus sowie die Henle-Schleife eingeteilt wird. Der Primärharn wird dort durch Sekretion und Resorption konzentriert und als Sekundärharn in die Harnblase geleitet. Der Sekundärharn beträgt etwa 1% des Primärharnvolumens. Der Aufbau der Niere ist schematisch in Abbildung 1 gezeigt.

Einleitung

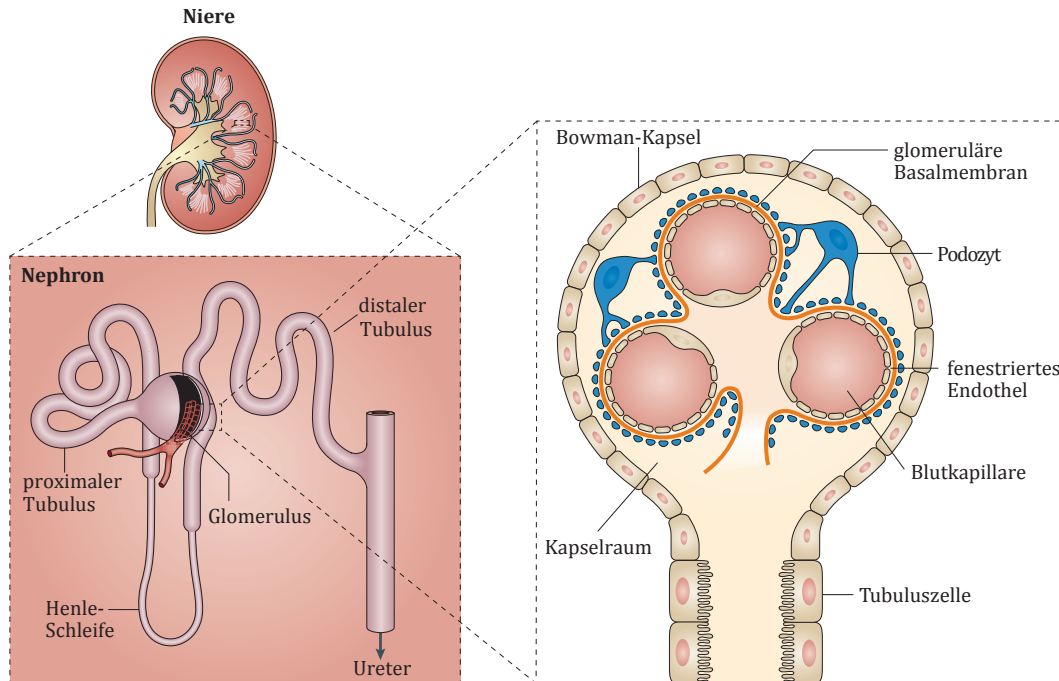


Abbildung 1 | Schematische Darstellung der Nierenanatomie. Die funktionellen Einheiten der Niere stellen die Nephronen dar. Jedes Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen und dem dazugehörigen Tubulussystem. Nierenkörperchen befinden sich in der Nierenrinde und umfassen ein Kapillarknäuel, den Glomerulus, und die umgebende Bowman-Kapsel. Fenestriertes Endothel, glomeruläre Basalmembran und Podozyten des Glomerulus bilden die Filtrationseinheit der Niere. (Abbildung modifiziert nach 1)

Täglich werden etwa 170-180 Liter Primärharn gebildet durch den sogenannte harnpflichtige Substanzen, die im Stoffwechsel entstehen, aus dem Körper ausgeschieden werden. Zu diesen Stoffwechselprodukten gehören vor allem Harnstoff, Harnsäure sowie Kreatinin. Mittels der Konzentration dieser Stoffe im Blut kann eine Aussage über die Nierenfunktion getroffen werden, was in der Diagnostik von Nierenerkrankungen Anwendung findet. Niereninsuffizienz tritt erst ein bei Verlust von mehr als 60-70% funktionierender Nephronen, womit die Niere eines der effizientesten Organe des menschlichen Körpers darstellt.

Krankhafte Veränderungen der Niere unterteilt man in Glomerulonephritiden und tubulointerstitielle Nierenerkrankungen. Bei Glomerulonephritiden spielen hauptsächlich Autoimmunprozesse eine Rolle, während bei tubulointerstitiellen Erkrankungen oft Gifte oder vor allem bakterielle Infektionen die Ursache sind.

1.2 Glomerulonephritiden

Als Glomerulonephritis (GN) bezeichnet man eine immunvermittelte Erkrankung beider Nieren bei der es zu einer intraglomerulären Inflammation kommt. Man unterscheidet dabei primäre und sekundäre Glomerulonephritiden. Eine primäre GN manifestiert sich direkt an den Glomeruli ohne systemische Beteiligung, wohingegen eine sekundäre GN oftmals die Folge einer vorhergehenden Systemerkrankung ist, z. B. des systemischen Lupus erythematodes (SLE).

Eine relativ seltene, jedoch sehr aggressive Form der GN, stellt die Gruppe der rasch progredienten Glomerulonephritiden (RPGN) dar. Unbehandelt führen diese Erkrankungen innerhalb von sechs Monaten zu terminaler Niereninsuffizienz. Ein charakteristischer histologischer Befund bei RPGN ist eine halbmondförmige Proliferation von Endothelzellen und vermutlich auch Immunzellen innerhalb der Glomeruli (Abbildung 2).

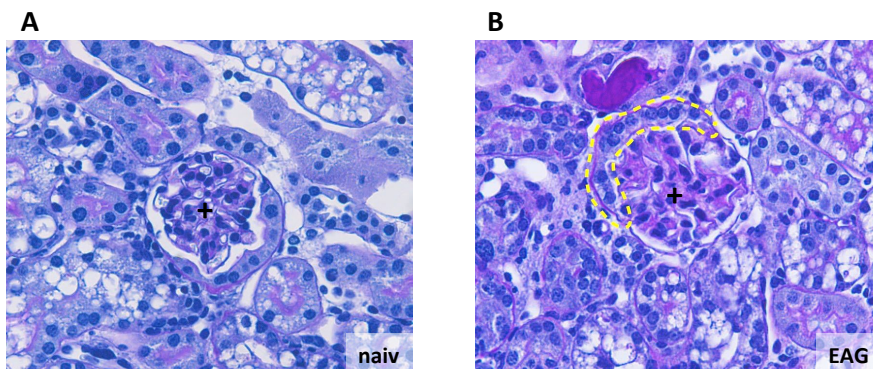


Abbildung 2 | Glomeruläre Halbmondbildung in der Niere durch rasch progrediente Glomerulonephritis. Repräsentative PAS-Reaktion auf Nierenparaffinschnitten einer gesunden (A) und schwerkranken Niere mit fortgeschrittener Halbmondbildung (gelb) (B). Die Aufnahmen wurden mit 40-facher Vergrößerung aufgenommen, die Kreuze markieren jeweils das Zentrum eines Glomerulus.

Je nach Pathogenese teilt man die RPGN in drei Typen ein:

Typ 1) Bei der anti-glomerulären Basalmembran-Glomerulonephritis (anti-GBM-GN) werden Antikörper gegen den Hauptbestandteil der Basalmembran, Kollagen IV, gebildet, die sich linear entlang der Basalmembran ablagern. Kommt es zusätzlich zu einer Lungenbeteiligung, welche sich symptomatisch in Hämoptysen äußert, nennt man die Erkrankung Goodpasture-Syndrom, nach Ernest W. Goodpasture, der diese

Einleitung

pulmo-renale Kombination 1919 das erste Mal beschrieb². Mit ca. 10% ist die anti-GBM-GN die seltenste Form der RPGN.

Typ 2) Patienten mit einer Immunkomplex-vermittelten RPGN zeigen granuläre Ablagerungen von Immunkomplexen entlang der Basalmembran. Die häufigste Form ist die Immunglobulin A-Nephropathie (IgA-Nephropathie). Dabei werden anormale IgA produziert, die zusammen mit den gegen sie gerichteten Antikörpern die charakteristischen Immunkomplexe formen. Dieser Typ macht ca. 40% aller RPGN aus.

Typ 3) Zum Typ 3 der RPGN gehören die ANCA-assoziierten GN. Dabei bildet das Immunsystem Antikörper gegen zytoplasmatische Bestandteile von Neutrophilen (ANCA=*anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*). Es kommt zu keiner oder nur einer geringfügigen glomerulären Ablagerung. Mit knapp 50% stellen die ANCA-assoziierten GN die häufigste Form der RPGN dar.

1.2.1 Anti-GBM-GN und Goodpasture-Syndrom im Menschen

Anti-GBM-GN ist eine organspezifische Autoimmunerkrankung der Nieren, bei der Autoantikörper gegen die $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -Kette der nicht-Kollagendomäne von Kollagen IV ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) der glomerulären Basalmembran gebildet werden³. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeiten des Kollagennetzwerks in der Niere und der Lunge⁴ kommt es in Patienten oft auch zu einer Beteiligung der Lungen, die sich durch alveoläre Hämorrhagie äußert². Pathologisch ist diese Form der RPGN durch eine glomeruläre Halbmondbildung und eine lineare Ablagerung autoreaktiver Immunglobuline G (IgG) entlang der GBM gekennzeichnet⁵. Durch die Ablagerung dieses Antikörpersubtyps kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems und einer Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophilen in die Glomeruli⁶.

Mit einer Inzidenz von ca. 1/ 1 Million pro Jahr handelt es sich bei der anti-GBM-GN/ beim Goodpasture-Syndrom um eine äußerst seltene Erkrankung, deren exakte Ursache bisher noch unklar ist⁷. Eine genetische Prädisposition konnte allerdings für das Allel DRB1*15:01 des humanen Leukozytenantigens (HLA) gezeigt werden⁸.

Unbehandelt endet die Erkrankung auf Grund terminaler Niereninsuffizienz oder Lungenblutungen meist tödlich. Eine kombinierte Therapie aus Plasmapherese sowie hohen Dosen an Corticosteroiden und Cyclophosphamiden verbessert die Prognose⁹ und stellt bis heute den Standard in der Behandlung von anti-GBM-GN dar^{10,11}. Eine

Einleitung

Nierentransplantation wird erst dann eine Option, wenn über zwölf Monate hinweg keine Autoantikörper mehr im Blut detektiert wurden und die Erkrankung sich seit mindestens sechs Monaten in Remission, ohne jeglichen Einsatz von zytotoxischen Medikamenten, befindet¹¹.

1.2.1.1 Das Goodpasture-Antigen

Der Hauptbestandteil der glomerulären Basalmembran ist, neben Laminin, Entaktin/Nidogen und Proteoglykanen, das Kollagen IV¹². Sechs genetisch ungleiche, strukturell aber sehr ähnliche α -Helices (α 1- α 6) formen sogenannte Protomere, einen Zusammenschluss aus jeweils drei dieser Helices in unterschiedlicher Zusammensetzung. Jedes Protomer besteht aus einer N-terminalen 7S Domäne, einer langen Kollagendomäne und einer nicht-Kollagendomäne am C-Terminus (NC1). Die mehrdimensionale Struktur der Basalmembran entsteht durch weitere Verknüpfungen zweier NC1 Trimere und vier 7S Dreifachhelices. In der Niere findet man überwiegend α 3. α 4. α 5(IV) Hexamere^{3,4}, die darüber hinaus auch in der alveolären Basalmembran vorzufinden sind.

Das Autoantigen, auch Goodpasture-Antigen, konnte bereits in den 80er Jahren als α 3(IV)NC1 identifiziert werden¹³⁻¹⁶. 1999 wurden zwei Aminosäuresequenzen (17-31 und 126-141) identifiziert, die innerhalb der α 3(IV)NC1-Domäne die immunogenen Epitope E_A und E_B darstellen. In der α 5(IV)NC1-Domäne konnte später eine homologe Sequenz zu E_A ausgemacht werden, welche ebenfalls von pathogenen Autoantikörpern erkannt wird³. E_A und E_B stellen in der gesunden Niere kryptische Epitope dar, die dem Immunsystem nicht zugänglich sind¹⁷, da die α 3. α 4. α 5(IV) Hexamere durch Sulfiliminbindungen (S=N) kovalent miteinander verknüpft sind¹⁸. Erst durch die Dissoziation der Bindungen kommt es zu einer Konformationsänderung innerhalb der NC1 Domänen, E_A und E_B werden freilegt und sind somit dem Immunsystem zugänglich (siehe Abbildung 3). Warum es in seltenen Fällen zu dieser Dissoziation der NC1 Domänen kommt, ist bisher noch nicht aufgeklärt.

Einleitung

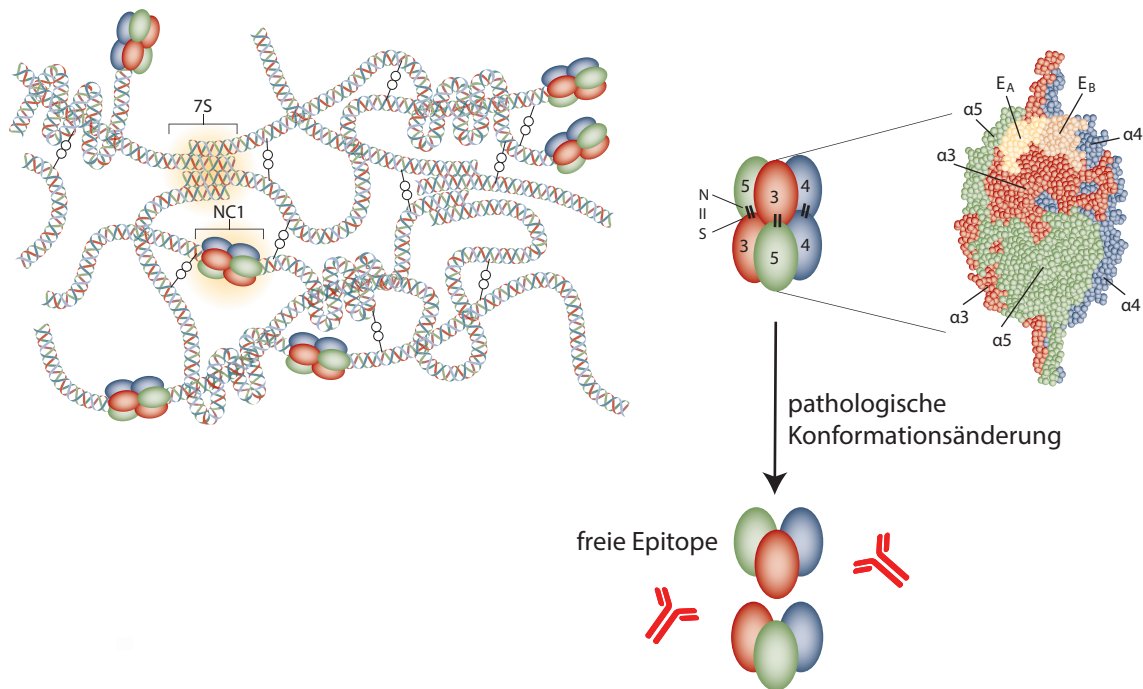


Abbildung 3 | Mehrdimensionale Struktur des Kollagen IV in der glomerulären Basalmembran und Freilegung der immunogenen Epitope. In der gesunden Niere sind die $\alpha3.\alpha4.\alpha5(IV)NC1$ Hexamere fest durch kovalente Sulfidbrückenbindungen ($S=N$) quervernetzt. Beim Goodpasture-Syndrom kommt es, aus bisher nicht definierten Gründen, zu einer pathologischen Konformationsänderung innerhalb der Hexamere, sodass die immunogenen Epitope E_A und E_B innerhalb der $\alpha3(IV)NC1$ - und $\alpha5(IV)NC1$ -Domänen dem Immunsystem zugänglich gemacht werden. (Abbildung modifiziert nach 19)

1.3 Tierexperimentelle Modelle zur Untersuchung der anti-GBM-GN

Das bestuntersuchte Tiermodell zur anti-GBM-GN ist die nephrotoxische Nephritis (NTN). Dabei werden heterologe anti-Maus Antikörper, die gegen nicht näher definierte Strukturen der Niere gerichtet sind, aus dem Schaf in Empfängermäuse injiziert. Diese Tiere entwickeln innerhalb von wenigen Tagen eine fatale Nephritis mit Antikörperkomplexablagerungen entlang der GBM, glomerulärer Halbmondbildung und Infiltration von Immunzellen. NTN ist daher bestens geeignet für die Analyse der zellulären Immunantwort einer anti-GBM Glomerulonephritis. Allerdings lässt es keine Rückschlüsse auf die Autoimmunprozesse zu.

1.3.1 Die experimentelle autoimmune Glomerulonephritis

1962 wurden das erste Mal Schafe mit Bestandteilen humaner GBM immunisiert. Diese entwickelten die charakteristischen Autoantikörper gegen GBM-Bestandteile und zeigten eine halbmondförmige Proliferation in den Glomeruli²⁰. Sado *et al.* etablierten dann das Modell der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG) von Steblay, also der Immunisierung mit GBM Bestandteilen, in genetisch empfänglichen

Einleitung

Wistar Kyoto Ratten²¹. Mit der Identifizierung des Goodpasture-Antigens und dessen Struktur wurde die EAG dahingehend weiterentwickelt, dass das $\alpha3(\text{IV})\text{NC1}$ rekombinant hergestellt wurde und zur Immunisierung eingesetzt werden kann²¹⁻²³.

Der Vorteil der EAG ist, dass sie, im Gegensatz zur NTN, zusätzlich zur Charakterisierung der zellulären Immunantwort auch die Untersuchung der Autoimmunprozesse erlaubt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse nach dem von Hopfer *et al.* entwickelten Verfahren immunisiert^{23,24}. Dabei wird das $\alpha3(\text{IV})\text{NC1}$ rekombinant in einem eukaryotischen Expressionssystem produziert und anschließend in größeren Mengen gereinigt. Genetisch empfängliche DBA/1 Mäuse werden wiederholend mit dem rekombinanten Protein immunisiert. Bereits nach zwei Wochen lassen sich $\alpha3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische Antikörper im Blutplasma detektieren und ab Woche 7 zeigen die ersten Tiere eine erhöhte Proteinurie, die ab Woche 9 stark nephrotisch wird. Schwerkranke Mäuse zeigen zudem eine hohe Konzentration an Stickstoff im Plasma und histologisch weisen die Nieren dieser Tiere die charakteristische Halbmondbildung innerhalb der Glomeruli sowie die Ablagerung von IgG und Komplementfaktor C3 entlang der GBM auf²⁴.

1.4 CD4 T-Zellen - Selektion, Differenzierung und Funktion

Bei der Entwicklung einer Autoimmunerkrankung spielen neben Antikörper-produzierenden B-Zellen vor allem autoreaktive T-Zellen eine entscheidende Rolle.

T-Zellvorläufer entstehen im Knochenmark und gelangen über die Blutgefäße als CD4⁻CD8⁻ doppelt negative Thymozyten (DN Thymozyten) in den Thymus. Die Interaktion mit kortikalen Epithelzellen des Thymus induziert die Differenzierung und Proliferation der Vorläufer sowie die Ausbildung eines funktionsfähigen T-Zellrezeptors (TZR). Aus den DN Thymozyten reifen somit CD4⁺CD8⁺ doppelt positive Thymozyten (DP Thymozyten) heran. DP Thymozyten durchmachen anschließend eine Reihe von Selektionsprozessen basierend auf der Interaktion ihres TZR mit den durch *major histocompatibility complex* (MHC) präsentierten Autoantigenen (positive und negative Selektion) auf Epithelzellen des Thymus und/ oder dendritischen Zellen (DC). Lediglich Thymozyten mit einer intermediären Affinität ihres TRZ können den Thymus als naive CD4 oder CD8 T-Zelle oder durch zusätzliche Expression des Transkriptionsfaktors

Einleitung

forkhead box protein 3 (Foxp3) als natürliche regulatorische T-Zelle (nTreg) verlassen, während autoreaktive T-Zellen eliminiert werden und somit die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verhindert werden soll²⁵⁻²⁸. Diesen Selektionsprozess nennt man zentrale Toleranz²⁹.

CD4 T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der adaptiven Immunantwort. Sie können durch Zell-Zell-Kontakte oder die Produktion von Zytokinen und Chemokinen die Immunantwort beeinflussen und dadurch B-Zellen helfen spezifische Antikörper zu produzieren und sie können weitere Immunzellen in die entzündeten Organe zu rekrutieren und zu aktivieren³⁰.

Basierend auf der Produktion verschiedener Zytokinprofile und Transkriptionsfaktoren teilt man CD4 T-Zellen grob in vier Subtypen ein: T-Helferzelle (Th-Zelle) 1, Th2, Th17 und induzierte Tregs (iTregs)^{28,31}.

Th1 Zellen sind verantwortlich für die Abwehr von intrazellulären Bakterien. Sie produzieren hauptsächlich Interferon- γ (IFN- γ), was essentiell für die Aktivierung von Makrophagen ist³⁰. Außerdem wurden sowohl im Menschen als auch im Tiermodell Hinweise gefunden, dass dieser Th-Subtyp stark an der Entwicklung zellvermittelter Autoimmunerkrankungen beteiligt ist, z.B. der Multiplen Sklerose^{32,33}.

Th2 Zellen sind durch die Produktion verschiedener Interleukine (IL), vor allem IL-4, charakterisiert und an dem Ig-Klassenwechsel zu IgE sowie der Rekrutierung von Eosinophilen beteiligt, was auch eine Rolle bei der Entwicklung von Allergien spielt. Außerdem sorgen sie für die Eliminierung von Parasiten³⁰.

Th17 Zellen bekämpfen extrazelluläre Bakterien und Pilze und produzieren große Mengen an pro-inflammatorischem IL-17A³¹. Ähnlich wie Th1 Zellen konnte auch für Th17 Zellen eine Beteiligung an der Entstehung von zellvermittelten Autoimmunerkrankungen gezeigt werden^{34,35}.

Treg Zellen, sowohl nTregs als auch iTreg, sind vor allem für die periphere Toleranz und die Inhibierung einer Immunpathogenese verantwortlich. In Abschnitt 1.4.2 wird auf Tregs genauer eingegangen.

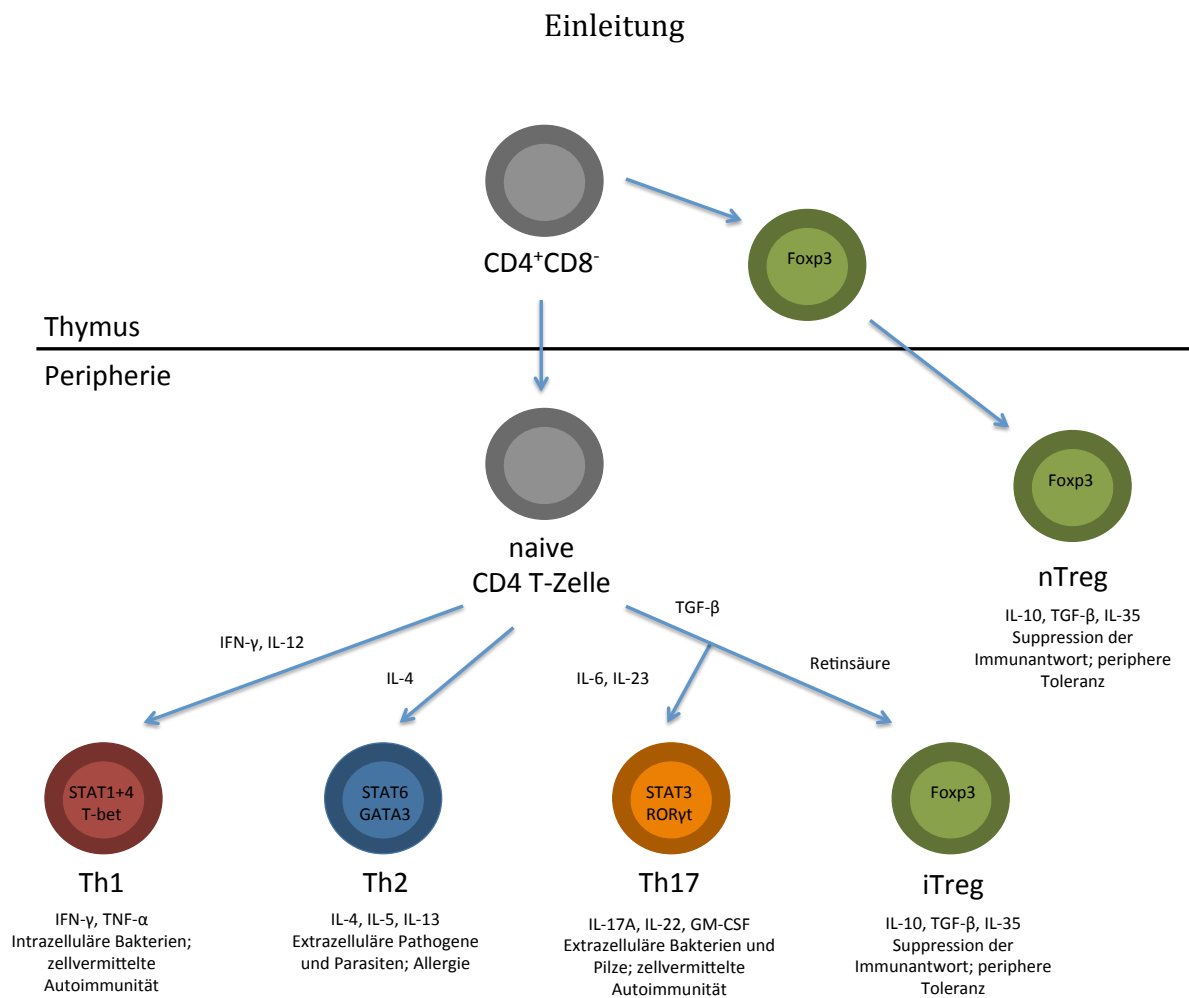


Abbildung 4 | Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen aus dem Thymus zu Effektor-T-Zellen oder Tregs und deren jeweiliges Zytokin- sowie Transkriptionsfaktorenprofil. CD4⁺ T-Zellen, die im Thymus positiv selektiert wurden, können entweder als nTreg durch die Expression von *FoXP3* oder als naive CD4 T-Zelle den Thymus verlassen. In der Peripherie kann dann aus einer naiven T-Zelle, je nach umgebenden Milieu, eine Th1, Th2, Th17 oder iTreg Zelle entstehen. Jeder T-Zellsubtyp ist durch bestimmte Transkriptionsfaktoren und die spezifische Produktion von Zytokinen und Chemokinen charakterisiert und übernimmt innerhalb der Immunantwort unterschiedliche Aufgaben.

1.4.1 CD4 T-Zellen in autoimmunen Nierenerkrankungen

Die Rolle von T-Zellen in Nierenerkrankungen bzw. deren Beteiligung am renalen Gewebeschaden war lange umstritten³⁶⁻³⁹. Eine Studie von Wu *et al.* zeigte 2002, dass aktivierte α 3(IV)NC1-spezifische CD4 T-Zellen unabhängig von Antikörpern einen pathologischen Nierenschaden verursachen können, der letztendlich zu einer GN führt⁴⁰. Des Weiteren konnte in Ratten demonstriert werden, dass eine immunsuppressive Therapie, welche gezielt gegen T-Zellen gerichtet ist, die Entwicklung eines renalen Endschadens verhindern kann⁴¹⁻⁴³.

Der Nachweis von α 3(IV)NC1-spezifischen T-Zellen im Blut von Patienten deutet auf eine Beteiligung von α 3(IV)NC1-spezifischen T-Zellen im Verlauf einer anti-GBM-GN hin^{8,44,45}. Durch die Anwendung von Tiermodellen konnte außerdem gezeigt werden,

dass $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische T-Zellen direkt verantwortlich für die Ausbildung einer halbmondförmigen und nekrotisierenden GN sind und diese in der entzündeten Niere akkumulieren^{24,40,46,47}. Ferner konnten diese $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -reaktiven T-Zellen als CD4 T-Zellen der Subtypen Th1 und Th17 identifiziert werden³⁵.

1.4.2 Regulatorische T-Zellen

1970 postulierten Gershon *et al.*, dass eine Subpopulation von T-Zellen in der Lage ist, aktiv die Immunantwort zu kontrollieren bzw. sie zu inhibieren⁴⁸.

Parallel machten Nishizuka und Sakakura die Entdeckung, dass eine neonatale Thymektomie in Mäusen zur Entwicklung von diversen Autoimmunerkrankungen führt⁴⁹. Penhale *et al.* zeigten kurze Zeit später, dass eine Thymektomie mit anschließender Bestrahlung in adulten Ratten zur Ausbildung von autoimmuner Thyroiditis führt⁵⁰. In beiden Fällen konnte durch den Transfer von CD4 T-Zellen die Entstehung von Autoimmunität verhindert werden^{51,52}. Zusammen zeigen die Ergebnisse, dass der gesunde Thymus eine Population an immunsupprimierenden T-Zellen produziert.

1995 gelang es diese Population an T-Zellen näher zu charakterisieren. CD25, die α -Kette des IL-2 Rezeptors, wurde als charakteristischer Oberflächenmarker identifiziert^{53,54}. Des Weiteren konnte 2001 ein Defekt im Gen des Transkriptionsfaktors *Foxp3* als Ursache für den *scurfy* Phänotyp in Mäusen identifiziert werden, bei dem es zu einer spontanen Entwicklung von T-Zell-mediierter multi-Organentzündung und Autoimmunität kommt⁵⁵. Ähnlich wurden auch für die fatale X-chromosomal vererbte Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie (IPEX) im Menschen mehrere inaktivierende Mutationen im *Foxp3* Gen ausgemacht⁵⁶. Experimente mit *Foxp3* *knockout* Mäusen (*Foxp3*^{-/-}) bestätigten dann, dass der Transkriptionsfaktor essentiell für die Entwicklung von Tregs im Thymus ist⁵⁷.

Regulatorische T-Zellen werden folglich als CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen charakterisiert^{53,57-60}.

Zusätzlich zu den im Thymus generierten Tregs können auch naive CD4 T-Zellen in der Peripherie durch die Anwesenheit des *transforming growth factor* β (TGF- β) zu regulatorischen Zellen konvertieren, indem sie anfangen *Foxp3* zu exprimieren. Diese induzierten Tregs inhibieren sowohl die Aktivierung naiver T-Zellen als auch die

Einleitung

Zytokinproduktion von Th1 und Th2 Zellen⁶¹. Die TGF- β -vermittelte Expression von *Foxp3* wird außerdem durch Retinsäure verstärkt und damit die Entstehung von iTregs⁶²⁻⁶⁵.

Tregs können sowohl durch Zellkontakt-vermittelte als auch -unabhängige Mechanismen die Differenzierung, Proliferation und Zytokinproduktion verschiedener Immunzellen inhibieren. Zu den Zellkontakt-abhängigen Mechanismen gehören die Inhibierung der Differenzierung und die Modulation der Effektorfunktion von dendritischen Zellen durch die Oberflächenmoleküle Lymphozyten-aktivierendes Gen 3 (LAG3) und *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4* (CTLA4) auf Tregs und der direkte Transport des anti-inflammatorischen Moleküls *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) durch Gap Junctions in Effektor-T-Zellen. Zu den Zellkontakt-unabhängigen Mechanismen zählen die Produktion von inhibitorischen Zytokinen, z.B. IL-10, IL-35 und TGF- β , das Ausschütten von Granzymen und Perforinen zur Induktion der Zellyse von Effektorzellen, der Entzug von IL-2, durch die hohe Expression von CD25 auf der Oberfläche, als essentiellen Wachstumsfaktor für Effektor-T-Zellen sowie die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) in Adenosin via CD39 und CD73 für eine A_{2A}Rezeptor-vermittelte Immunsuppression^{28,66,67}.

Tregs stellen somit einen wichtigen Mediator der peripheren Toleranz dar.

Einleitung

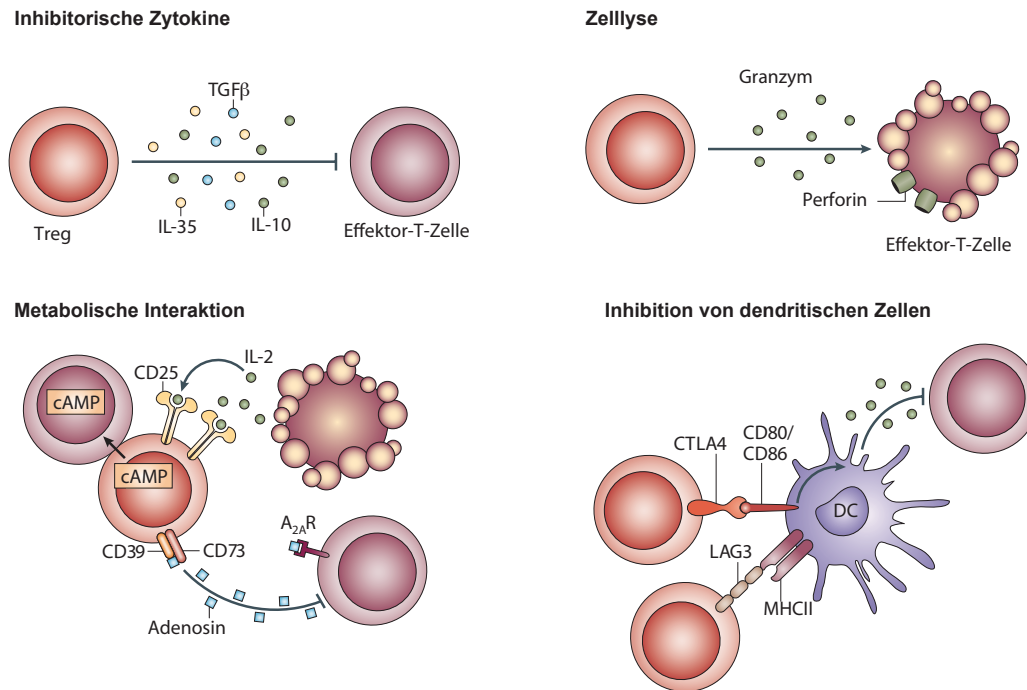


Abbildung 5 | Mechanismen der Treg-vermittelten Immunsuppression. Tregs können entweder durch Zellkontakt-vermittelte (Inhibition von dendritischen Zellen und teilweise metabolische Interaktionen) oder -unabhängige Mechanismen (inhibitorische Zytokine, Zellyse und teilweise metabolische Interaktionen) Zellen des Immunsystems supprimieren. (Abbildung modifiziert nach⁶⁷)

1.4.2.1 Regulatorische T-Zellen in Autoimmunerkrankungen, insbesondere autoimmunen Nierenerkrankungen

Seit der Entdeckung der regulatorischen T-Zellen wurde ihre Rolle in verschiedenen Modellen für Autoimmunerkrankungen untersucht. Am besten charakterisiert ist ihr positiver Einfluss in Modellen der Multiplen Sklerose, Rheumatoiden Arthritis, Diabetes Typ I sowie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen⁶⁸⁻⁷¹.

Im Gegensatz dazu ist die Funktion von Tregs im Zusammenhang mit RPGN bisher noch nicht ausreichend untersucht. Im NTN Mausmodell konnte gezeigt werden, dass endogene Tregs in der Lage sind die Th1 Immunantwort zu inhibieren und somit die Pathogenese deutlich zu verringern⁷². Ooi *et al.* bestätigten in einem beschleunigtem NTN Modell diese Beobachtung⁷³. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Suppression der Th1 sowie der Th17 Antwort von IL-10 abhängig ist^{74,75}. Jedoch lassen die bisherigen Studien keine Aussage darüber zu, ob und inwiefern Tregs $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische T-Zellen und autoreaktive B-Zellen in der anti-GBM-Glomerulonephritis beeinflussen und ob es vielleicht sogar $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische Tregs gibt.

2 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs) bei der Entstehung von α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern und CD4 T-Zellen im Modell der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG) analysiert werden. Die EAG ist ein tierexperimentelles Modell zur Charakterisierung der humoralen und zellulären Immunantwort gegenüber dem α 3(IV)NC1, dem Autoantigen in der anti-glomerulären Basalmembran-Glomerulonephritis (anti-GBM-GN). Mäuse werden in diesem Modell insgesamt viermal mit dem rekombinant hergestellten α 3(IV)NC1 immunisiert und entwickeln in Folge dessen zunächst ein nephrotisches Syndrom mit einer stark ausgeprägten Proteinurie und in der zweiten späten Phase eine Nephritis, die histologisch vor allem für eine halbmondförmige Proliferation und Nekrose in den Glomeruli gekennzeichnet ist.

Die Hypothese ist, dass Tregs eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber dem Autoantigen α 3(IV)NC1 spielen und dass sie in der späten Phase der Erkrankung durch die Inhibierung der α 3(IV)NC1-spezifischen CD4 T-Zellen dazu beitragen den renalen Gewebeschaden zu limitieren.

Für dieses Projekt sollten DEREK (*depletion of regulatory T cells*) Mäuse mit dem rekombinant hergestellten humanen Protein h- α 3(IV)NC1 immunisiert und die GFP⁺Foxp3⁺ Tregs in zwei unterschiedlichen Phasen der EAG durch die Injektion von Diphtherietoxin (DT) depletiert werden:

- a. In der späten Phase der EAG, ab Woche 8, sollten DEREK Tiere in regelmäßigem Abstand mit DT behandelt und somit die GFP⁺Foxp3⁺ Zellen systemisch depletiert werden. Mit diesem Ansatz sollte die Rolle der Tregs beim Übergang der nephrotischen Phase zu einer nekrotisierenden GN analysiert werden. Speziell sollte untersucht werden, ob das Fehlen der Tregs eine Auswirkung auf die lokale Kontrolle der Nierenentzündung hat.
- b. Vor und während der verstärkenden Immunisierungen sollten DEREK Tiere mit DT behandelt werden und so die Auswirkungen auf die Entstehung von Autoimmunität gegenüber dem α 3(IV)NC1 analysiert werden.

Die Ergebnisse könnten zum einen entscheidende Hinweise darüber liefern, wie Autoimmunerkrankungen entstehen und zum anderen neue Angriffspunkte für Zell-spezifische oder Antigen-basierende Therapien aufzeigen.

3 Ergebnisse

3.1 Akkumulation von regulatorischen T-Zellen in der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis

Die experimentelle autoimmune Glomerulonephritis (EAG) ist ein Mausmodell zur Untersuchung der anti-glomerulären Basalmembran-Glomerulonephritis (anti-GBM-GN) des Menschen. Dabei werden empfängliche DBA/1 Mäuse mit dem Autoantigen der nicht-Kollagen Domäne 1 der $\alpha 3$ Kette des Typ IV Kollagens ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) immunisiert, die im weiteren Krankheitsverlauf alle wichtigen klinischen und pathologischen Parameter der humanen Erkrankung, z.B. Proteinurie, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische Antikörper, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -reaktive T-Zellen und glomeruläre Halbmonde entwickeln²³. Die EAG ist somit ein gut geeignetes Modell zur Analyse von Autoantigen-spezifischen T-Zellantworten in Autoimmunprozessen.

Bisherige Studien im EAG Modell zeigen, dass T-Zellen, insbesondere Th1 und Th17 Zellen, maßgeblich für die Entwicklung einer nekrotisierenden Glomerulonephritis mit Ausbildung der charakteristischen Halbmonde in den Glomeruli verantwortlich sind³⁵.

$\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ regulatorische T-Zellen (Tregs) spielen eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Sie sind in der Lage die Aktivierung und Differenzierung autoreaktiver T-Zellen zu beeinflussen und somit einen möglichen Gewebeschaden zu reduzieren bzw. zu verhindern²⁸. Welche Rolle sie bei der EAG und der Suppression von $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen CD4 T-Zellen spielen, ist bisher noch ungeklärt.

Um initiale Hinweise auf eine Beteiligung von Tregs bei der Entstehung der EAG zu erhalten, sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zunächst die mögliche Akkumulation der Tregs über die Zeit im peripheren Blut und in der entzündeten Niere nach Induktion der EAG bestimmt werden. Dazu wurden DEREK Mäuse mit rekombinant hergestelltem humanem- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) nach dem in Abbildung 6 dargestelltem Schema immunisiert. DEREK Mäuse exprimieren unter der Kontrolle des *Foxp3* Promoters ein Fusionsprotein aus dem *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) und dem humanen Diphtherietoxin Rezeptor (DTR). Der Transkriptionsfaktor Foxp3 wird in der Maus nur in Tregs exprimiert und ist essentiell für deren Entwicklung und Funktion⁵⁷. DEREK Mäuse stellen somit zum einen Treg-Reportermäuse und zum

Ergebnisse

anderen, durch die Injektion von Diphtherietoxin (DT) und die dadurch vermittelte Apoptose, ein Modell zur zeitlich koordinierten Depletion von Tregs dar⁷⁶.

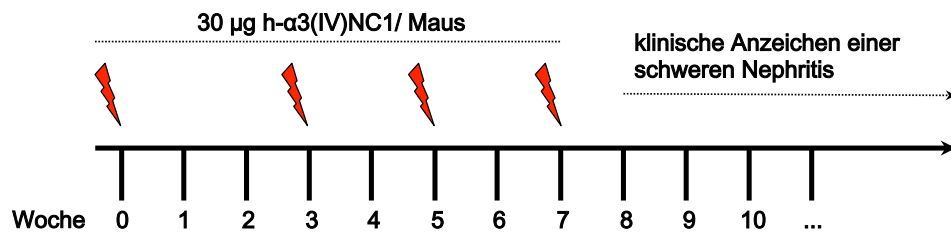


Abbildung 6 | Immunisierungsschema der EAG. DEREK Mäuse wurden subkutan mit 30 µg rekombinatem humanem- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ ($\text{h-}\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) in komplettem Freund's Adjuvant immunisiert. Nach drei, fünf und sieben Wochen wurde jedem Tier verstärkend 30µg rekombinantes $\text{h-}\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ in inkomplettem Freund's Adjuvant s.c. injiziert. Vor jeder Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen. Über den gesamten Zeitraum des Experiments wurden die Tiere beobachtet und schwerkranke Tiere getötet und die Nieren analysiert. *EAG=experimentelle autoimmune Glomerulonephritis*

Vor jeder Immunisierung wurden von den Mäusen Blutproben entnommen. Schwerkranke Mäuse, die sich im Endstadium der EAG (ernste Anzeichen einer klinischen Nephritis ab Woche 10) befanden, wurden getötet und die Nieren für weitere Analysen entnommen. Die Frequenz der Tregs im Blut wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD25 und der Expression des eGFP bestimmt. In der Niere wurde *Foxp3* zusätzlich mit einem monoklonalen Antikörper gefärbt. Das *Foxp3* mRNA Expressionslevel wurde mittels quantitativer *real time* PCR (qPCR) bestimmt.

Ergebnisse

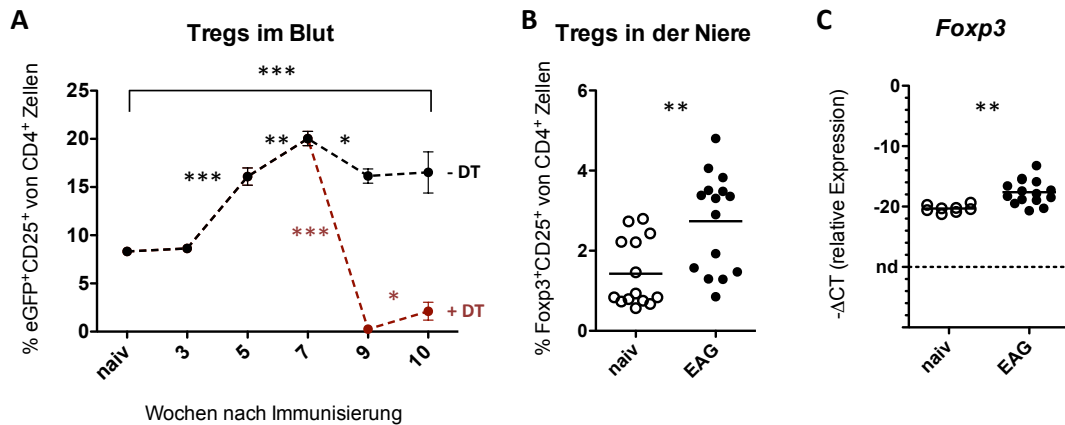


Abbildung 7 | Kinetik und Akkumulation von regulatorischen T-Zellen nach Induktion der EAG. DEREK Mäuse wurden mit h- α 3(IV)NC1 immunisiert. Eine Treg Kinetik wurde über die Zeit mittels Durchflusszytometrie anhand der eGFP⁺ Zellen im Blut erstellt. Einem Teil der Mäuse wurde in Woche 8 zur Depletion der Tregs Diphtherietoxin (DT) injiziert. Die Datenpunkte geben den Mittelwert \pm SEM von n=4-12 individuell analysierten Mäusen an (A). Schwerkranken Mäusen wurden die Nieren entnommen und die Frequenz der Tregs durchflusszytometrisch analysiert (B) sowie das *Foxp3* mRNA Expressionslevel relativ zur 18S rRNA über qPCR-Analyse bestimmt (C). Die Datenpunkte in B und C stehen jeweils für eine individuell analysierte Maus und die Querbalken geben den Mittelwert an. Der Statistik liegt der unverbundene *t*-Test zu Grunde mit * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. EAG=experimentelle autoimmune Glomerulonephritis

Im Blut der Mäuse war ab Woche 3 ein signifikanter Anstieg der Tregs detektierbar, welcher in Woche 7 den Höchstwert von ca. 20%, bezogen auf die Gesamtfrequenz der CD4 T-Zellen, erreichte. Danach sank der Wert im Blut wieder, blieb aber auch in den schwer entzündeten Nieren signifikant höher als in Nieren naiver Mäuse. Die wiederholte Injektion von DT ab Woche 8 führte zu einer nahezu vollständigen Depletion der eGFP⁺ Zellen (Abbildung 7A; Daten sind Teil von Kapitel 3.2).

In schwerkranken Mäusen sah man zudem eine deutliche Akkumulation von Tregs in der Niere. Dies ließ sich sowohl auf Einzelzellniveau mittels FACS (Abbildung 7C) als auch durch qPCR anhand eines deutlich höheren *Foxp3* mRNA Levels zeigen (Abbildung 7B).

Die Ergebnisse zeigten, dass nach der Induktion der EAG Tregs sowohl über die Zeit im peripheren Blut als auch im Endstadium in der schwer entzündeten Niere akkumulierten. Eine Beteiligung an der Immunreaktion in der Niere ist somit wahrscheinlich.

3.2 Depletion der regulatorischen T-Zellen in der späten Phase der EAG

Arbeiten unserer Gruppe haben gezeigt, dass das EAG Modell einen zweiphasigen Verlauf hat. Durch die Immunisierung von Mäusen mit dem Antigen h- α 3(IV)NC1 entwickeln diese bis Woche 8 ein nephrotisches Syndrom mit einer starken Proteinurie und linear granulären, subepithelialen IgG-Ablagerungen in den Glomeruli²⁴. In diesem Punkt unterscheidet sich das Mausmodell von der humanen anti-GBM-GN, in der Patienten eine überwiegend lineare Ablagerung der Antikörper entlang der Basalmembran aufweisen^{3,4,11}. In der EAG beginnt die nephritische Phase in den Mäusen mit der charakteristischen intraglomerulären Halbmondbildung und nekrotisierender Glomerulonephritis individuell zwischen Woche 9 und 13. Erst in diesem Stadium der Erkrankung lassen sich hohe Frequenzen an α 3(IV)NC1-spezifischen Th1 und Th17 Zellen in der Niere nachweisen, was auf eine essentielle Rolle dieser Zelltypen in der Progression von einem nephrotischen Syndrom zur nephritischen Phase hindeutet. Bestätigt wurde diese Vermutung durch Versuche mit IFN- γ R^{-/-}, IL-17A^{-/-} und IL-23p19^{-/-} Mäusen, denen entweder eine effektive Th1 oder Th17 Immunantwort fehlt. Diese Mäuse zeigen zwar eine starke Proteinurie und ähnliche Titer an α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern wie Wildtyp (wt) Tiere, jedoch war der renale Endscha-den signifikant geringer³⁵.

Regulatorische T-Zellen sind in der Lage durch die Produktion anti-inflammatorischer Moleküle, wie z.B. IL-10, die Immunantwort zu kontrollieren, indem sie die Effektorfunktion von verschiedenen Th-Subtypen, aber auch anderer Immunzellen, wie z.B. Makrophagen oder dendritischen Zellen, inhibieren.

Im folgenden experimentellen Ansatz wurden die Tregs in der späten Phase der EAG durch die Injektion von Diphtherietoxin (DT) in DEREK Mäusen depletiert und die Auswirkungen auf die Progression von einem nephrotischen zu einem nephritischen Syndrom untersucht. Die Ergebnisse präsentieren die, soweit bereits vorhanden, zusammengefassten Daten aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.2.1 Krankheitsverlauf nach Induktion der EAG und Behandlung mit Diphtherietoxin in DEREK und wt Mäusen

Im folgenden Experiment wurde eine EAG in DEREK (n=12) und wt (n=11) Tieren nach dem in Abbildung 8 dargestellten Immunisierungsschema induziert. In der späten Phase der Erkrankung, ab Woche 8, wurde den Mäusen intraperitoneal (i.p.) 0.25 µg DT injiziert, um eine systemische Depletion der Tregs zu erzielen. Die Injektion erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von zwei Wochen im Abstand von jeweils 72 Stunden (siehe Abbildung 8).

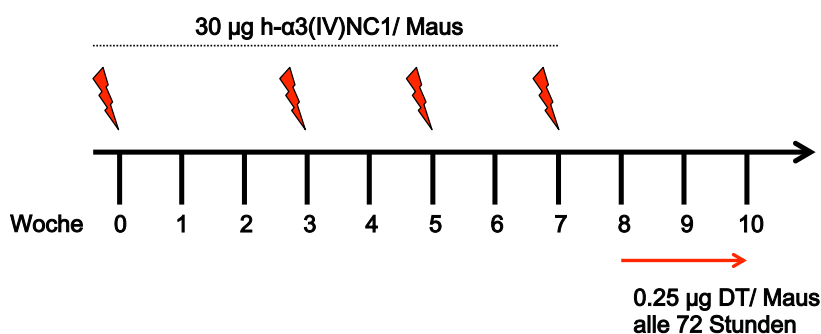


Abbildung 8 | Immunisierungs- und Behandlungsschema zur Analyse der Rolle der Tregs in der späten Phase der EAG. In DEREK (n=12) und wt Tieren (n=11) wurde die EAG durch wiederholte Immunisierung mit 30 µg h-α3(IV)NC1 pro Maus induziert. Ab Woche 8 der Erkrankung wurde alle 72 Stunden 0.25 µg Diphtherietoxin (DT) injiziert um die Tregs in der späten Phase der Erkrankung zu depletieren und ihren Einfluss auf die Ausbildung der nephritischen Phase zu analysieren. Alle Tiere wurden zehn Wochen nach der initialen Immunisierung getötet und Blut, Milz und Niere zur weiteren Untersuchung entnommen. *EAG=experimentelle autoimmune Glomerulonephritis*

Während des Versuches wurde der Allgemeinzustand der Tiere nach den Kriterien in Tabelle 11 (Kapitel 6.2.1.3) sowie Veränderungen im Körpergewicht überwacht. Ferner wurden in regelmäßigen Abständen Urinproben zur Einschätzung der Proteinurie sowie Blutproben vor und während der Behandlung mit DT entnommen. Zehn Wochen nach der initialen Immunisierung wurden alle Mäuse getötet und die Organe zur weiteren Analyse entnommen.

In Abbildung 9 ist die Veränderung im Körpergewicht der Versuchstiere über den gesamten Zeitraum des Experiments dargestellt. Es konnte kein Unterschied im Gewichtsverlauf zwischen den DEREK und wt Mäusen festgestellt werden. Es ließ sich jedoch erkennen, dass beide Versuchsgruppen ab dem Behandlungsstart mit DT in Woche 8 einen starken Abfall im Gewicht aufwiesen. Während der allgemeine

Ergebnisse

Gesundheitszustand aller Tiere bis 3-4 Tage vor Ende des Experiments ähnlich war, konnte ab diesem Zeitpunkt bei den DEREK Tieren jedoch ein erhöhter Muskeltonus sowie struppiges Fell und Einschränkungen in der Motorik festgestellt werden, was, verglichen mit wt Mäusen, auf einen schlechteren Allgemeinzustand nach Depletion der Tregs hindeutete.

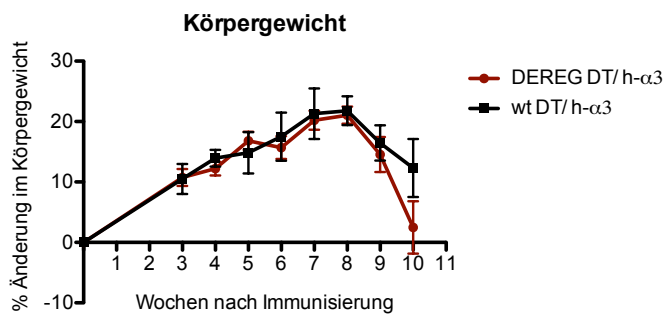


Abbildung 9 | Veränderungen im Körpergewicht. DEREK (n=12) und wt (n=11) Tiere wurden ab Woche 8 der EAG mit Diphtherietoxin (DT) behandelt. Abgebildet ist die prozentuale Gewichtsveränderung bezogen auf das Ausgangsgewicht in Woche 0 jedes Tieres während des Experiments. Die verschiedenen Zeitpunkte sind als Mittelwert +/- SEM dargestellt. Der Statistik liegt der unverbundene *t*-Test zu Grunde. EAG=experimentelle autoimmune Glomerulonephritis

3.2.2 Verlust der Nierenfunktion

Um die Nierenfunktion über die Dauer des Experiments zu untersuchen, wurde die Konzentration des ausgeschiedenen Albumins im Urin der Versuchstiere bestimmt. Zwischen Woche 6 und 8 konnte der Beginn einer Proteinurie mittels Harnteststreifen nachgewiesen werden (eigene Daten nicht gezeigt). Zur quantitativen Analyse wurde ein Albumin-ELISA durchgeführt, dessen Werte auf den Kreatiningehalt im Urin normalisiert wurden (Albumin/ Kreatinin Ratio). Mit dieser Methode konnte ein Anstieg im Albuminverlust über den Urin spätestens ab Woche 8 nach Immunisierung und somit ein beginnender Verlust der Nierenfunktion bestätigt werden (Abbildung 10A). Alle immunisierten Mäuse entwickelten über den Versuchszeitraum ein stark nephrotisches Syndrom.

Ein zweiter Parameter, der Auskunft über die Funktion der Niere gibt, ist der Harnstoffgehalt im Blut. In der gesunden Niere wird Harnstoff über den Urin ausgeschieden. Steigt der Wert im Blut an, deutet dies auf einen schweren Nierenschaden hin. Klinisch wird dieser Wert als *blood urea nitrogen* (BUN) angegeben.

Ergebnisse

BUN-Werte > 50 mg/dl sind in unserem Mausmodell pathologisch. In diesem Experiment konnte jedoch kein Unterschied in den BUN-Werten zwischen DEREg und wt Tieren in Woche 10 festgestellt werden. Auch verglichen zu naiven Tieren wiesen beide Gruppen keine signifikant höheren Werte auf (Abbildung 10B).

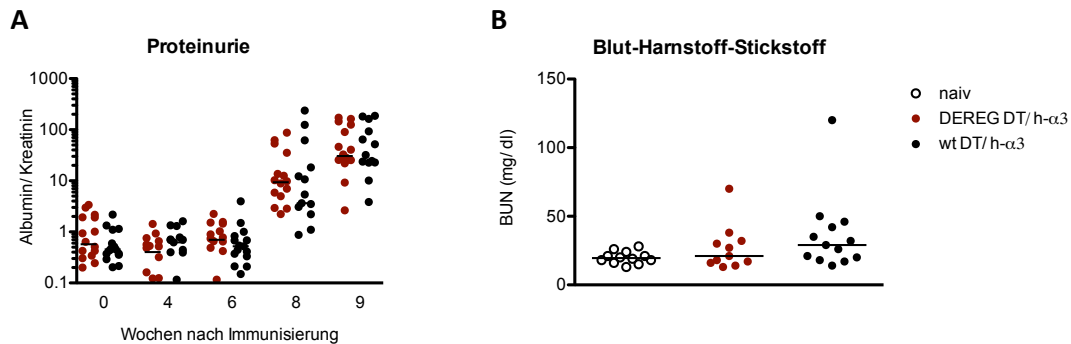


Abbildung 10 | Verlust der Nierenfunktion. Während des Experiments wurden zu den abgebildeten Zeitpunkten Urinproben gesammelt und die Albumin/ Kreatinin Ratio zur Einschätzung der Nierenfunktion bestimmt (A). Nach Beendigung des Experiments wurde der Stickstoffgehalt im Blut (BUN) als Maß für den Verlust der Nierenfunktion bestimmt (B). Jeder Datenpunkt stellt eine individuell analysierte Maus dar, die Querbalken geben den Median an. Der Statistik liegen der *U*-Test von Mann und Whitney (A) und der *H*-Test von Kruskal und Wallis mit Bonferroni Post-hoc Test (B) zu Grunde. BUN=blood urea nitrogen; DT=Diphtherietoxin

Um zu überprüfen, ob eine späte Depletion der Tregs einen Einfluss auf den Gewebeschaden in der Niere hat, wurden als nächstes Nierenparaffinschnitte von jeder Maus angefertigt und nach *periodoc acid-Schiff reaction* (PAS-Reaktion) die Bildung glomerulärer Halbmonde, Fibrineinlagerungen und entstandener Sklerose ausgewertet und zwischen DEREg und wt Tieren verglichen. Dies wurde von unserem Kooperationspartner Dr. Helmut Hopfer, einem Nephrologen am Universitätsspital Basel, durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach dem für humane Glomerulonephritiden etablierten Standardverfahren.

Abbildung 11 zeigt repräsentative Nierenschnitte nach PAS-Reaktion von einem naiven (A) und einem schwer kranken Glomerulus (B). In Woche 10 nach der initialen Immunisierung zeigten 86% der DEREg Mäuse die Ausbildung glomerulärer Halbmonde in den Nieren, 64% die Einlagerung von Fibrin in den Kapselraum und 79% bereits eine beginnende Vernarbung des Nierengewebes (Sklerose). Die Nieren der wt Tiere wiesen dagegen eine etwas mildere renale Pathologie auf (58% glomeruläre Halbmonde, 50% Fibrineinlagerungen, 58% beginnende Sklerose). Ein leichter Trend ($p=0.12$) zu einem

Ergebnisse

stärker ausgeprägten glomerulären Gewebeschaden in DEREK Tieren war also zu erkennen (Abbildung 11C-E).

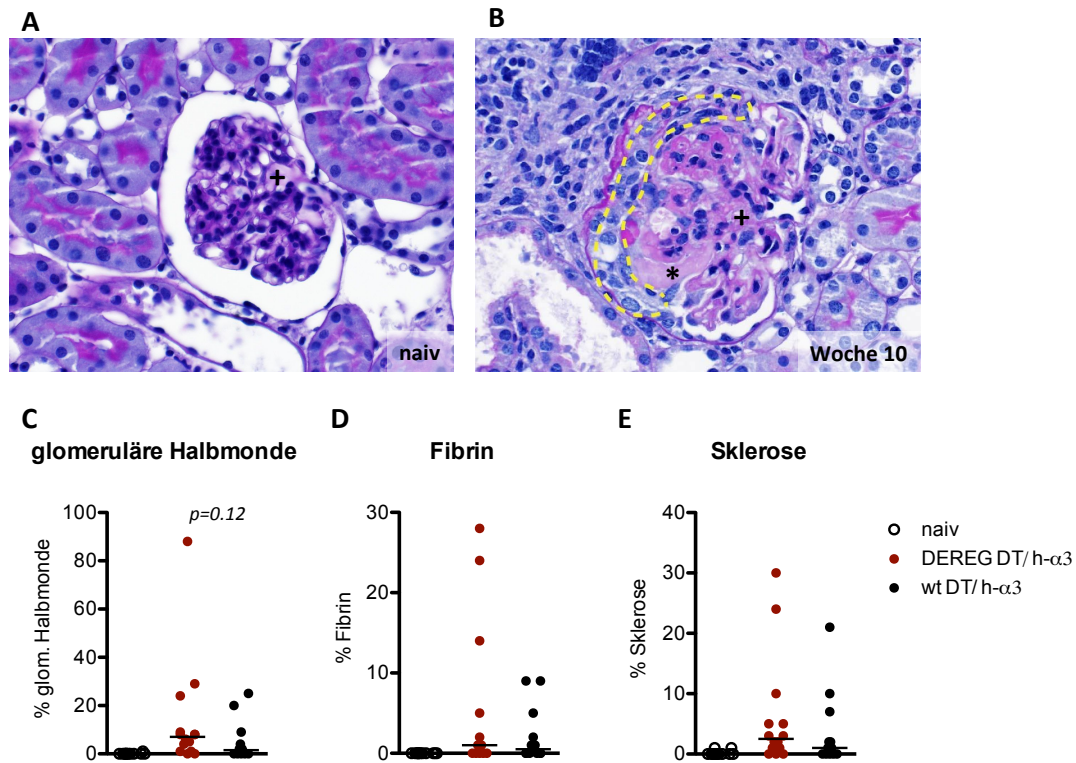


Abbildung 11 | Histologische Befunde in Nierenparaffinschnitten. Zehn Wochen nach der initialen Immunisierung wurden die Nieren entnommen und für histologische Untersuchungen in Paraffin eingebettet. Der renale Schaden wurde im Institut für Pathologie am Universitätsspital Basel durch Dr. Helmut Hoyer bewertet. Repräsentative Aufnahmen in 60-facher Vergrößerung, wobei ein Kreuz das Zentrum eines Glomerulus angibt, zeigen einen naiven (A) und einen histologisch stark auffälligen Glomerulus (B) mit Halbmondbildung (gelb umrandet) und Nekrose inklusive Fibrineinlagerungen (*). Der prozentuale Anteil der Glomeruli mit glomerulären Halbmonden (C), Fibrinablagerungen (D) und renaler Sklerose (E) in naiven Tieren sowie kranken DEREK und wt Mäusen ist darunter gezeigt. Jeder Datenpunkt stellt eine individuell analysierte Maus dar, die Querbalken geben den Median an. Der Statistik liegt der *H*-Test von Kruskal und Wallis mit Bonferroni Post-hoc Test zu Grunde. *DT*=Diphtherietoxin

3.2.3 Spezifische Autoantikörperantwort gegen α3(IV)NC1

Ein zentraler Prozess bei der Entwicklung vieler autoimmuner Nierenerkrankungen ist die Bildung von Autoantikörpern, im Fall der anti-GBM-GN sind dies Antikörper gegen das α3(IV)NC1. In unserem Modell werden Mäuse mit dem humanen α3(IV)NC1 immunisiert, welche dann Antikörper gegen das humane α3(IV)NC1 aber auch gegen das murine α3(IV)NC1 (m-α3(IV)NC1), also genuine Autoantikörper, entwickeln. Die Entstehung dieser Autoantikörper beruht wahrscheinlich auf der hohen Sequenzhomologie zwischen dem humanen und dem murinen α3(IV)NC1 (92.9%).

Ergebnisse

Antikörper sowohl gegen das h- α 3(IV)NC1 als auch gegen das m- α 3(IV)NC1 sind bereits ab Woche 2 nach Immunisierung nachweisbar (³⁵ und eigene nicht gezeigte Daten).

Um zu testen, ob es einen Unterschied in der Konzentration der m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörper der Tiere beider Versuchsgruppen nach der Depletion der Tregs gibt, wurden in Woche 7, 8 und 10 Blutproben entnommen und das Blutplasma gewonnen. Die Titer der spezifischen IgG wurden mittels m- α 3(IV)NC1 als *capture antigen* im ELISA bestimmt. Die ermittelten Werte wurden gegen ein Standardplasma mit sehr hohem m- α 3(IV)NC1-spezifischen IgG Titer normalisiert und als *Arbitrary Unit* dargestellt. Zu keinem Zeitpunkt, weder vor noch während der Behandlung, konnte ein Unterschied im Titer der m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörper im Vergleich zwischen DEREK und wt Mäusen festgestellt werden. Beide Gruppen zeigten zum Ende des Experiments einen Abfall an m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern, was vermutlich auf den Verlust der Nierenfilterfunktion bzw. den Verlust der Antikörper über den Urin zurückzuführen ist (Abbildung 12).

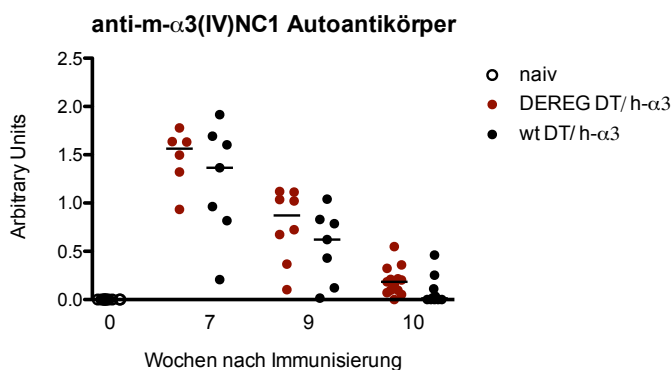


Abbildung 12 | m- α 3(IV)NC1-spezifische Antikörperantwort vor und während der Behandlung mit DT in der späten Phase der Erkrankung. Die Titer an m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern wurden mittels ELISA im Blutplasma bestimmt, gegen ein Standardplasma normalisiert und in *Arbitrary Units* angegeben. Jeder Datenpunkt stellt eine individuell analysierte Maus dar, die Querbalken geben den Median an. Der Statistik liegt der *H*-Test von Kruskal und Wallis mit Bonferroni Post-hoc Test zu Grunde. *DT*=*Diphtherietoxin*

3.2.4 Charakterisierung der T-Zellantwort

Neben der Ausbildung von Autoantikörpern spielen Antigen-spezifische Th1 und Th17 Zellen in der späten Phase der EAG eine essentielle Rolle, vor allem bei der Progression vom nephrotischen Syndrom zur glomerulären Nephritis. Mit der Depletion der Tregs ab Woche 8 sollte daher untersucht werden, ob Tregs die spezifische CD4 T-Zellantwort

Ergebnisse

inhibieren und somit den renalen Gewebeschaden mildern oder sogar in einem gewissen Maß verhindern können.

Zur Verifizierung der Treg Depletion in der Niere wurden die mRNA Level von *Foxp3* in DEREK und wt Tieren quantifiziert. *Foxp3* als spezifischer Transkriptionsfaktor für Tregs sollte im Falle einer Depletion in DEREK Tieren nicht mehr nachweisbar sein. Zum Nachweis der *Foxp3* Expression wurde aus den Nieren die RNA isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde dann für die qPCR Analyse eingesetzt. Es konnte jedoch kein Unterschied in der *Foxp3* Expression in depletierten DEREK und wt Tieren gezeigt werden (Abbildung 13A). Zusätzlich wurde das mRNA Level für *Il10* bestimmt. IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin und dessen Sekretion stellt unter anderem einen Mechanismus von Tregs zur Inhibierung von Effektorzellen dar. Durch die Depletion der Tregs in diesem Versuchsansatz könnte die *Il10* Expression also deutlich geringer in DEREK als in wt Mäusen sein. Aber auch hier wurde kein Unterschied gemessen (Abbildung 13B). Zehn Wochen nach der initialen Immunisierung und nach zweiwöchiger Depletion der Tregs von Woche 8 bis Woche 10 waren keine Unterschiede im Treg Kompartiment in der Niere von DEREK und wt Tieren zu erkennen. Die Analyse der eGFP⁺ Zellen im peripheren Blut bestätigte allerdings, dass eine Woche nach Beginn der Behandlung mit DT die Frequenz der eGFP⁺ Zellen signifikant verringert war bzw. die Depletion fast vollständig erfolgreich war (siehe Abbildung 7A).

Als nächstes wurde die Rekrutierung und Effektorfunktion von Th-Subtypen analysiert und dafür die mRNA Level von *Cxcl9*, *Ifng* und *Il17a* in der Niere bestimmt. CXCL9 ist ein Zytokin, das zur CXC-Chemokinfamilie gehört und hauptsächlich von Makrophagen nach IFN- γ Stimulation produziert und sezerniert wird. Daher ist es auch unter dem Namen *monokine-induced by gamma interferon* (MIG) bekannt. Es bindet an den Rezeptor CXC-Rezeptor 3 (CXCR3) auf Th1 Zellen^{77,78}. Somit kann über die Expression von *CXCL9* sowohl eine Aussage über die Aktivität von Makrophagen als auch über die Th1-Aktivität in der entzündeten Niere getroffen werden. IFN- γ und IL17-A sind die charakteristischen Effektormoleküle der Th1 bzw. Th17 Immunantwort. In Abbildung 13C-D sind die mRNA Level von *Cxcl9*, *Ifng* und *Il17a* in den Nieren von DEREK und wt Tieren graphisch dargestellt. Die Expressionslevel aller drei Gene waren in DEREK Tieren deutlich ($p=0.05$ für *Cxcl9* und *Ifng*) erhöht, im Falle von *Il17a* sogar signifikant. Dies deutet auf eine vermehrte Rekrutierung von Th1 Zellen und eine erhöhte

Ergebnisse

Effektoraktivität von sowohl Th1 als auch Th17 Zellen hin, die durch eine späte Depletion der regulatorischen T-Zellen in DEREГ Mäusen erzielt wurde.

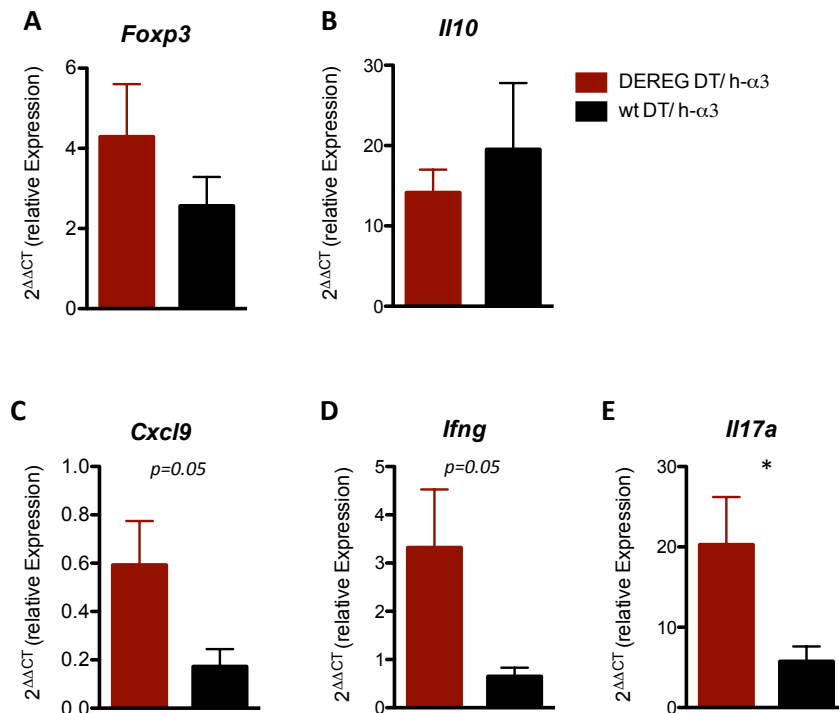


Abbildung 13 | qPCR-Analyse von *Foxp3* und verschiedenen Chemokinen sowie Zytokinen. Die RNA wurde aus den Nieren von DEREГ und wt Tieren isoliert und in cDNA umgeschrieben. Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel als x-fache Expression verglichen mit naiven Tieren normalisiert auf die 18S rRNA. Die Balken geben den Mittelwert +/- SEM an. Der Statistik liegt der unverbundene *t*-Test zu Grunde mit $*p<0.05$.

Des Weiteren wurden sowohl aus einem Teil der Niere als auch einem Teil der Milz Einzelzellsuspensionen hergestellt, die für eine durchflusszytometrische Analyse (FACS) anschließend mit verschiedenen Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt werden konnten. CD4 T-Zellen wurden im FACS als CD45⁺CD4⁺ lebende Einzelzellen definiert. In Abbildung 14 ist die graphische Auswertung der FACS-Analyse dargestellt. Es ist zu erkennen, dass es keinen Unterschied in der Frequenz der CD4 T-Zellen in DEREГ und wt Tieren gab, sowohl lokal in der entzündeten Niere als auch systemisch in der Milz als peripherem Lymphorgan. Zehn Wochen nach der initialen Immunisierung konnte in den meisten Tieren auch noch keine erhöhte T-Zellfrequenz verglichen mit naiven Tieren festgestellt werden.

Ergebnisse

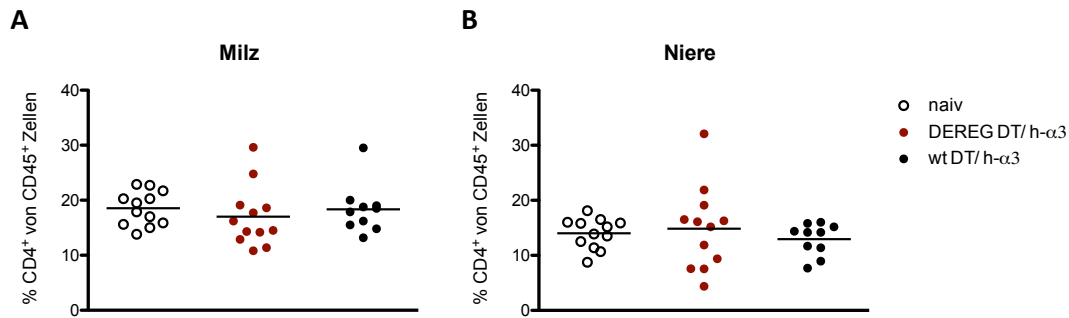


Abbildung 14 | FACS-Analyse der CD4 T-Zellfrequenzen in Milz und Niere. Graphische Darstellung der T-Zell-Analyse in Milz (A) und Niere (B) zehn Wochen nach der initialen Immunisierung. Die Datenpunkte repräsentieren individuell analysierte Mäuse und die Querbalken geben den Mittelwert an. Der Statistik liegt die einfache Varianzanalyse (*one way ANOVA*) und der Dunn's Test zu Grunde. *FACS=fluorescence activated cell sorting*; *DT=Diphtherietoxin*

3.2.5 Renale Makrophageninfiltration

Unsere Gruppe konnte zeigen, dass die massive Makrophageninfiltration im EAG Modell maßgebend für den renalen Endschaden ist³⁵. Die erhöhte Expression von *Cxcl9* in DEREG Tieren (Abbildung 13A) weist auf eine verstärkte Aktivierung von Makrophagen nach Depletion der Tregs hin. Im Folgenden sollten die renalen Makrophagen weiter charakterisiert werden. Dies erfolgte zunächst mittels FACS analog zur Isolierung und Analyse der T-Zellen (Abschnitt 3.2.4). Makrophagen wurden als CD45⁺Gr-1⁻CD11b⁺F4/80⁺ lebende Einzelzellen definiert. In Abbildung 15A ist die graphische Auswertung dargestellt. Die drei analysierten Gruppen zeigten ähnliche Makrophagenfrequenzen in der Niere. Nur in den DEREG Tieren war ein Trend zu einer höheren Makrophagenfrequenz nachweisbar ($p=0.09$).

Ergebnisse

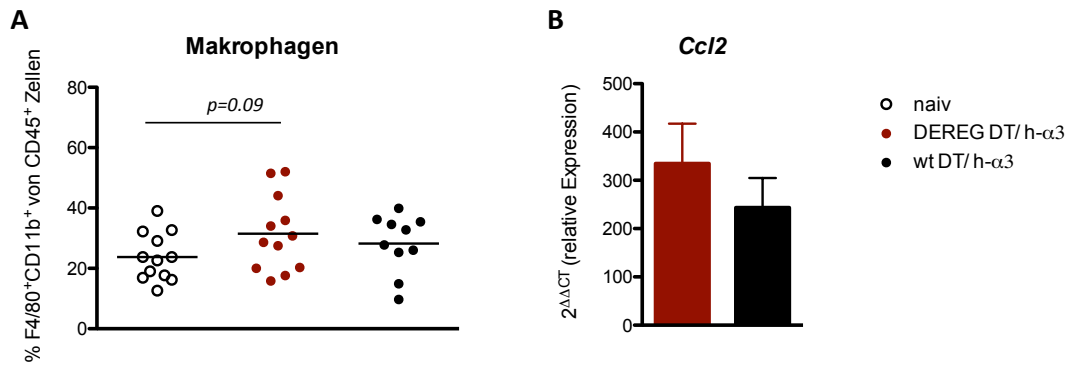


Abbildung 15 | Analyse der renalen Makrophagen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Frequenz der renalen Makrophagen analysiert. Jeder Datenpunkt stellt eine individuell analysierte Maus dar und die Querbalken geben den Mittelwert an. Der Statistik liegen die einfache Varianzanalyse (*one way ANOVA*) mit anschließendem Dunn's Test zu Grunde. (A). Die RNA wurde aus den Nieren isoliert und in cDNA umgeschrieben. Dargestellt ist das *Ccl2* mRNA Expressionslevel als x-fache Expression zu naiven Tieren normalisiert auf 18S rRNA. Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM dar. Der Statistik liegt der unverbundene *t*-Test zu Grunde (B). *DT*=*Diphtherietoxin*

Auf mRNA-Ebene wurde zusätzlich die Expression des Zytokins *CC-Chemokinligand 2* (*Ccl2*) analysiert. *CCL2* oder auch *monocyte chemotactic protein 1* (*MCP1*) gehört zur Familie der CC-Chemokine und wird unter anderem von Makrophagen am Ort der Entzündung sezerniert. Es gilt als pro-inflammatorisches Zytokin, da es die Rekrutierung weiterer Makrophagen, aber auch dendritischer Zellen und natürlicher Killerzellen in das entzündete Organ fördert⁷⁹. In Abbildung 15B sind die renalen mRNA Level von *Ccl2* dargestellt. Es konnte kein Unterschied zwischen Dereg und wt Tieren festgestellt werden.

Für die immunhistologische Darstellung der intraglomerulären Makrophagen wurden die Nierenparaffinschnitte mit einem anti-MAC-2-Antikörper gefärbt. MAC-2 gehört zur Familie der Lektine und wird in Folge eines starken inflammatorischen Stimulus als Oberflächenprotein auf einer Subpopulation von Makrophagen exprimiert⁸⁰.

Ergebnisse

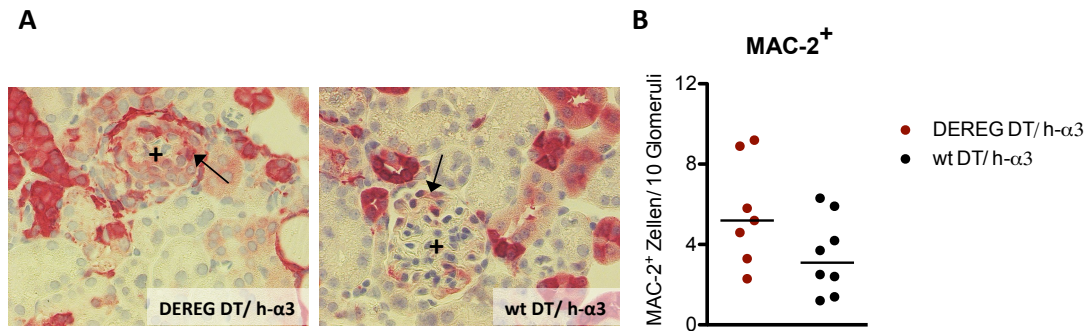


Abbildung 16 | Immunhistologische Anfärbung von intraglomerulären Makrophagen. Nierenparaffinschnitte von DEREK und wt Tieren wurden zur immunhistologischen Untersuchung der intraglomerulären Makrophagen mit einem anti-MAC-2 Antikörper gefärbt. Abgebildet sind repräsentative Mikroskopiebilder von infiltrierten Glomeruli in 40-facher Vergrößerung. Die Kreuze geben dabei jeweils das Zentrum eines Glomerulus an und die Pfeile zeigen beispielhaft auf eine MAC-2⁺ Zelle (A). Es wurden für jede Maus die MAC-2⁺ Zellen pro zehn Glomeruli gezählt. Die Datenpunkte repräsentieren individuell analysierte Mäuse und die Querbalken geben den Median an. Der Statistik liegt der *U*-Test von Mann und Whitney zu Grunde (B). *DT*=*Diphtherietoxin*

In Abbildung 16A sind exemplarisch mikroskopische Aufnahmen von jeweils einem MAC-2-gefärbten Nierenparaffinschnitt aus DEREK und wt Mäusen abgebildet. In Abbildung 16B ist die dazugehörige statistische Auswertung dargestellt. In DEREK Tieren wurden mehr intraglomeruläre Makrophagen pro zehn Glomeruli gezählt als in wt Tieren ($p=0.25$). Der Median betrug 5.2 MAC-2⁺ Zellen pro zehn Glomeruli in DEREK und 3.1 in wt Tieren. Auf Grund der hohen Streuung innerhalb der Gruppen war der Unterschied jedoch nicht signifikant.

Zusammenfassend führte die späte Depletion der Tregs im EAG Modell zu einer Verstärkung der Expression von Th1- und Th17-spezifischen Zytokinen und damit einhergehend einem Trend zu mehr Makrophagen in der entzündeten Niere und einem höheren renalen Gewebeschaden in depletierten DEREK Mäusen. Wie erwartet hatte die späte Depletion keinerlei Einfluss auf die Proteinurie und die Titer an α -3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern.

3.3 Blockade des IL-10 Signalweges in der späten Phase der EAG

Interleukin-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, welches von Tregs sezerniert wird und eine wichtige Rolle in der Immunregulierung und bei Entzündungsreaktionen spielt. Es inhibiert die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, sowie die Expression ko-stimulatorischer Faktoren und von MHCII Molekülen⁸¹⁻⁸⁴. Des Weiteren kann IL-10 das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Immunzellen, wie z.B. B-Zellen, NK-Zellen oder dendritischer Zellen, inhibieren⁸⁵.

Der IL-10 Rezeptor (IL-10R) gehört zur Familie der Typ II Zytokinrezeptoren und besteht aus zwei Untereinheiten IL-10R1 und zwei Untereinheiten IL-10R2. IL-10R1 bindet mit sehr hoher Affinität das IL-10, während die Assoziation der IL-10R2 Einheiten zur Signaltransduktion nach Ligandenbindung führt⁸⁶.

Experimente mit IL-10^{-/-} Mäusen zeigen, dass IL-10 bei der Prävention von Organ-spezifischen Autoimmunerkrankungen eine wichtige protektive Rolle spielt^{85,87-89}. Im NTN Modell konnte sogar gezeigt werden, dass durch einen selektiven *knock out* des *IL-10* Gens in Tregs die Krankheitsprogression und der renale Gewebeenschaden deutlich verschlimmert werden⁷⁴.

Im folgenden Experiment sollte deshalb untersucht werden, ob eine Blockade des IL-10 Signalweges in der späten Phase der EAG eine Auswirkung auf den weiteren Verlauf der Erkrankung bzw. den Übergang vom nephrotischen zum nephritischen Syndrom hat und die Th1 und Th17 Immunantwort beeinflusst werden können. Zur Blockade des IL-10 Signalweges wurde ein neutralisierender Antikörper gegen den IL-10R verwendet, welcher in der Literatur bereits beschrieben und im Mausmodell etabliert wurde^{90,91}.

3.3.1 Krankheitsverlauf nach Induktion der EAG und neutralisierender Blockade des IL-10R von Woche 7 bis 10 in DBA/1 wt Mäusen

In 24 DBA/1 wt Mäusen wurde durch die Immunisierung mit insgesamt viermal 30 µg h-α3(IV)NC1 die EAG induziert. In der späten Phase sollte die durch IL-10-vermittelte Signalkaskade blockiert werden. Dazu wurden acht Tiere beginnend in Woche 7 mit 0.333 µg anti-IL-10R Antikörper pro Woche behandelt. Bei dieser Konzentration und dem Applikationsschema handelt es sich um ein bereits etabliertes Verfahren⁹². Weitere acht Mäuse bekamen eine IgG Kontrolle (gereinigtes Ratten IgG) injiziert, die restlichen blieben unbehandelt (mock). Zehn Wochen nach der initialen Immunisierung wurden die Tiere getötet und Milz und Niere zur weiteren Analyse entnommen. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt.

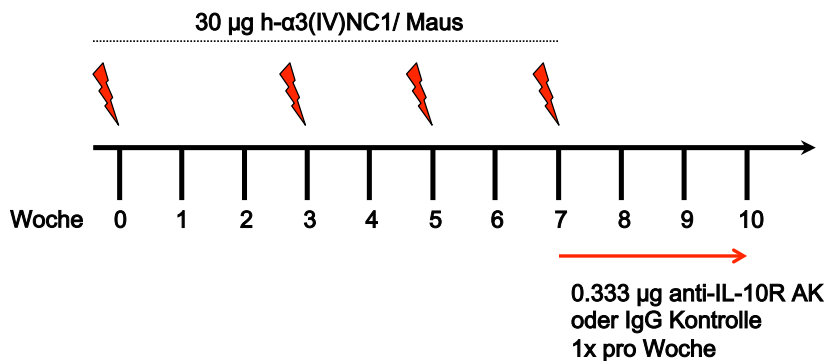


Abbildung 17 | Immunisierungs- und Behandlungsschema. In DBA/1 wt Mäusen wurde durch die Immunisierung mit h-α3(IV)NC1 eine EAG induziert. Ein Drittel der Mäuse bekam ab Woche 7 wöchentlich 0.333 µg eines anti-IL-10R Antikörpers, ein Drittel 0.333 µg einer IgG Kontrolle (gereinigtes Ratten IgG) injiziert und der Rest der Mäuse blieb unbehandelt. Zehn Wochen nach der initialen Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Organe zur weiteren Analyse entnommen. *EAG=experimentelle autoimmune Glomerulonephritis, AK=Antikörper*

Während des gesamten Versuches wurden die Mäuse regelmäßig gewogen und nach den in Tabelle 11 (Kapitel 6.2.1.3) dargestellten Kriterien beobachtet. Außerdem wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Urin- und Blutproben gewonnen.

Über den gesamten Versuchszeitraum konnte kein Unterschied in der prozentualen Änderung des Körpergewichts festgestellt werden (Abbildung 18A). Auch wurde kein Unterschied im Maß der Proteinurie detektiert. Alle Mäuse wiesen ähnliche Albumin/ Kreatinin Verhältnisse auf (Abbildung 18B).

In Abbildung 18C sind außerdem die Titer für m-α3(IV)NC1-spezifische Antikörper der drei Versuchsgruppen jeweils vor Beginn des Experiments, vor dem Start der

Ergebnisse

Behandlung und nach Beendigung des Experiments dargestellt. Auch bei diesem Parameter konnte kein Versuchsgruppen-spezifischer Unterschied festgestellt werden. Bei den BUN-Werten, als Maß für den renalen Gewebeschaden, konnte zwar ein leichter Trend in anti-IL-10R Antikörper-behandelten Tieren gezeigt werden (Abbildung 18D). Die Behandlung in der späten Phase der EAG hatte aber keinen Einfluss auf den weiteren Verlauf der Erkrankung.

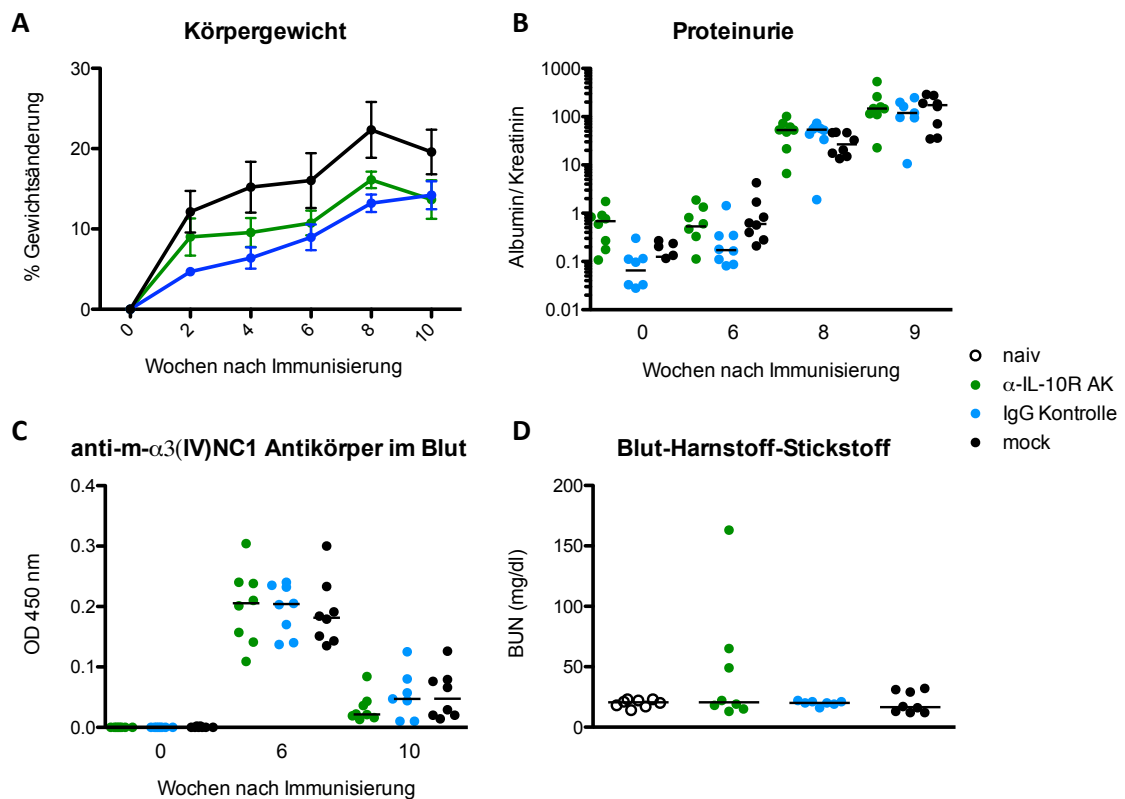


Abbildung 18 | Körpergewichtsverlauf, m- α 3(IV)NC1-spezifischer Antikörpertiter und klinische Parameter zur Überwachung der Nierenfunktion. Insgesamt wurde in 24 DBA/1 Mäusen eine EAG induziert. Ab Woche 7 wurden acht Mäuse mit einem anti-IL-10R Antikörper behandelt, acht Mäuse bekamen eine IgG Kontrolle (gereinigtes Ratten IgG) injiziert und acht blieben ohne jegliche weitere Behandlung (mock). Alle Mäuse wurden zehn Wochen nach der initialen Immunisierung getötet. Während des Versuches wurden die Mäuse regelmäßig auf ihren Allgemeinzustand hin kontrolliert und Blut- und Urinproben gewonnen. In der Abbildung sind die prozentuale Änderung des Körpergewichts bezogen auf das Ausgangsgewicht (A), das Albumin/ Kreatinin Verhältnis (B) und die Titer an m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern (C) zu den angegebenen Zeitpunkten und der Blut-Harnstoff-Stickstoff in Woche 10 (D) dargestellt. Die Datenpunkte stellen entweder den Mittelwert +/- SEM (A) oder individuell analysierte Mäuse, wobei der Querbalken den Median angibt (B-D), dar. Der Statistik liegen die einfache Varianzanalyse (*one way ANOVA*) mit nachfolgendem Dunn's Test (A) bzw. der *H*-Test von Kruskal und Wallis mit anschließendem Bonferroni Post-hoc Test (B-D) zu Grunde. EAG=experimentelle autoimmunne Glomerulonephritis; AK=Antikörper

3.3.2 Immunzellen in Milz und Niere

Zehn Wochen nach der initialen Immunisierung wurden die Mäuse getötet und Milz und Niere für weitere Analysen entnommen. Ein Teil der Organe wurde jeweils für eine durchflusszytometrische Analyse aufgearbeitet. In Abbildung 19A-C sind die Zellfrequenzen von CD4 und CD8 T-Zellen sowie Tregs in der Niere dargestellt. Es wurde kein Unterschied in den unterschiedlich behandelten Mausgruppen festgestellt. Die Analyse der Makrophagen ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den mit einem anti-IL-10R AK behandelten Tieren und naiven Kontrollmäusen, jedoch keine Differenzen zwischen den unterschiedlich behandelten Mäusen (Abbildung 19D).

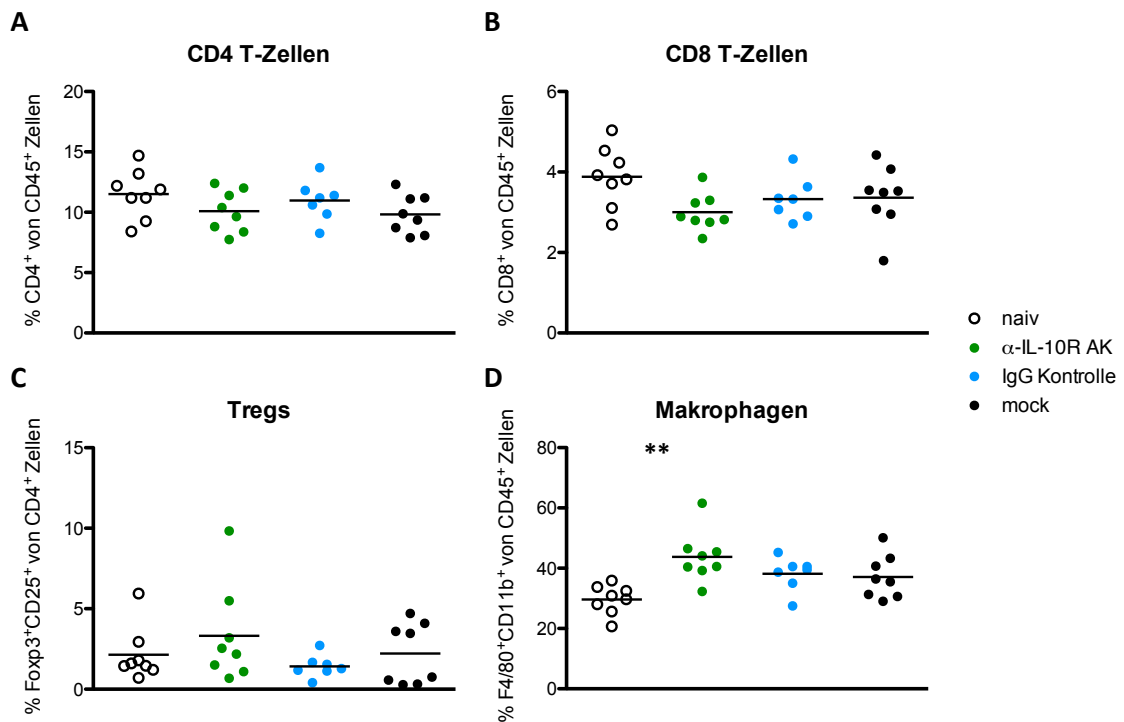


Abbildung 19 | FACS-Analyse der Niere zehn Wochen nach der initialen Immunisierung. Zehn Wochen nach der initialen Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Niere zur weiteren Analyse entnommen. Dargestellt sind die Frequenzen verschiedener Immunzellpopulationen ermittelt durch eine FACS-Analyse. Jeder Punkt stellt eine individuell analysierte Maus dar und die Querbalken geben den Mittelwert an. Der Statistik liegt die einfache Varianzanalyse (*one way ANOVA*) und anschließend Bonferroni Post-hoc-Test zu Grunde mit ****p < 0.01**. *FACS=fluorescence activated cell sorting; AK=Antikörper*

Analog zur Niere wurde auch die Milz durchflusszytometrisch analysiert. Alle immunisierten Mäuse wiesen ähnliche Zellfrequenzen für CD4 und CD8 T-Zellen, Tregs sowie Makrophagen auf (Abbildung 20). Lediglich der Vergleich der immunisierten Tiere mit naiven Kontrollmäusen zeigte bei den CD4 T-Zellen signifikant verringerte Werte (Abbildung 20A).

Ergebnisse

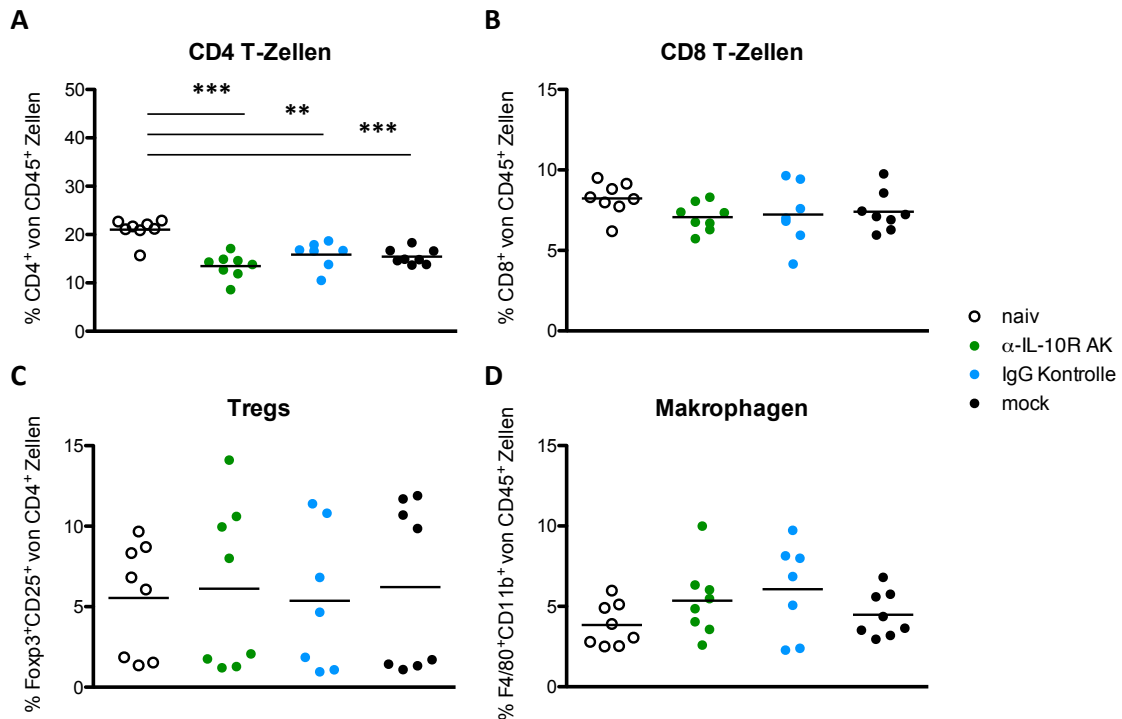


Abbildung 20 | FACS-Analyse der Milz zehn Wochen nach der initialen Immunisierung. Zehn Wochen nach der initialen Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Milz zur weiteren Analyse entnommen. Dargestellt sind die mittels FACS erhobenen Frequenzen verschiedener Immunzellpopulationen. Jeder Punkt stellt eine individuell analysierte Maus dar und die Querbalken geben den Mittelwert an. Der Statistik liegt die einfache Varianzanalyse (*one way ANOVA*) und anschließend Bonferroni Post-hoc-Test zu Grunde mit ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. FACS=fluorescence activated cell sorting; AK=Antikörper

Zusätzlich zur FACS-Analyse wurden mittels qPCR die Expressionslevel verschiedener Gene in der Niere analysiert. Die Quantifizierung der mRNA von *CXCL9*, *CCL2*, *Foxp3* und *IL-10* ergab keine Unterschiede zwischen den immunisierten Mäusen aller drei Gruppen und stimmte somit mit den bereits gezeigten Daten der FACS-Analyse in Abbildung 19 überein (eigene Daten nicht gezeigt).

3.3.3 h- α 3(IV)NC1-spezifische T-Zellantwort in der Milz

Um zu überprüfen, ob die Behandlung mit einem anti-IL-10R Antikörper eine Auswirkung auf die h- α 3(IV)NC1-spezifische T-Zellantwort hat, wurden Milzzellen aus jeder Versuchsmaus für acht Stunden mit 54 μ g/ml h- α 3(IV)NC1 restimuliert. Nach vier Stunden erfolgte die Zugabe des Golgi-Apparat Hemmstoffes Brefeldin A. Brefeldin A verhindert die Sezernierung von Zytokinen und anderen löslichen extrazellulären Molekülen. Für die FACS-Analyse wurden zunächst CD4 T-Zellen als CD45⁺CD4⁺ lebende Einzelzellen eingegrenzt und die intrazelluläre Zytokinanreicherung mit Hilfe von Antikörpern gegen CD154 und IFN- γ , IL-17A oder TNF- α dargestellt. CD154 wird kurz

Ergebnisse

nach der Stimulation des T-Zellrezeptors von allen CD4 T-Zellen hochreguliert und dient durch die Bindung an CD40 als Aktivierungssignal für B-Zellen und Makrophagen. Die Expression von CD154 erlaubt daher im FACS die Identifizierung von über den T-Zellrezeptor aktivierten T-Zellen und die Kombination aus CD154- und Zytokininfärbung ermöglicht einen sensitiven Nachweis von Antigen-spezifischen CD4 T-Zellen⁹³.

In Abbildung 21 ist repräsentativ dargestellt wie die Eingrenzung über CD154 und jeweils ein Zytokin in einem Rohdaten-*Dotplot* im FACS aussieht. Im oberen rechten Quadranten sind die Frequenzen der $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen T-Zellen zu erkennen.

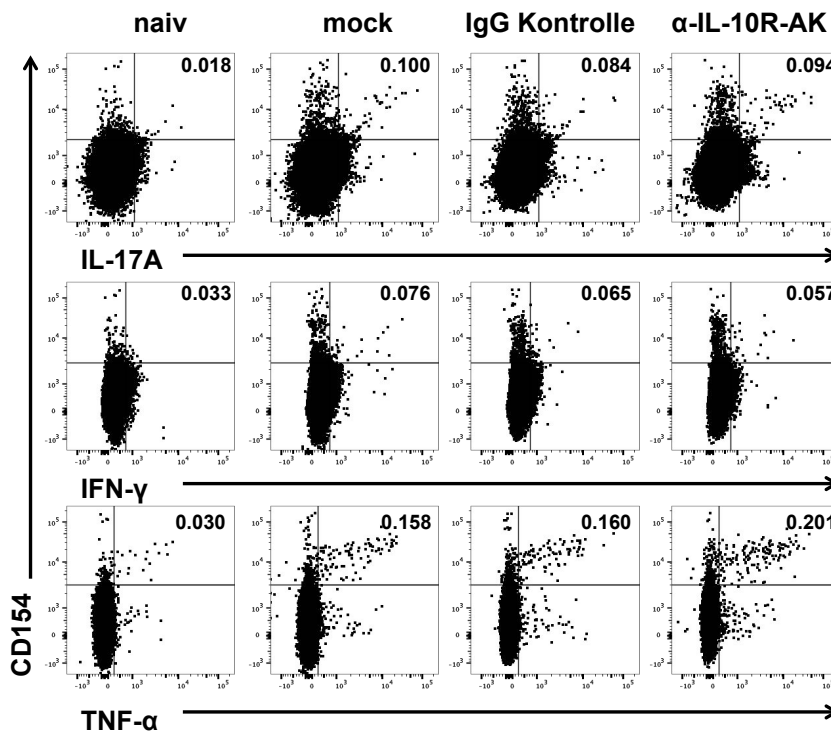


Abbildung 21 | Repräsentativer *Dotplot* zur durchflusszytometrischen Analyse $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischer CD4 T-Zellen in der Milz. Milzzellen wurden spezifisch mit h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ stimuliert und anschließend die Produktion von IL-17A, IFN- γ und TNF- α der CD4 T-Zellen im FACS analysiert. CD4 T-Zellen wurden zunächst auf CD45⁺CD4⁺ lebende Einzelzellen eingegrenzt und $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische CD4 T-Zellen dann gemäß der Expression des Aktivierungsmarkers CD154 und des jeweiligen Zytokins dargestellt. Die Abbildung zeigt repräsentative *Dotplots*. *FACS=fluorescence activated cell sorting; AK=Antikörper*

Abbildung 21 und Abbildung 22 zeigen, dass nach spezifischer Restimulation $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -reaktive CD4 T-Zellen mittels anti-CD154- und anti-Zytokin-Färbung nachgewiesen werden können. In den Milzen immunisierter Mäuse lag der Anteil an doppelt positiven CD4 T-Zellen nach spezifischer Restimulation im Mittel bei 0.05-0.2%,

Ergebnisse

d.h. etwa eine in 500-2000 CD4 T-Zellen war $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifisch. Unstimulierte Milzzellen wiesen eine Frequenz an CD154⁺Zytokin⁺ CD4 T-Zellen von 0.02-0.03% auf (eigene Daten nicht gezeigt). Die anti-IL-10R Antikörper-behandelten Mäuse zeigten einen signifikanten Unterschied in der Frequenz von CD154⁺TNF- α ⁺ CD4 T-Zellen (Abbildung 22B), jedoch wurde kein Unterschied in CD154⁺IFN- γ ⁺ und CD154⁺IL-17A⁺ $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen CD4 T-Zellen beobachtet zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren (Abbildung 22A+C).

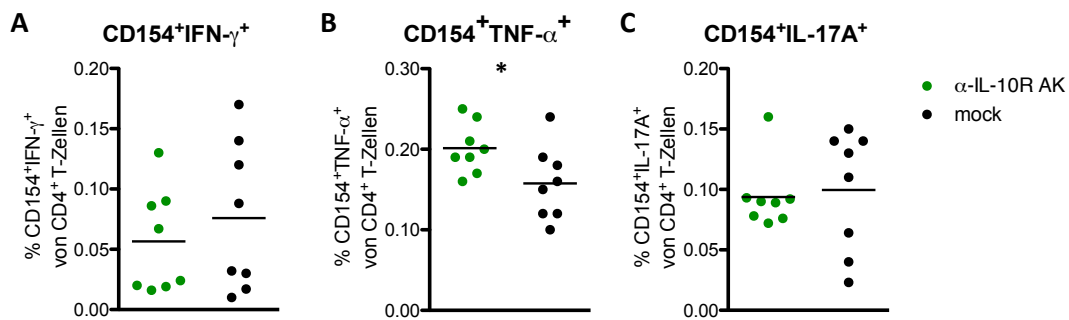


Abbildung 22 | h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische CD4 T-Zellen in der Milz. Milzzellen wurden spezifisch für acht Stunden mit 54 $\mu\text{g}/\text{ml}$ h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ restimuliert und anschließend die Produktion von IL-17A, IFN- γ und TNF- α der $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen CD4 T-Zellen im FACS analysiert. Die CD154⁺Zytokin⁺ Frequenzen unstimulierter Zellen und spezifisch stimulierter naiver Zellen lagen im Mittel bei 0.02-0.03%. In keinem Fall konnte ein Unterschied zwischen IgG Kontrollen und mock Kontrollen festgestellt werden (eigene Daten nicht gezeigt). Jeder Datenpunkt stellt eine individuell analysierte Maus dar und die Querbalken geben den Mittelwert an. Der Statistik liegt der unverbundene *t*-Test zu Grunde mit * $p < 0.05$. AK=Antikörper

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieses Experimentes, dass die Behandlung mit einem anti-IL-10R Antikörper in der späten Phase der Erkrankung keine Auswirkung auf den weiteren Verlauf, die Prognose und klinische Parameter hatte. Die Immunantwort schien weitestgehend unbeeinflusst zu bleiben, jedoch ließ sich ein leicht verändertes Profil in der Zytokinproduktion $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischer CD4 T-Zellen in der Milz zeigen.

3.4 Depletion der regulatorischen T-Zellen in der frühen Phase der EAG

Bereits im Thymus werden T-Zellen, die auf ein körpereigenes Antigen reagieren entfernt. Die Etablierung dieser zentralen Toleranz im Thymus ist somit ein essentieller Schritt zur Vorbeugung von Autoimmunerkrankungen. Auch für das $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ konnte gezeigt werden, dass es im humanen Thymus exprimiert wird und somit eine zentrale Toleranz induziert werden sollte⁹⁴. Diese ist aber nicht vollständig und selbst in gesunden Individuen können geringe Frequenzen an $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen T-Zellen im Blut nachgewiesen werden^{95,96}. Zur Zeit ist unklar, warum diese T-Zellen zu keiner Erkrankung führen, wahrscheinlich sind aber Tregs entscheidend für die Hemmung dieser Zellen und die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Ein Funktionsverlust der regulatorischen Mechanismen kann zu einem Durchbrechen der Toleranz gegenüber Autoantigenen und zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen.

Im Folgenden wurden die regulatorischen T-Zellen durch die Injektion von Diphtherietoxin in DEREK Mäusen in der frühen Phase der EAG bzw. während der Immunisierungen depletiert. Mit diesem Ansatz sollte untersucht werden, ob durch das Fehlen der Tregs die Toleranz gegenüber dem $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ effektiver durchbrochen werden kann und die Entwicklung einer schweren anti-GBM-Glomerulonephritis somit schneller voranschreitet.

Die nachfolgend präsentierten Daten sind die zusammengefassten Ergebnisse aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

3.4.1 Krankheitsverlauf bei Immunisierung mit h- α 3(IV)NC1 und paralleler Behandlung mit Diphtherietoxin in DEREK und wt Mäusen

Im folgenden Experiment wurden insgesamt 17 DEREK und 16 wt Mäuse zur Induktion einer EAG mit viermal 30 μ g h- α 3(IV)NC1 in Adjuvant immunisiert (DEREK DT/ h- α 3 und wt DT/ h- α 3). Jeweils 18 Stunden vor jeder Immunisierung wurde den Tieren 0.25 μ g DT zur Depletion der Tregs i.p. injiziert. Als Kontrollgruppen dienten DEREK (n=6) und wt (n=5) Mäuse, die an Stelle des h- α 3(IV)NC1 lediglich Adjuvant gespritzt bekamen (DEREK DT/ PBS und wt DT/ PBS). Der schematische Versuchsablauf ist in Abbildung 23 dargestellt.

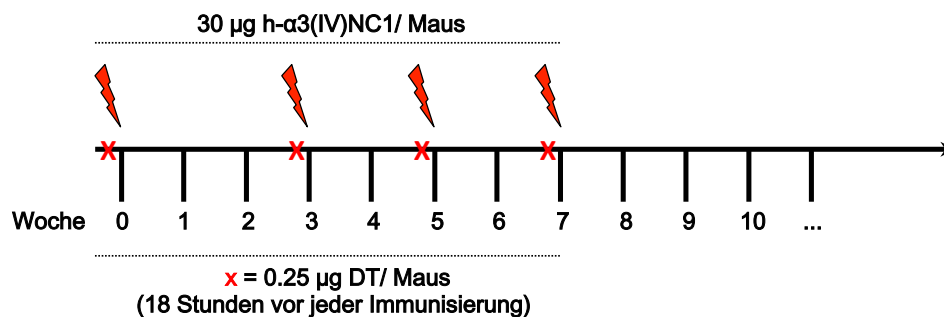


Abbildung 23 | Immunisierungsschema für die parallele Depletion der Tregs während der Induktion der EAG. DEREK (n=17) und wt (n=16) Tiere wurden insgesamt viermal mit 30 μ g h- α 3(IV)NC1 subkutan immunisiert (Blitz) und jeweils 18 Stunden vor der Injektion intraperitoneal mit 0.25 μ g Diphtherietoxin (DT; Kreuz) behandelt um die regulatorischen T-Zellen zu depletieren. Als Kontrollgruppen dienten weitere DEREK (n=6) und wt (n=5) Tiere, die mit PBS an Stelle von h- α 3(IV)NC1 immunisiert aber ebenfalls mit DT behandelt wurden. Die Tötung erfolgte individuell sobald eine Maus schwerkrank wurde. *EAG=experimentelle autoimmune Glomerulonephritis*

Während des gesamten Zeitraums wurden die Mäuse nach den Kriterien in Tabelle 11 (Kapitel 6.2.1.3) überwacht und das Körpergewicht dokumentiert. Zusätzlich wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Blut- und Urinproben zur Bestimmung der Proteinurie und des Antikörpertiters gewonnen. Als Versuchsende wurde kein definierter Zeitpunkt festgelegt, sondern jede Maus individuell aus dem Versuch genommen, sobald sie schwere Anzeichen einer Nephritis aufwies und aus ethischen Gründen getötet werden musste.

In Abbildung 24 ist die Änderung des Körpergewichtes bezogen auf das Ausgangsgewicht in Woche 0 graphisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die parallele Injektion von DT und die Induktion der EAG sich im Gewichtsverlauf widerspiegelte, da

Ergebnisse

beide DT/ h- α 3 Versuchsgruppen verglichen mit den Adjuvant-Kontrollen deutlich weniger an Gewicht zunahmten. Diese Beobachtung zeigte aber auch, dass dies nicht auf die Injektion des Toxins zurückzuführen ist. Des Weiteren war ein Unterschied zwischen den DEREK und wt Tieren der DT/ h- α 3 Gruppe zu erkennen, welcher sich ab Woche 7 deutlich zeigte. Die DEREK Tiere verloren stetig an Gewicht und wiesen bei Versuchsende teilweise sogar ein geringeres Körpergewicht als zu Beginn des Versuches auf.

Die doppelte Belastung durch das Toxin und die Entwicklung der EAG in DEREK Tieren hatte über die gesamte Versuchsdauer Auswirkungen auf den Allgemeinzustand der Mäuse.

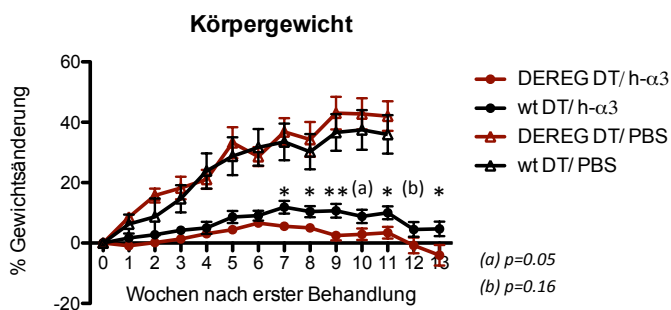


Abbildung 24 | Veränderungen im Körpergewicht während des gesamten Experiments. DEREK und wt Tiere wurden mit h- α 3(IV)NC1 immunisiert oder als Kontrolle nur mit Adjuvant behandelt. Jeweils 18 Stunden vor jeder Immunisierung wurden sie mit Diphtherietoxin (DT) behandelt. Alle Mäuse wurden wöchentlich gewogen und die Änderung im Körpergewicht bezogen auf Woche 0 dargestellt. Die verschiedenen Zeitpunkte sind als Mittelwert +/- SEM dargestellt. Der Statistik beim Vergleich der beiden immunisierten Gruppen liegt der unverbundene *t*-Test zu Grunde mit **p*<0.05; ***p*<0.01.

3.4.2 Verlust der Nierenfunktion

Die Nierenfunktion wurde über die Menge an ausgeschiedenem Albumin im Urin überwacht. Die über einen ELISA ermittelten quantitativen Albumin-Werte wurden auf den jeweiligen Kreatiningehalt normalisiert (Albumin/ Kreatinin Ratio). In Abbildung 25A ist zu erkennen, dass die DEREK Mäuse früher eine Proteinurie entwickelten als wt Tiere. In Woche 6 war der Unterschied zwischen beiden Gruppen signifikant, glich sich allerdings bis ins Endstadium der EAG wieder an.

Des Weiteren wurde nach Versuchsende der Stickstoffgehalt im Blut der Tiere bestimmt. Werte über 50 mg/dl sind in unserem Mausmodell pathologisch und deuten auf einen schweren Nierenschaden hin. Der Median im BUN-Level der DEREK Tiere betrug 34 mg/dl, der Median der wt Tiere lag bei 25 mg/dl (Abbildung 25B). Es war kein

Ergebnisse

eindeutiger Trend zu höheren Werten in DEREГ Tieren erkennbar. Alle Kontrolltiere zeigten ähnliche Konzentrationen an Blut-Harnstoff-Stickstoff wie naive Tiere.

Insgesamt zeigen die klinischen Parameter, dass das Depletieren der Tregs im frühen Stadium der EAG den Verlust der Nierenfunktion und das Ausmaß des Schadens negativ zu beeinflussen scheint.

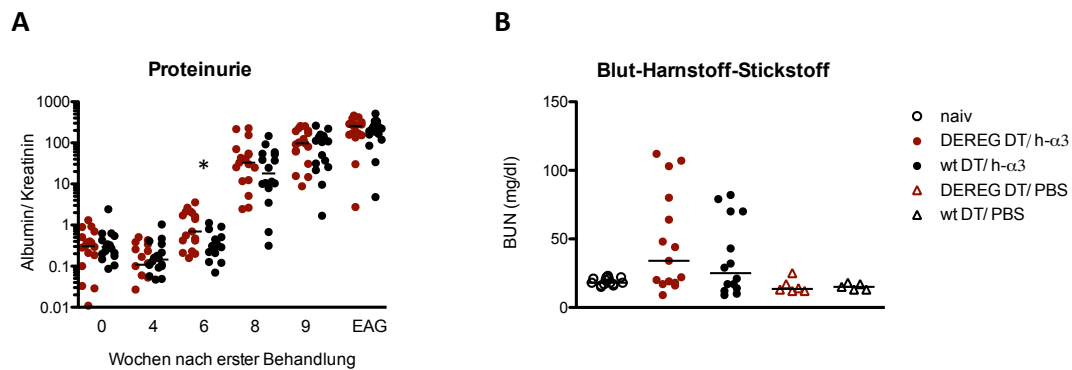


Abbildung 25 | Verlust der Nierenfunktion. DEREГ und wt Tiere wurden mit h-α3(IV)NC1 oder als Kontrolle mit Adjuvant immunisiert. Jeweils 18 Stunden vor jeder Immunisierung wurden alle Mäuse mit Diphtherietoxin (DT) behandelt. Während des Experiments wurden zu den abgebildeten Zeitpunkten Urinproben gesammelt und die Albumin/ Kreatinin Ratio bestimmt (A). Nach Beendigung des Experiments wurde der Stickstoffgehalt im Blut (BUN) gemessen (B). Jeder Datenpunkt stellt eine individuell analysierte Maus dar, die Querbalken geben den Median an. Der Statistik liegen der *U*-Test von Mann und Whitney mit $*p < 0.05$ (A) bzw. der *H*-Test von Kruskal und Wallis mit Bonferroni Post-hoc Test (B) zu Grunde. *EAG*=experimentelle autoimmune Glomerulonephritis; *BUN*=blood urea nitrogen

3.4.3 m-α3(IV)NC1-spezifische Antikörperantwort

Zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuches wurden Blutproben von den Mäusen entnommen um die Titer an m-α3(IV)NC1-spezifischen IgG mittels ELISA zu bestimmen. Die Depletion der Tregs parallel zur Induktion der EAG führte in Woche 4 zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentration an m-α3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern welcher ebenfalls im EAG Endstadium zu erkennen war. Bereits an Tag 11 nach der initialen Immunisierung konnten m-α3(IV)NC-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, jedoch war zu diesem Zeitpunkt noch keine Differenz zwischen immunisierten DEREГ und wt Tieren zu sehen (eigene Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

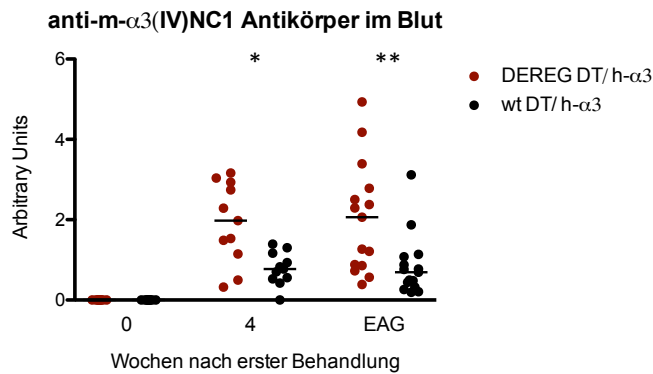


Abbildung 26 | m- α 3(IV)NC1-spezifische Antikörper im Blut. Die relative Quantifizierung der m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörper erfolgte mittels ELISA. Dargestellt sind die Titer als *Arbitrary Unit* normalisiert gegen ein Standardserum. Adjuvant-immunisierte Mäuse zeigten zu den analysierten Zeitpunkten ähnliche Titer an m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern wie naive Tiere (eigene Daten nicht gezeigt). Jeder Datenpunkt stellt eine individuell analysierte Maus dar und die Querbalken geben den Median an. Der Statistik liegt der *U*-Test von Mann und Whitney zu Grunde mit * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. *EAG*=experimentelle autoimmune Glomerulonephritis; *DT*=Diphtherietoxin

3.4.4 T-Zellen und Makrophagen in Milz und Niere

Mit der Depletion der Tregs parallel zur Induktion der EAG sollte analysiert werden, ob es zu einer Verstärkung der spezifischen Th1 und Th17 Antwort kam. Im vorhergehenden Experiment konnte bereits gezeigt werden, dass die späte Depletion der Tregs einen tendenziellen Einfluss auf die CD4 T-Zellantwort hat (siehe Abschnitt 3.2.4).

Für die Analyse der T-Zellfrequenzen wurden aus den entnommenen Milzen und Nieren Einzelzellsuspensionen hergestellt und die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern direkt *ex vivo* gefärbt. CD4 T-Zellen wurden wie zuvor über die Oberflächenmarker CD45 und CD4 identifiziert. Während in der Milz kein Unterschied in der Frequenz an CD4 T-Zellen zwischen DEREG und wt Tieren vorhanden war (Abbildung 27A), ist in Abbildung 27B zu erkennen, dass DEREG Tiere in der entzündeten Niere eine signifikant höhere Frequenz an CD4 T-Zellen aufwiesen.

Ergebnisse

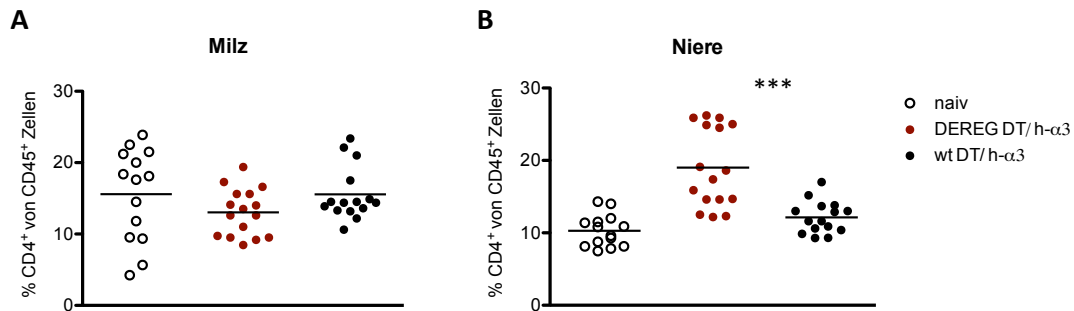


Abbildung 27 | FACS-Analyse der CD4 T-Zellen in Milz und Niere. Graphische Darstellung der T-Zell-Analyse in der Milz (A) und in der Niere (B) von naiven und schwerkranken Mäusen (EAG Endstadium). CD4 T-Zellen wurden im FACS über die Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD45 erfasst. Die Datenpunkte repräsentieren individuell analysierte Mäuse und die Querbalken geben den Mittelwert an. Der Statistik liegt die einfache Varianzanalyse (*one way ANOVA*) mit anschließendem Dunn's Test Grunde mit $***p < 0.001$. *FACS=fluorescence activated cell sorting; EAG=experimentelle autoimmune Glomerulonephritis; DT=Diphtherietoxin*

Regulatorische T-Zellen können innerhalb der CD4 T-Zellen über die Expression von Foxp3 identifiziert werden. Sowohl in der Milz als auch in der Niere konnte kein Unterschied zwischen DEREK und wt Tieren detektiert werden, jedoch waren die Frequenzen in der entzündeten Nieren gegenüber naiven Tieren signifikant erhöht (Abbildung 28B).

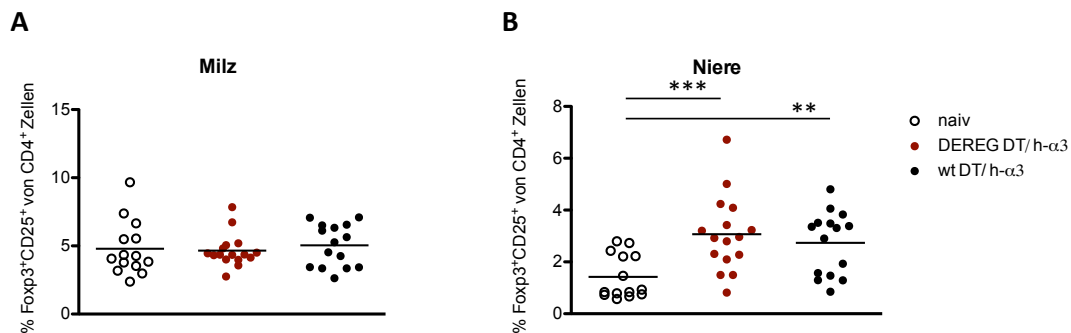


Abbildung 28 | FACS-Analyse der Tregs in Milz und Niere. Graphische Darstellung der Treg-Analyse in der Milz (A) und in der Niere (B) von naiven und schwerkranken Mäusen (EAG Endstadium). Tregs wurden als Foxp3⁺CD25⁺ Zellen innerhalb der CD4 T-Zellen definiert. Die Datenpunkte repräsentieren individuell analysierte Mäuse und die Querbalken geben den Mittelwert an. Der Statistik liegt die einfache Varianzanalyse (*one way ANOVA*) mit anschließendem Dunn's Test zu Grunde mit $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. *FACS=fluorescence activated cell sorting; EAG=experimentelle autoimmune Glomerulonephritis; DT=Diphtherietoxin*

Makrophagen wurden als CD45⁺Gr1⁺CD11b⁺F4/80⁺ Zellen im FACS erfasst. Im Gegensatz zu den CD4 T-Zellen konnte hier ein signifikanter Unterschied in den Frequenzen zwischen DEREK und wt in der Milz festgestellt werden (Abbildung 29A),

Ergebnisse

jedoch keiner in der Niere (Abbildung 29B). Erstaunlicherweise wiesen beide Versuchsgruppen in der Niere keine Erhöhung der Makrophagenfrequenz im EAG Stadium im Vergleich zu naiven Mäusen auf (Abbildung 29B).

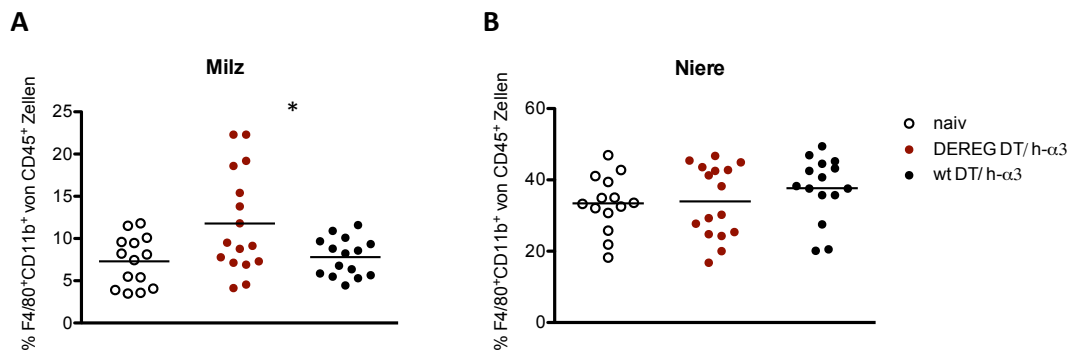


Abbildung 29 | FACS-Analyse der Makrophagen in Milz und Niere. Aus den entnommenen Milzen und Nieren wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und anschließend für die FACS Analyse entsprechend mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt. Dargestellt sind die Frequenzen der F4/80⁺CD11b⁺Gr1⁻ Zellen von allen CD45⁺ Zellen. Jeder Datenpunkt stellt eine individuell analysierte Maus dar und die Querbalken geben den Mittelwert an. Der Statistik liegt die einfache Varianzanalyse (*one way ANOVA*) mit anschließendem Dunn's Test zu Grunde mit * $p < 0.05$. FACS=fluorescence activated cell sorting; EAG=experimentelle autoimmune Glomerulonephritis; DT=Diphtherietoxin

3.4.5 h-α3(IV)NC1-spezifische T-Zellantwort in der Milz

Um die CD4 T-Zellen funktionell zu analysieren, wurden Milzzellen aus jeder Maus *in vitro* mit h-α3(IV)NC1 stimuliert und die Expression von CD154 und Zytokinen mittels FACS gemessen (siehe hierzu auch Kapitel 3.3.3.)

In Abbildung 30 ist die Eingrenzung über CD154 und jeweils ein Zytokin in repräsentativen *Dotplots* im FACS dargestellt. Im oberen rechten Quadranten sind die Frequenzen der h-α3(IV)NC1-spezifischen CD4 T-Zellen zu erkennen.

Ergebnisse

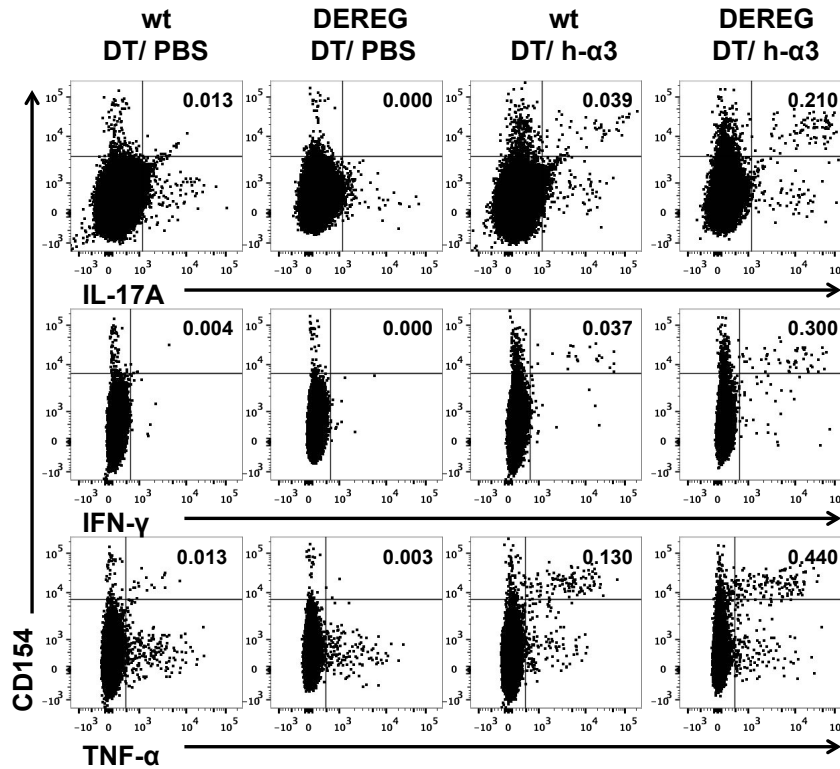


Abbildung 30 | Repräsentative Dotplots nach spezifischer Stimulation von Milzzellen. Milzzellen von DEREG und wt Mäusen wurden spezifisch mit h-α3(IV)NC1 stimuliert und anschließend die Produktion von IL-17A, IFN-γ und TNF-α der CD4 T-Zellen im FACS analysiert. CD4 T-Zellen wurden zunächst auf CD45⁺ und CD4⁺ lebende Einzelzellen eingegrenzt und α3(IV)NC1-spezifische CD4 T-Zellen dann gemäß der Expression des Aktivierungsmarkers CD154 und des jeweiligen Zytokins dargestellt. Die Abbildung zeigt repräsentative Dotplots. FACS=fluorescence activated cell sorting; DT=Diphtherietoxin

Die graphische Auswertung der spezifischen Restimulation von Milzzellen mit h-α3(IV)NC1 ist in Abbildung 31A-C dargestellt. Die Expression von CD154 und die Produktion von IFN-γ geben die Frequenz von h-α3(IV)NC1-spezifischen Th1 T-Zellen an und die Expression von CD154 zusammen mit der Produktion von IL-17A steht für h-α3(IV)NC1-spezifische Th17 Zellen. TNF-α wird von vielen Th-Zellsubtypen, einschließlich Th1 und Th17 Zellen, produziert.

Die Depletion von Tregs parallel zur Induktion der EAG in DEREG Mäusen hatte zur Folge, dass in der entzündeten Niere signifikant höhere Frequenzen an CD154⁺TNF-α⁺ CD4 T-Zellen vorhanden waren (Abbildung 31B; der Mittelwert in DEREG Tieren betrug 0.31% und in wt nur 0.15%). Th1-Zellen spezifisch für h-α3(IV)NC1 waren leicht erhöht ($p=0.08$). Der Mittelwert an CD154⁺IFN-γ⁺ T-Zellen betrug in DEREG Mäusen 0.17%, in wt Mäusen waren es lediglich 0.08% (Abbildung 31A). Für h-α3(IV)NC1-spezifische Th17 Zellen ließ sich kein eindeutiger Trend ($p=0.27$) zu höheren Frequenzen erkennen.

Ergebnisse

In DEREK Tieren waren im Mittel 0.16% der CD4 T-Zellen doppelt positiv für CD154 und IL-17A und wt Tieren waren es 0.11% der CD4 T-Zellen.

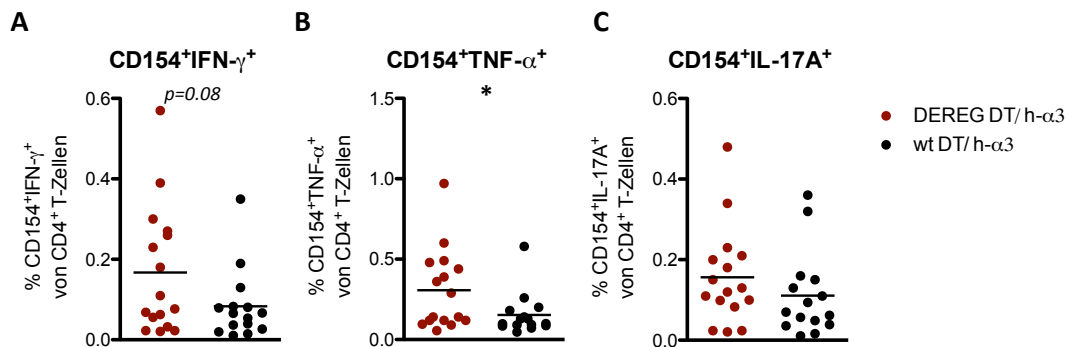


Abbildung 31 | h-α3(IV)NC1-spezifische T-Zellantwort in der Milz. Milzzellen von DEREK und wt Mäusen wurden spezifisch für acht Stunden mit 54 µg/ml h-α3(IV)NC1 restimuliert und anschließend die Produktion von IL-17A, IFN-γ und TNF-α der α3(IV)NC1-spezifischen CD4 T-Zellen im FACS analysiert. Als Vergleich dienten Milzzellen aus naiven und Adjuvant-immunisierten Mäusen. Die Frequenz der CD154⁺Zytokin⁺ CD4 T-Zellen lag hier im Mittel bei 0.02% (eigene Daten nicht gezeigt). Jeder Datenpunkt stellt eine individuell analysierte Maus dar und die Querbalken geben den Mittelwert an. Der Statistik liegt der unverbundene *t*-Test zu Grunde mit **p*<0.05. DT=Diphtherietoxin

Zusammenfassend führte die Depletion von regulatorischen T-Zellen während der Immunisierungsphase in DEREK Mäusen zu höheren Titern an m-α3(IV)NC1-spezifischen Autoantikörpern und zu einem schnelleren Verlust der Nierenfunktion, dargestellt durch die frühere Entwicklung einer deutlichen Proteinurie. Zusätzlich wiesen die Nieren im EAG Endstadium mehr CD4 T-Zellen auf, die nach Stimulation mit α3(IV)NC1 sowohl IFN-γ als auch TNF-α produzierten.

4 Diskussion

Die anti-glomeruläre Basalmembran-Glomerulonephritis (anti-GBM-GN) ist eine besonders schwere Form einer autoimmunen Nierenerkrankung und gehört zur Gruppe der rasch progredienten Glomerulonephritiden (RPGN). Charakteristisch ist die Bildung von Autoantikörpern, deren Antigen sich in der Kopfdomäne der $\alpha 3$ Kollagenkette der glomerulären Basalmembran (GBM) befindet, das $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ ¹³. Innerhalb dieses Antigens konnten weiterhin zwei immunogene Epitope identifiziert werden, E_A und E_B , die erst durch eine pathologische Konformationsänderung innerhalb des $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ für das Immunsystem zugänglich werden^{17,18}. Die Antikörper lagern sich entlang der Basalmembran ab und rufen eine Aktivierung des Komplementsystems hervor¹¹. Neben $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -reaktiven Antikörpern spielen bei der Immunantwort in der entzündeten Niere auch $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische T-Zellen eine Rolle. Diese T-Zellen sorgen zum einen für eine massive Infiltration des Gewebes durch Makrophagen und zum anderen sind sie direkt an der Ausbildung einer nekrotisierenden GN beteiligt, in Folge dessen es zur charakteristischen Halbmonbildung in den Glomeruli kommt und zum terminalen Nierenversagen^{24,35,40}.

Eine Möglichkeit sowohl die Autoimmunprozesse als auch die zelluläre Immunantwort im tierexperimentellen Modell zu untersuchen bietet die experimentelle autoimmune Glomerulonephritis (EAG). Dabei werden Mäuse insgesamt viermal mit dem rekombinant hergestellten $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ immunisiert. Die ersten Wochen sind durch eine sich entwickelnde Proteinurie und hohe Titer an $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen Antikörpern gekennzeichnet, während die späte Phase den Übergang zu einer nephritischen Entzündung darstellt, die sich vor allem durch das Einwandern $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischer T-Zellen, inflammatorischer Makrophagen und weiterer Immunzellen in die Niere und den daraus resultierenden Gewebeschaden auszeichnet. Innerhalb von zehn bis 14 Wochen entwickeln die Mäuse individuell alle wichtigen Charakteristika der humanen anti-GBM-GN^{23,24}.

Autoimmunerkrankungen im Menschen werden in den meisten Fällen mit immunsuppressiven Medikamenten, die sowohl gegen B- als auch T-Zellen gerichtet sind, behandelt. In anti-GBM-GN Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass es zum Ausbleiben des renalen Endschadens kommt, wenn in frühen Stadien der Erkrankung bzw. prophylaktisch vor Ausbruch der anti-GBM-GN ko-stimulatorische

T-Zell-Mechanismen, wie z.B. die CD40-CD154 oder CD28-B7 Interaktionen, blockiert werden⁴¹⁻⁴³. Das Immunsystem selbst ist auch in der Lage Immunantworten gegen körpereigene Strukturen zu inhibieren und somit die Entstehung von Autoimmunität vorzubeugen. Dies geschieht vor allem durch regulatorischer T-Zellen (Tregs), welche die Entstehung und Reaktion von Effektorzellen inhibieren können^{28,67}. Kommt es jedoch zum Durchbrechen dieser Toleranzmechanismen entstehen Autoimmunerkrankungen. Tregs bieten somit einen interessanten neuen Ansatz für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen.

4.1 Die Rolle der regulatorischen T-Zellen in der späten Phase der EAG

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von regulatorischen T-Zellen in der späten Phase der EAG untersucht. Zu diesem Zeitpunkt hat sich in den Mäusen bereits ein nephrotisches Syndrom manifestiert und der Übergang zur nephritischen Phase sollte beginnen. Die Beteiligung von $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen T-Zellen bei diesem Vorgang konnte bereits mit verschiedenen *knockout*-Modellen gezeigt werden³⁵. Eine mögliche hemmende Wirkung auf Th-Zellen durch Tregs sollte nun mittels der systemischen Depletion aller Foxp3⁺ Zellen untersucht werden. Dazu wurde das von Lahl *et al.* entwickelte DEREK (*depletion of regulatory T cells*) Mausmodell verwendet⁷⁶. In DEREK und Wildtyp (wt) Tieren wurde zunächst eine EAG durch Immunisierung mit dem humanen- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) induziert und ab Woche 8 wurden die Foxp3⁺ T-Zellen durch die mehrmalige Injektion von Diphtherietoxin (DT) systemisch depletiert.

Alle Mäuse entwickelten über den gesamten Zeitraum des Experiments hin eine ansteigende Proteinurie und hohe Titer an $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen Antikörpern, die sowohl gegen das humane Protein, welches zur Immunisierung verwendet wurde, gerichtet waren als auch gegen das murine $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$), also das genuine Autoantigen. Die Depletion der Tregs hatte auf beide Parameter wie erwartet keinen Einfluss. Die autoreaktiven-Antikörper gehören zur Subklasse IgG und sind bereits ab Woche 2 im EAG Modell im Blut detektierbar. Immunhistologische Untersuchungen zeigen die beginnende Ablagerung entlang der glomerulären Basalmembran (GBM) ab Woche 5²⁴. Diese Ablagerung führt zu einer Aktivierung des Komplementsystems und die Bindung des Komplementfaktors C3b an die GBM. Zusammen schädigen IgG- und Komplementablagerungen die Podozyten, welche die Basalmembran umschließen. Als

Diskussion

Folge ziehen die Podozyten ihre Fußfortsätze ein und der glomerulären Filter wird durchlässig^{97,98}. Dieses nephrotische Syndrom verläuft ohne eine signifikante Infiltration von Entzündungszellen und auch T-Zellen sind in diesem Stadium wahrscheinlich nicht direkt an der Nierenschädigung beteiligt. Diese Vermutung bestätigen auch Experimente mit Mäusen, denen eine effektive Th1- oder Th17-Immunantwort fehlt. Die Ausbildung eines ausgeprägten nephrotischen Syndroms blieb in diesen Tieren unbeeinflusst³⁵. Ob Tregs einen Einfluss auf die Entstehung von α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern haben, wurde in der vorliegenden Arbeit mit der frühen Depletion der Tregs im EAG Modell untersucht und wird daher später diskutiert.

Das Überleben der Tiere wurde durch die späte Depletion nicht beeinflusst. Der Allgemeinzustand in Woche 10 war aber im Vergleich zu wt Tieren etwas schlechter, aber längst nicht so gravierend wie erwartet. Die immunhistologische Untersuchung der Nieren deutete einen etwas schwerwiegenderen Gewebeschaden an. Vor allem bei der Bildung glomerulärer Halbmonde zeigte sich dieser Trend. Die allgemein noch relativ niedrigen BUN-Werte in Woche 10 nach der initialen Immunisierung in beiden Versuchsgruppen dieses Experiments deuteten darauf hin, dass die meisten Tiere das finale EAG Stadium noch nicht vollständig erreicht hatten. Hohe BUN-Werte werden erst gemessen, wenn eine fast vollständige Vernarbung des Nierengewebes eingetreten ist und eine finale Niereninsuffizienz vorliegt, da erst dann der Harnstoff nicht mehr über den Urin ausgeschieden werden kann. BUN-Werte korrelieren außerdem positiv mit der glomerulären Halbmondbildung³⁵.

Die durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen in Milz und Niere zeigte, dass es keine Unterschiede in der CD4 T-Zellfrequenz von behandelten DEREK und wt Tieren gibt. Die erhöhten mRNA Level von *Cxcl9*, *Ifng* und *Il17a* in der Niere von DEREK Mäusen zeigten jedoch, dass im entzündeten Organ die Th1- und Th17-spezifische Zytokinproduktion durch die Depletion verstärkt wurde. Eine erhöhte Expression von *Cxcl9* deutete zudem auch auf eine erhöhte Aktivierung von Makrophagen hin, was allerdings nur bedingt und nicht eindeutig in histologischen und durchflusszytometrischen Analysen bestätigt werden konnte.

Die späte Depletion der Tregs im EAG Modell resultierte in einem nur leicht veränderten Phänotyp verglichen mit nicht-depletierten Tieren. Dieses Ergebnis könnte mehrere

Diskussion

Gründe haben. Zum einen könnten Tregs im EAG Modell keine oder nur eine geringfügige Rolle spielen. Dagegen sprechen die bereits publizierten Ergebnisse von Paust *et al.* Hier konnte gezeigt werden, dass Tregs im Modell der nephrotoxischen Nephritis (NTN) die Th1 Immunantwort kontrollieren und regulieren⁷². Des Weiteren könnte das DEREK Modell nicht den optimalsten Versuchsansatz darstellen. Die quantitative Analyse des mRNA Levels von *Foxp3* als Marker für das Vorhandensein von Tregs zeigte, dass es nach zweiwöchiger Depletion keinerlei Unterschied im Treg-Kompartiment der Niere von DEREK und wt Tieren gab. Der Grund hierfür ist, dass es in DEREK Tieren eine kleine Population an *Foxp3*⁺*eGFP*⁻ Zellen gibt (ca. 5-10%⁹⁹), die unempfindlich für die Depletion durch Diphtherietoxin ist und den Verlust von depletierten *Foxp3*⁺*eGFP*⁺ Zellen in kürzester Zeit ausgleicht^{76,100}. In einem Infektionsmodell für Tuberkulose wurde sogar gezeigt, dass eben diese Population an *Foxp3*⁺*eGFP*⁻ Zellen den Einfluss und die Auswirkung der Depletion von regulatorischen T-Zellen limitiert¹⁰¹. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse stehen somit im Einklang mit den bereits publizierten Erkenntnissen und deuten stark auf eine schnelle Erholung des Treg-Kompartiments nach anhaltender DT Injektion hin. Jedoch sollte eine transiente Depletion der Tregs ausreichend sein um einen Einfluss auf die Entzündungsparameter in der Niere zu erzielen und somit zu einem aggravierten Nierenschaden führen. Der definierte Analysezeitpunkt könnte ein weiterer Faktor sein, der verantwortlich für die marginalen Auswirkungen der Depletion ist. Möglicherweise sind in Woche 10 noch nicht alle Mäuse im finalen EAG Stadium. Dafür würden zum einen die noch relativ niedrigen BUN-Werte sprechen und zum anderen ist eine schwer entzündete Niere im EAG Modell vor allem durch eine massive Infiltration an Makrophagen gekennzeichnet, was in unserem Projekt zum Teil noch nicht der Fall war³⁵.

Die Wahl eines weiteren experimentellen Ansatzes wäre zur Validierung und Verdeutlichung der Ergebnisse unserer Studie hier ratsam. Das Wachstum und das Überleben von regulatorischen T-Zellen ist abhängig von IL-2^{102,103}. Der Einsatz von anti-IL-2 Antikörpern zur direkten Blockade des Zytokins oder anti-CD25 Antikörpern zur Blockade der hoch-affinen IL-2R α -Kette auf der Zelloberfläche von Tregs könnte im Mausmodell eine Alternative zur Depletion von Tregs *in vivo* sein¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Ein anderer Ansatz stellt die *in vivo* Expansion von Tregs dar. Boyman *et al.* machten die Beobachtung, dass ein Komplex aus IL-2 und dem monoklonalen anti-IL-2 Antikörper

JES6-1 zu einer selektiven Expansion der Tregs führte ohne dabei Einfluss auf andere Zellpopulationen zu haben¹⁰⁷. In einem Mausmodell für allergisches Asthma führte sowohl die prophylaktische als auch die therapeutische Anwendung des IL-2:anti-IL-2 AK Komplexes zu signifikant weniger Gewebeschaden in der Lunge¹⁰⁸. Im experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) Mausmodell für Multiple Sklerose (MS) zeigte die prophylaktische Administration eine protektive Wirkung und machte die Mäuse resistent gegenüber der Induktion einer MS¹⁰⁹.

4.1.1 Blockade der IL-10 Rezeptor Signalkaskade

Die Hypothese, dass IL-10 als anti-inflammatorisches Zytokin maßgeblich an der immunsupprimierenden Wirkung von Tregs beteiligt ist, konnte im NTN Modell bereits bestätigt werden⁷⁴. Somit sollte in Treg-depletierten DEREK Mäusen das mRNA Level von *Il10* geringer sein als in wt Mäusen. Die quantitative Analyse der mRNA in der Niere nach der späten Depletion der Tregs zeigte allerdings in der vorliegenden Arbeit keinen Unterschied zwischen DEREK und wt Mäusen. Ein möglicher Grund für das Fehlen einer Senkung wäre, dass durch den Ausgleich der Foxp3⁺GFP⁻ Zellen nach zweiwöchiger Depletion sich auch das IL-10 Niveau wieder angeglichen hat. Eine weitere Erklärung wäre aber auch, dass IL-10 zwar essentiell in der Immunsuppression im EAG Modell ist, aber nicht Tregs die entscheidende Quelle für dieses Zytokin darstellen. Interleukin-10 wird ebenfalls von einer Reihe anderer Immunzellen sekretiert, beispielsweise Monozyten⁸⁶. Um die Rolle von IL-10 im späten Verlauf der EAG zu untersuchen, wurde der IL-10 Rezeptor durch einen neutralisierenden Antikörper blockiert. Dazu wurden Mäuse viermal mit h- α 3(IV)NC1 immunisiert, ab Woche 7 mit einem anti-IL-10R Antikörper behandelt und in Woche 10 für die weitere Organanalyse getötet. Über den gesamten Versuchszeitraum konnte kein Unterschied im Allgemeinzustand der Tiere, im Ausmaß der Proteinurie und im Titer der für m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörper festgestellt werden. Auch die finale Blutuntersuchung und Bestimmung der BUN-Werte ergab keine eindeutigen Veränderungen durch die anti-IL-10R Antikörperbehandlung. FACS-Analysen und quantitative mRNA Bestimmungen mittels qPCR konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Akkumulation von T-Zellen und Makrophagen in Niere und Milz zeigen. Lediglich eine signifikant höhere Frequenz an CD154⁺TNF- α ⁺ CD4 T-Zellen konnte nach einer Stimulation von Milzzellen mit h- α 3(IV)NC1 nachgewiesen werden. Zusammen deuten die erhobenen Ergebnisse eher auf eine untergeordnete Rolle des Interleukin-10 in der entzündeten Niere im EAG Modell hin. Dagegen sprechen aber die

Studien von Ostmann *et al.*, die demonstrieren, dass im NTN Modell gerade IL-10, welches von Tregs sekretiert wird, entscheidend an der Limitierung des renalen Gewebeschadens und an der Inhibierung der CD4 T-Zellantwort beteiligt ist⁷⁴. Auch der bereits diskutierte Faktor des definierten, relativ frühen Analysezeitpunktes in diesem experimentellen Ansatz würde das Ausbleiben eines deutlicheren Phänotyps nach der Blockade des IL-10R Signalweges erklären.

Tregs exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine Reihe ko-inhibitorischer Moleküle, wie PD-1, CTLA-4 LAG-3 oder TIGIT, über die sie die Aktivierung von T-Zellen, Th1- und Th17-Immunantworten oder auch die Aktivierung von dendritischen Zellen inhibieren können¹¹⁰⁻¹¹². Auch die Sezernierung von TGF- β und die Umwandlung von ATP in Adenosin wirken immunsuppressiv. Im Zusammenhang mit der Inhibierung von autoimmunen Nierenerkrankungen konnte 2007 bereits ein regulatorischer Mechanismus für PD-1 und die dazugehörigen Liganden PD-L1 und PD-L2 im NTN Modell gezeigt werden¹¹³. Durch den Einsatz von *knockout*-Mäusen für die verschiedenen ko-inhibitorischen Moleküle oder die Verwendung blockierender Antikörper könnte die Frage, welche regulatorischen Mechanismen von Tregs möglicherweise eine entscheidende Rolle im Verlauf der EAG spielen, weiter untersucht werden.

4.2 Die Rolle der regulatorischen T-Zellen in der frühen Phase der EAG

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle der Tregs und ihre inhibitorische Wirkung auf die frühe Immunantwort in der EAG untersucht. Zu Beginn einer Antikörper-abhängigen Erkrankung spielen Th-Zellen früh beim Klassenwechsel von IgM zu IgG eine Rolle. Eine B-Zelle, die auf ihr Antigen trifft, prozessiert dieses und präsentiert es mittels MHCII auf ihrer Oberfläche. Damit die B-Zelle weiter reift bedarf es bestimmter Signale von Th-Zellen, die den MHCII:Antigen Komplex erkennen und über ko-stimulatorische Moleküle die B-Zelle zur Reifung anregen^{114,115}. Tregs könnten in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber dem rekombinanten $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ spielen und die Aktivierung sowohl der T-Zellen als auch der B-Zellen inhibieren. Dieser mögliche Mechanismus sollte wie im ersten Teil der vorliegenden Arbeit mittels des DEREK Modells von Lahl *et al.* untersucht werden⁷⁶. Die bereits diskutierte Problematik der Foxp3⁺GFP⁻ Tregs in diesem Modell sollte kein Hindernis darstellen, da die Tregs nicht über einen längeren Zeitraum

Diskussion

anhaltend depletiert wurden. DEREg und wt Mäusen wurde lediglich vor Beginn der EAG-Induktion sowie vor jeder verstärkenden Immunisierung einmalig DT injiziert und der Verlauf der EAG anhand der bekannten Parameter analysiert.

Alle Mäuse entwickelten über den Versuchszeitraum hin hohe Titer an m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern und eine starke Proteinurie, jedoch unterschieden sich die Treg-depletierten DEREg signifikant von den wt Tieren in beiden Parametern. Bereits in Woche 4 zeigten DEREg Mäuse deutlich höhere Titer an m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern und dieser Unterschied konnte ebenfalls im EAG Endstadium beobachtet werden. Außerdem entwickelten DEREg Mäuse früher eine Proteinurie und zeigten in Woche 6 sogar einen signifikant höheren Verlust an Albumin über den Urin als wt Tiere. Das Fehlen der regulatorischen Mechanismen durch Tregs scheint also einen direkten Einfluss auf die Reifung von α 3(IV)NC1-spezifischen B-Zellen zu haben, da B-Zellen in der Lage sind ohne die Hilfe von T-Zellen ein nephrotisches Syndrom zu induzieren. Lim *et al.* konnten 2005 erstmals zeigen, dass sich Foxp3⁺ Tregs im Lymphgewebe zwar hauptsächlich in der T-Zell-Zone aufhalten, aber auch im Grenzbereich zur B-Zell-Zone, in der Mantelzone sowie in den Keimzentren der Lymphfollikel zu finden sind. Des Weiteren konnten sie den direkten Kontakt von Tregs mit B-Zellen zeigen und damit die T-Zell-unabhängige Inhibition der IgG-Produktion und des Immunglobulin-Klassenwechsels¹¹⁶. Dieser Mechanismus wurde ein paar Jahre später auch in einer Antikörper-medierten Autoimmunerkrankung bestätigt. Iikuni *et al.* gelang der Beweis, dass Tregs in einem Modell für systemischen Lupus erythemathodes (SLE) direkt die Autoantikörperproduktion der B-Zellen beeinflussen und supprimieren können¹¹⁷. Die in unserer Studie präsentierten höheren Titer an m- α 3(IV)NC1-spezifischen Antikörpern und das frühere Eintreten der Proteinurie deuten auf einen ähnlichen Mechanismus hin und stehen somit im Einklang mit den bisher publizierten Ergebnissen. Regulatorische T-Zellen scheinen auch hier einen Einfluss auf die periphere B-Zell-Toleranz zu haben. Im Verlauf der EAG entwickeln wt Mäuse vor allem α 3(IV)NC1-Antikörper des Subtyps IgG1, aber auch IgG2a und IgG2b können detektiert werden²⁴. Interessant wäre es daher noch zu untersuchen, ob das Fehlen der Tregs während der Immunisierung im EAG Modell die Verteilung der IgG-Subtypen verändert. In humanen Studien konnte das Vorhandensein von natürlichen Antikörpern gegen die GBM gezeigt werden. Diese Antikörper unterschieden sich allerdings deutlich im Titer, in den IgG-Subtypen und in ihrer

Diskussion

Avidität von denen, die in Patienten mit anti-GBM-GN detektiert werden können⁹⁶. Im Patienten konnte eine Korrelation zwischen dem Subtyp, der Proteinurie und der Krankheitsprogression gefunden werden⁵. Auch der Titer an $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Antikörpern zum Zeitpunkt der Diagnose korreliert mit der Prognose und dem renalen Gewebeschaden¹¹⁸. Ein besseres Verständnis wie es B-Zellen gelingt die Toleranz zu durchbrechen wäre also ein Vorteil in der Krankheitsprävention und nach Ausbruch einer Antikörper-medierten Autoimmunerkrankung könnten diese Erkenntnisse helfen, die Prognose zu verbessern.

Durch die frühe Depletion der Tregs wurde allerdings nicht nur die B-Zell-Reifung beeinflusst, sondern auch die T-Zellantwort zeigte deutliche Unterschiede verglichen mit wt Tieren. Im EAG Endstadium konnte eine signifikant höhere Frequenz an CD4-T-Zellen in der Niere detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Frequenzen in der Milz keine Unterschiede und auch die Tregs in Milz und Niere waren vergleichbar in beiden immunisierten Gruppen. Die Analyse der Makrophagen ergab das genaue Gegenteil. Systemisch waren mehr Makrophagen vorhanden, aber in der entzündeten Niere konnte kein Unterschied festgestellt werden. Betrachtet man die $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische CD4 T-Zellantwort in der Milz wurde in der vorliegenden Arbeit eine Veränderung in der Zytokinproduktion gemessen. DEREK Tiere zeigten eine erhöhte Th1-Immunantwort (IFN- γ Produktion) verglichen mit wt Tieren. Für die Th17-Antwort (IL-17A Produktion) konnte lediglich ein Trend gezeigt werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass ein Fehlen von regulatorischen Mechanismen in der frühen Entstehung der Autoimmunerkrankung direkte Auswirkungen auf die späte T-Zell-Immunantwort hat. Ähnliche Ergebnisse konnten mit DEREK Mäusen im NTN Modell gezeigt werden: In der Niere wurden mehr T-Zellen, mehr Makrophagen, eine höhere Produktion an IFN- γ und kein Unterschied in der IL-17A Produktion detektiert. Dass Tregs in einigen Modellen die Ausschüttung von IFN- γ durch Th-Zellen inhibieren, aber keinen Einfluss auf die IL-17A-Immunantwort haben, zeigten Blutanalysen aus Patienten mit einer aktiven Tuberkulose¹¹⁹. Warum in unserem Modell keine erhöhte Makrophageninfiltration im FACS gemessen wurde bleibt unklar, da Th1-Zellen durch die Produktion von IFN- γ vor allem für die Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen im entzündeten Organ verantwortlich sind.

Zusammengefasst zeigt eine frühe Depletion der Tregs und damit das Ausbleiben der regulatorischen Mechanismen während der Immunisierungen in der EAG, dass die periphere Toleranz deutlich früher durchbrochen wird und dass sich die Auswirkungen

teilweise bis ins finale Krankheitsstadium detektieren lassen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass Tregs sowohl einen Einfluss auf die B-Zellen als auch auf die T-Zellen haben, da für beide Zelltypen gezeigt wurde, dass es natürliche autoreaktive Zellen bzw. Antikörper gibt. Wie es dazu kommt, dass sowohl T- als auch B-Zellen spezifisch für $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ den zentralen Toleranzmechanismen entkommen und in die Peripherie gelangen ist noch unklar. Da die Expression von $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ im humanen Thymus bereits nachgewiesen werden konnte, wäre eigentlich zu erwarten, dass eine zentrale T-Zell-Toleranz entwickelt wird und es nicht zur Entstehung einer autoreaktiven Immunreaktion kommt⁹⁵. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die im Thymus präsentierten Epitope sich von den immunogenen Epitopen, die durch Mausmodelle und Patientenprobenanalysen identifiziert wurden, unterscheiden^{46,120,121}. Für das Myelin-Basische Protein, ein Autoantigen in der Multiplen Sklerose, konnten dieses Phänomen bereits gezeigt werden¹²².

Die genaue Aufklärung des Entkommens von sowohl T- als auch B-Zellen kann wichtige Erkenntnisse über die Pathogenese der anti-GBM-GN liefern.

4.3 Tregs in der anti-GBM-GN – NTN vs. EAG

Studien über Tregs und deren Funktion in einem Modell für anti-GBM-GN beschränken sich bisher auf Analysen nach Induktion der nephrotoxischen Nephritis (NTN Modell) in Mäusen. Wolf *et al.* konnten 2005 in einem Transfermodell zeigen, dass transferierte $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Tregs einen positiven Einfluss auf die Entwicklung der GN hatten, was sich unter anderem in einer deutlich milderen Proteinurie und geringerem renalen Gewebeschaden äußerte¹²³. Die Verwendung von DREG bzw. ähnlich funktionierenden transgenen Mausmodellen ($\text{Foxp3}^{\text{DTR}}$) verdeutlichte im NTN Modell die inhibierende und schützende Rolle von regulatorischen T-Zellen. Sowohl Ooi *et al.* als auch Paust *et al.* demonstrierten, dass nach der Depletion von Tregs die Th1- und Th17-Immunantworten systemisch, aber vor allem auch in der entzündeten Niere verstärkt waren und in einer aggravierten GN resultieren^{72,73}. Bereits 2000 zeigten Kitching *et al.* außerdem, dass $\text{IL-10}^{-/-}$ Mäuse nach der Induktion einer NTN eine deutlich verstärkte Nierenentzündung aufwiesen verglichen mit wt Tieren⁷⁵. Ostmann *et al.* verdeutlichten 2013, dass besonders IL-10, welches von Tregs sezerniert wurde, in der Lage ist das Ausmaß der Erkrankung positiv zu beeinflussen, indem es die Th1- und Th17-Immunantworten inhibiert⁷⁴. Das NTN Modell unterscheidet sich allerdings in drei wesentlichen Punkten von dem in der vorliegenden Arbeit

Diskussion

verwendeten EAG-Modell. Zum einem wird die anti-GBM-GN im NTN Modell durch die Immunisierung mit einem Schafserum gegen nicht näher definierte Nierenstrukturen der Maus induziert. In der EAG wird mit dem rekombinanten $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ immunisiert und die $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische Antikörperantwort muss sich erst entwickeln. Die autoreaktiven Antikörper in beiden Modellen sind also grundlegend verschieden, vor allem in Bezug auf ihre Spezifität. Der zweite Unterschied ergibt sich direkt aus dem unterschiedlichen Induktionsverfahren, da ein gravierender Nierenschaden im NTN Modell deutlich früher eintritt und die Analyse der Organe bereits nach 1-2 Wochen erfolgt. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung dafür sein, dass im NTN Modell bisher keine Probleme bei der Verwendung von DREG Mäusen bekannt sind. Die Depletion erfolgt über einen weitaus kürzeren Zeitraum und die Analyse findet bereits wenige Tage nach dem Beginn der Behandlung mit DT statt^{72,73}. Der dritte Unterschied des NTN Modells gegenüber der EAG ist das Verwenden verschiedener Inzucht-Mausstämme. Im NTN Modell wird überwiegend mit C57BL/6 Mäusen gearbeitet, während für die Induktion der EAG DBA/1 eingesetzt werden, weil nur diese Mäuse alle wichtigen Charakteristika der humanen anti-GBM-GN entwickeln²³. Beide Mausstämme weisen unterschiedliche genetische Hintergründe auf, beispielsweise im MHC-Haplotyp, weshalb experimentelle Ergebnisse durchaus verschieden sein können. Beispielsweise deuten die Arbeiten von Kitching *et al.* eher auf eine protektive Rolle von IFN- γ im Rahmen der Th1-Immunantwort im NTN Modell hin, wohingegen im EAG Modell eine pathologische Wirkung dieses Zytokins gezeigt werden konnte^{35,124}. Alle genannten Unterschiede verdeutlichen, dass genaue Analysen sowohl im NTN Modell als auch im EAG Modell notwendig sind, da Resultate nicht ohne weiteres auf das jeweils andere Modell übertragen werden können. Auch für mögliche humane Studien oder Therapieansätze sollten also unbedingt die Ergebnisse aus beiden Modellen in Betracht gezogen werden.

5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen in der EAG sowohl bei der Krankheitsentstehung durch die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranzmechanismen eine wichtige Rolle spielen als auch vermutlich in der Übergangsphase zwischen dem nephrotischen Syndrom und der nekrotisierenden Glomerulonephritis für die Inhibition der pathologischen Th-1 und Th-17-Immunantworten verantwortlich sind.

Die weitere Charakterisierung der Tregs und ihrer Rolle vor und während des peripheren Toleranzverlustes kann essentielle Hinweise zur Aufklärung bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen liefern und möglicherweise bei der Entwicklung prophylaktischer Strategien für die Prävention solcher Erkrankungen helfen.

Patienten mit anti-GBM-GN befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnose in den meisten Fällen bereits im nephritischen Stadium, d.h. sie sind auf eine Plasmapherese und starke immunsuppressive Medikamente angewiesen. Diese Therapie ist, auch auf Grund der vielen unerwünschten Nebenwirkungen der Medikamente, eine enorme Belastung für den Patienten, daher wären neue Ansätze zur langfristigen Behandlung der anti-GBM-GN bzw. auch anderer Autoimmunerkrankungen in einem fortgeschrittenen Stadium wünschenswert. Tregs stellen hierbei eine attraktive immunotherapeutische Strategie dar. Im Tiermodell wurde bereits demonstriert, dass Tregs für die Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen geeignet sind. Die Übertragung dieser Ansätze auf den Menschen ist in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus gerückt¹²⁵⁻¹²⁷. Bisher beinhaltet eine Treg-basierte Therapie die *ex vivo* Expansion autologer oder Spender-Tregs mit anti-CD3 und anti-CD28 *microbeads* in Gegenwart von Interleukin-2 und die anschließende Transplantation der Tregs in den Empfänger. Unter Anderem konnten so erfolgreich Patienten mit *graft versus host disease* behandelt werden¹²⁸. Auch die Behandlung von Kindern, die an Diabetes Typ I erkrankt waren, war erfolgreich. Die Kinder zeigten eine deutlich verlängerte Remission¹²⁹. Neben der *ex vivo* Expansion könnten aber auch *in vivo* Manipulationen mehr und mehr eine Rolle spielen. Beispielsweise durch die Behandlung mit einem IL-2:anti-IL-2 AK Komplex¹⁰⁹. Daten, die durch die Anwendung von autoimmunen Tiermodellen wie der EAG erhoben werden, können somit den Grundstein in der Entwicklung neuer Therapieansätze darstellen.

6 Material und Methoden

6.1 Materialien

6.1.1 Geräte

Alle Experimente wurden mit Standardlaborgeräten durchgeführt. Spezialgeräte werden nachfolgend aufgelistet.

Tabelle 1 Liste verwendeter Spezialgeräte

Gerät	Hersteller
Countess™ Automated Cell Counter	Invitrogen, Carlsbad, USA
FACS CantoII	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Viktor ³ Multilabel Reader	Perkin Elmer, Inc., Waltham, USA

6.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Standardchemikalien zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurden von Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) bezogen. Chemikalien für spezielle Anwendungen sind im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 2 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Anti-FLAG® M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
BD FACS™ Lysing Solution 10x Konzentrat	BD, Heidelberg, Deutschland
Brefeldin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, 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
FLAG® Peptid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Material und Methoden

Forene® 100% (V/V)	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Formaldehyd, 37% (V/V)	
Freund's inkomplettes Adjuvant (IFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Freund's komplettes Adjuvant (KFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<i>in vivo</i> monoklonaler Antikörper anti-Maus-IL-10R	BioXCell, West Lebanon, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Kollagenase D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, 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
aufgereinigtes Ratten IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA
Multistix® 10 SG	Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland
Slide-A-Lyzer® Dialysekassette	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
SYBR® Green JumpStart™ Taq Ready Mix™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Vivaspin 20	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Material und Methoden

Tabelle 3 Verwendete Puffer und Lösungen und deren chemische Zusammensetzung

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
Antikörper-ELISA Beschichtungspuffer	PBS 0.1 M Natriumhydrogencarbonat
Antikörper-ELISA Verdünnungspuffer	PBS 0.05% (v/v) Tween 20 1% BSA
Antikörper-ELISA Waschpuffer	PBS 0.05% (v/v) Tween 20
Erntemedium	DMEM 21969 50 U Penicillin 50 µg/ml Streptomycin
Erythrozytenlysepuffer pH 7.2	Vollentsalztes H ₂ O (VE H ₂ O) 155 mM Ammoniumchlorid 10 mM Kaliumhydrogencarbonat 100 µM EDTA
RPMI Kompletmedium	RPMI 1640 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
Selektionsmedium	DMEM 21969 10% Fetales Kälberserum 50 U Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 50 µg/ml Gentamycin 1 µg/ml Puromycin

6.1.3 Verbrauchsmaterialien

Die Standardlabormaterialien wurden von den Firmen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland), Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich), Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold, Deutschland), BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) und Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bezogen.

6.1.4 Kits

Alle aufgeführten Kits wurden nach Herstellerangaben eingesetzt, sofern im Methodenteil nicht anders beschrieben.

Tabelle 4 Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mouse Albumin ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA
Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience, San Diego, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA
ZytoChem Plus AP Polymer Kit	ZYTOMED Systems GmbH, Berlin, Deutschland

6.1.5 Primer

Alle Primer für die quantitative *real time* RT PCR wurden bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) bestellt und mit einer Endkonzentration von 100 nM eingesetzt. Die TaqMan® Genexpressionsassays wurden von der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen.

Tabelle 5 Primer für die quantitative Echtzeit-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' > 3')
18S frw	CAC GGC CGG TAC AGT GAA AC
18S rev	AGA GGA GCG AGC GAC CAA A
Foxp3 frw	CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT
Foxp3 rev	TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG
CCL2 frw	GGC TCA GCC AGA TGC AGT TAA

Material und Methoden

CCL2 rev	CCT ACT CAT TGG GAT CAT CTT GCT
CXCL2 frw	CAC TGC GCC CAG ACA GAA
CXCL2 rev	CAG GGT CAA GGC AAA CTT TTT G
CXCL9 frw	CCC AAG CCC CAA TTG CA
CXCL9 rev	GCA GGT TTG ATC TCC GTT C
iNOS frw	GCT GTT CTC AGC CCA ACA AT
iNOS rev	TTC TGT GCT GTC CCA GTG AG

Tabelle 6 TaqMan® Genexpressionsassays für die quantitative Echtzeit-PCR

Zielgen	Assay ID
IL-17A	Mm00439619_m1
IFN- γ	Mm01168134_m1
IL-10	Mm00439614_m1

6.1.6 Antikörper

Die einzusetzende Menge an Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern für die Durchflusszytomterie wurde durch Titration bestimmt.

Tabelle 7 Antikörper für die Durchflusszytomterie

Antigen	Klon	Fluorochrom	Hersteller
B220	RA3-6B2	PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD11b	M1/70	PE	BioLegend, San Diego, USA
CD11b	M1/70	FITC	BioLegend, San Diego, USA
CD154	MR1	APC	eBioscience, San Diego, USA
CD16/ CD32	2.4G2	-	BioXCell, West Lebanon, USA
CD25	PC61	PE/Cy7	BioLegend, San Diego, USA
CD4	RM4-5	PE/Cy7	BioLegend, San Diego, USA
CD4	RM4-5	V500	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD4	RM4-5	Alexa Fluor® 700	BioLegend, San Diego, USA
CD44	IM7	APC	eBioscience, San Diego, USA
CD45	30-F11	PerCP	BioLegend, San Diego, USA
CD45	30-F11	V450	eBioscience, San Diego, USA
CD62L	MEL-14	PerCP	BioLegend, San Diego, USA
CD8 α	53-6.7	PE/Cy7	BioLegend, San Diego, USA

Material und Methoden

CD8 α	53-6.7	PerCP	BioLegend, San Diego, USA
CD8 α	53-6.7	V450	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
F4/80	BM8	Alexa Fluor® 647	BioLegend, San Diego, USA
Foxp3	FJK-16S	Alexa Fluor® 700	eBioscience, San Diego, USA
Foxp3	FJK-16S	PE	eBioscience, San Diego, USA
Gr-1	RB6-8C5	Pacific Blue™	BioLegend, San Diego, USA
IFN- γ	XMG1.2	V450	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
IL-17A	eBio17B7	PE	eBioscience, San Diego, USA
TNF- α	MP6-XT22	PE/Cy7	eBioscience, San Diego, USA

Tabelle 8 Antikörper für ELISA und Immunhistochemie

Antigen	Wirt	Konjugat	Hersteller
Maus-IgG	Schaf	HRP	Amersham Biosciences, Amersham, USA
Maus-Mac-2	Ratte	-	Cerdatlane, Burlington, USA

6.1.7 Software

Tabelle 9 Verwendete Software

Software	Hersteller
FACSDiva™ Software V.8.0.1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FlowJo V.10.0.8	FlowJo, LLC, Ashland, USA
GraphPad Prism V5.0b	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA

6.1.8 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit der GraphPad Prism Software Version 5.0b durchgeführt. Dabei wurden die Mediane zweier Stichproben in Bezug auf Proteinurie, BUN, Antikörpertiter und histologische Ergebnisse auf Grund der nicht zu erwarteten Normalverteilung der Grundgesamtheiten mit dem *U*-Test von Mann und Whitney analysiert. Bei mehr als zwei Stichproben nicht-normalverteilter Daten wurden der *H*-Test von Kruskal-Wallis mit anschließendem Dunn's Test durchgeführt. Für Zellfrequenzen, sowie mRNA Expressionslevel wurde eine Normalverteilung erwartet und die Mittelwerte zweier Stichproben mit dem unverbundenen *t*-Test analysiert. Bei mehr als zwei Stichproben normalverteilter Daten wurde zunächst eine einfache

Material und Methoden

Varianzanalyse (*one way ANOVA*) durchgeführt und anschließend der Bonferroni Post-hoc Test gewählt.

In der graphischen Darstellung der Ergebnisse sind nur Signifikanzniveaus angegeben mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. Nicht signifikante Unterschiede wurden nicht extra ausgewiesen. Trends wurden mit dem jeweiligen p -Wert der Analyse gekennzeichnet.

6.2 Methoden

6.2.1 Tierexperimentelle Methoden

Alle Mäuse wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) gezüchtet und gehalten. Alle Tierversuche unterlagen den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) und wurden in den Räumlichkeiten der zentralen Versuchstierhaltung durchgeführt. Für die Durchführung des Versuchsvorhabens „Analyse der T-Zellantwort im experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG) Modell der Maus“ wurde eine Genehmigung durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg erteilt. Die Tiere wurden in individuell ventilierten Käfigen bei einem zwölf Stunden Hell-Dunkel-Zyklus gehalten und die Versorgung erfolgte mit Trockenfutter und autoklaviertem Leitungswasser.

6.2.1.1 Mauslinien

Tabelle 10 Verwendete Mauslinien

Mauslinie	Herkunft
DBA/1	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
DBA/1-DEREG	C57BL/6 DEREG wurden von Prof. Dr. Tim Sparwasser ⁷⁶ zur Verfügung gestellt und im Institut mindestens zehn Generationen auf den DBA/1 Hintergrund zurückgekreuzt

6.2.1.2 Induktion der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG)

Für die Induktion der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis (EAG) wurden Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen mit 30 µg rekombinantem humanem (h-)α3(IV)NC1 in 50 µl PBS und äquivalentem Volumen an Komplettem Freund's Adjuvant (KFA) subkutan (s.c.) in den Rücken immunisiert. Nach drei, fünf und sieben Wochen wurde den Mäusen verstärkend 30µg rekombinantes h-α3(IV)NC1 in 50 µl PBS und äquivalentem Volumen an Inkomplettem Freund's Adjuvant (IFA) subkutan in den Rücken gespritzt.

6.2.1.3 Verlaufskontrolle der EAG

Vor Beginn jedes Versuches und zu den im Ergebnisteil beschriebenen Zeitpunkten wurden die Autoantikörpertiter im Plasma und die Albumin-Kreatinin Ratio im Urin

Material und Methoden

bestimmt. Autoantikörper konnten bereits nach 1-2 Wochen im Plasma nachgewiesen werden und eine starke Proteinurie etablierte sich in den Tieren ab Woche 7. Während eines Versuches wurden die Mäuse außerdem nach ihrem Allgemeinzustand beurteilt, siehe Tabelle 11, und mindestens einmal wöchentlich gewogen.

Tabelle 11 Beobachtungskriterien für Mäuse bei denen eine EAG induziert wurde

Beobachtung	Anweisung
Körpergewicht	
• Gewichtsverlust < 5%	a
• Gewichtsverlust > 15%	c
Klinischer Befund (Gewichtszunahme aufgrund von Ödembildung)	
• Gewichtszunahme < 5% innerhalb einer Woche	a
• Gewichtszunahme > 5% innerhalb einer Woche	b
• Gewichtszunahme > 10% innerhalb einer Woche	c
Allgemeinzustand	
• Fell stumpf und ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb, erhöhter Muskeltonus	a
• Fell schmutzig, Körperöffnungen verklebt oder feucht, unnormale Haltung, Augen trüb, erhöhter Muskeltonus	b
• Verkrampfungen, Lähmungen, Maus fühlt sich kalt an	c
Spontanverhalten	
• Ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	a
• Selbstisolation, Lethargie, Verhaltensstereotypien, Koordinationsstörungen	b
• Schmerzlaute beim ergreifen, Selbstamputation (Autoaggression)	c

Anweisungen: a) intensive Beobachtung in kürzeren Abständen, b) tägliche Kontrolle, c) Töten der Tiere

6.2.1.4 Depletion der *Foxp3*⁺ Zellen mittels Diphtherietoxin

DEREG (steht für *depletion of regulatory T cell*) Mäuse exprimieren ein Fusionsprotein bestehend aus dem humanen Diphtherietoxinrezeptor (DTR) und dem *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) unter der Kontrolle des *foxp3* (Forkhead-Box-Protein P3) Promoters ⁷⁶. Diese transgene Maus ermöglicht gleichzeitig die Detektion und die induzierbare Depletion von *Foxp3*⁺ Zellen⁷⁶.

Die Injektion des Diphtherietoxins (DT) erfolgte intraperitoneal (i.p.) zu den im Ergebnisteil beschriebenen Zeitpunkten und mit den dort definierten Konzentrationen.

6.2.2 Zellbiologische Methoden

6.2.2.1 Präparation der Organe

Für die Organanalyse wurden die Mäuse zunächst mit Isofluran betäubt und anschließend die finale Blutentnahme retroorbital durchgeführt. Das Blut wurde in Heparin-beschichteten Reaktionsgefäßen entnommen. Das Töten der betäubten Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation. Vor der Organentnahme wurde über den rechten Herzventrikel mit kaltem PBS perfundiert. Für histologische Untersuchungen wurden die Organe für 24 Stunden in 4% Formaldehyd gelagert, dann dreimal für 30 min mit PBS gewaschen und schließlich in Paraffin eingebettet. Proben für RNA Isolation wurden direkt auf -80 °C gekühlt und bis zur Verwendung eingefroren. Organe, die direkt durchflusszytometrisch untersucht werden sollten, wurden in PBS auf Eis gelagert.

6.2.2.2 Zellisolierung aus murinem Gewebe

Für durchflusszytometrische Analysen wurden zunächst aus den Organen Milz und Niere Einzelzellsuspensionen hergestellt.

Die Milz wurde direkt durch ein 70 µm Zellsieb gedrückt und mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Erythrozytenlyse für 3 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit PBS konnte die Zellzahl bestimmt werden und die Suspension zur *in vitro* Stimulation oder direkt zur Fluoreszenzfärbung eingesetzt werden.

Die Niere wurde zunächst in kleine Stücke geschnitten und anschließend für 45 min bei 37 °C enzymatisch mit 250 µg/ml Kollagenase D und zehn Einheiten/ ml DNase I in RPMI verdaut. Im Anschluss an den Verdau wurde die Niere durch ein 200µm Metallsieb gedrückt und die Suspension mit PBS gewaschen. Um Zelltrümmer aus der Suspension zu entfernen wurden die Zellen nun in 37% Easycoll aufgenommen und 20 min bei 500 x g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die oberste Schicht verworfen und der Rest mit PBS gewaschen. Die Erythrozytenlyse erfolgte wie bei der Milz für 3 min bei Raumtemperatur. Direkt nach der Lyse wurden die Zellen nochmals durch ein 70 µm Zellsieb gegeben und mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschgang konnten die Zellen gezählt und für die Fluoreszenzfärbung eingesetzt werden.

6.2.2.3 *in vitro* Stimulation

Für die *in vitro* Stimulation wurden Milzzellen in 1 ml RPMI Komplettmedium mit 54 µg/ml h-α3(IV)NC1 spezifisch und mit 50 ng/ ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1 µM Ionomycin polyklonal stimuliert. Die Inkubation erfolgte für acht

Stunden bei 37 °C. Nach vier Stunden wurde zu den Stimulationsansätzen 10 µg/ml Brefeldin A gegeben um die Sekretion von Zytokinen zu unterbinden.

6.2.2.4 Extrazelluläre und intrazelluläre Färbung für durchflusszytometrische Analysen

Für die Färbung wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Um unspezifische und falsch-positive Bindungen der Fluoreszenzantikörper zu unterbinden, wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C im Dunkeln mit 0.25 µg anti-CD16/ CD32 Antikörper und 1% normalem Rattenserum inkubiert. Anschließend wurde zu jedem Ansatz der versuchsspezifische Antikörpermix gegeben und weitere 20-30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die einzusetzende Menge an Antikörpern wurde zuvor durch Titration bestimmt. Nach der extrazellulären Färbung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und konnten entweder direkt zur durchflusszytometrischen Messung eingesetzt oder zusätzlich intrazellulär gefärbt werden.

Für die intrazelluläre Färbung von Zytokinen mussten die Zellen zunächst für 20 min in 2% Paraformaldehyd fixiert werden. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte die unspezifische Blockierung der Fcγ Rezeptoren und die Färbung der Zytokine mit Fluoreszenzantikörpern analog zur extrazellulären Färbung. Die Reagenzien wurden in Saponinpuffer verdünnt, da dieser die Zellen permeabilisiert und die Antigene so zugänglich macht. Nach der Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und konnten dann durchflusszytometrisch gemessen werden.

Die intrazelluläre Anfärbung des Transkriptionsfaktors Foxp3 erfolgte mit Hilfe des Kits *Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set* von eBioscience nach Herstellerangaben.

6.2.2.5 Analyse und Auswertung von durchflusszytometrischen Daten

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS von *fluorescence-activated cell sorting*) können einzelne Zellen anhand ihrer Form, Struktur und Färbung (siehe 6.2.2.4) unterschieden und analysiert werden.

Die Eingrenzung verschiedener Zellpopulationen erfolgte zunächst anhand der Größe und der Granularität der Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC von *forward scatter*) stellt dabei ein Maß für die Zelloberfläche bzw. die Zellgröße dar und das Seitwärtsstreulicht (SSC von *side scatter*) verhält sich proportional zur Zellgranularität. Durch Ausschluss der Autofluoreszenz über die Kanäle V510 und V450 konnten lebende Leukozyten über

Material und Methoden

die Anfärbung mit einem anti-CD45 Fluoreszenzantikörper detektiert werden. CD4 T-Zellen wurden dann als CD45⁺CD4⁺, regulatorische T-Zellen als CD45⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, Granulozyten als CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁺ und Makrophagen als CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁻F4/80⁺ definiert. Die erfassten Eigenschaften jeder Zelle wurden in elektronische Signale umgewandelt und als zweidimensionale Punktwolke dargestellt.

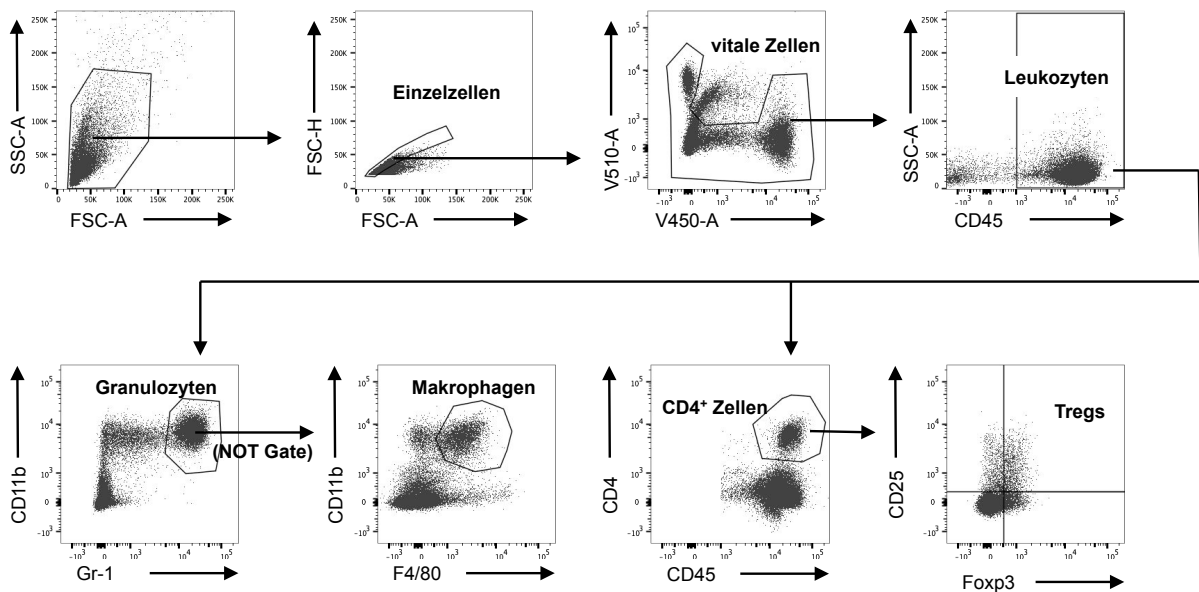


Abbildung 32 | Eingrenzungsstrategie für verschiedene Leukozytenpopulationen in Milz und Niere. Für die Analyse der verschiedenen Leukozytenpopulationen wurden Milz- und Nierenzellen direkt *ex vivo* mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Die Eingrenzung erfolgte zunächst über die Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellen, um Zelltrümmer und Verunreinigungen aus der Analyse auszuschließen. Bei Einzelzellen verhalten sich FSC-H (H=Höhe) und FSC-A (A=Fläche) proportional und durch Ausgrenzung der Autofluoreszenz in den Kanälen V510 und V450 wurden lebende Zellen und über CD45 Leukozyten identifiziert. Granulozyten geben sowohl für CD11b als auch für Gr-1 ein positives Signal. Durch Ausschluss der Granulozyten (NOT Gate) konnte über den zusätzlichen Marker F4/80 die Makrophagenpopulation dargestellt werden. Ausgehend von den Leukozyten konnte über CD4 auf CD4⁺ T-Zellen und weiter auf regulatorische T-Zellen (Tregs; CD25⁺Foxp3⁺) geschlossen werden.

Um nach einer $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen *in vitro* Stimulation die $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen CD4 T-Helferzellpopulationen im FACS zu analysieren wurde die in Abbildung 33 dargestellte Eingrenzungsstrategie verwendet. Wie zuvor beschrieben wurden Einzelzellen zunächst über ihre Eigenschaften bezüglich der Granularität und der Größe eingegrenzt. Anschließend konnten über die Anwendung eines Lebend/ Tot-Farbstoffes im V510 Kanal die vitalen Einzelzellen definiert werden. CD4 T-Zellen zeichneten sich dann über die Markierung mit einem anti-CD4 Fluoreszenz-markierten Antikörper aus und $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischen CD4 T-Zellen wurden über die Anfärbung mit einem anti-CD154 und anti-Zytokin Antikörper eingegrenzt.

Material und Methoden

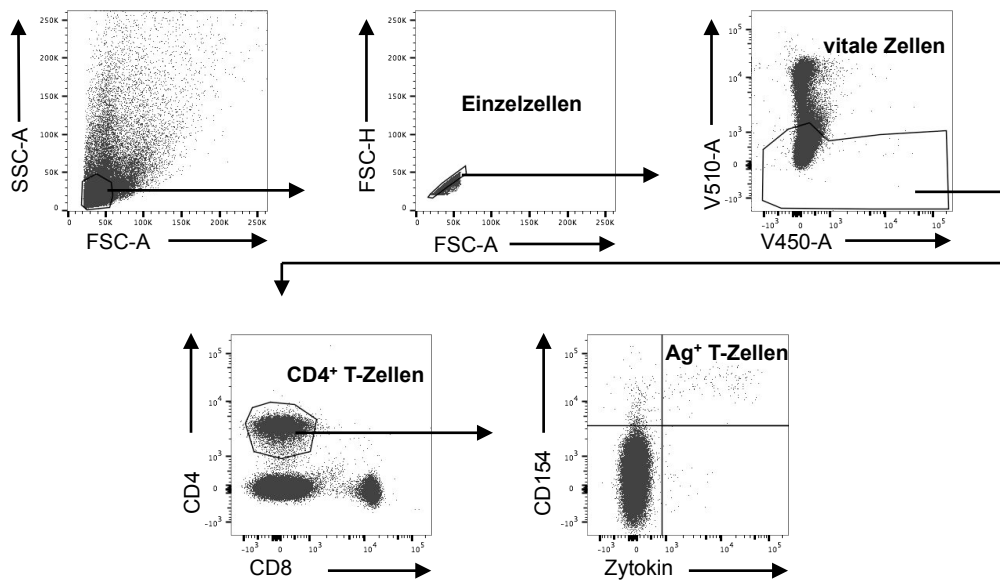


Abbildung 33 | Eingrenzungsstrategie für $\alpha3(IV)NC1$ -spezifische $CD4^+$ T-Zellen. Für die Analyse der $\alpha3(IV)NC1$ -spezifischen T-Zellen wurden Milzzellen für acht Stunden spezifisch mit $54 \mu\text{g/ml}$ h- $\alpha3(IV)NC1$ *in vitro* stimuliert und anschließend im FACS untersucht. Dabei wurde zunächst über die Größe (FSC) und die Granularität (SSC) auf singuläre Zellen eingegrenzt. Tote Zellen wurden dann über einen Lebend/Tot-Farbstoff (V510 Kanal) ausgegrenzt und über den Marker CD4 konnten $CD4^+$ T-Zellen identifiziert werden. $CD154^+$ Zytokin $^+$ Zellen repräsentieren $\alpha3(IV)NC1$ -spezifische T-Helferzellpopulationen. *Ag=Antigen; FACS=fluorescence activated cell sorting*

6.2.2.6 Zellkultur

Stabil transfizierte HEK 293 EBNA Zellen, die das murine oder humane $\alpha3(IV)NC1$ (m- oder h- $\alpha3(IV)NC1$) exprimieren und resistent gegenüber Puromycin sind, wurden von Dr. Helmut Hoyer zur Verfügung gestellt²³. Das rekombinante Protein, bestehend aus der BM40 Sekretionssignalsequenz, einem FLAG-Tag, den letzten zehn Aminosäuren der Kollagendomäne und dem m- oder h- $\alpha3(IV)NC1$ ²³, konnte aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden. Dafür wurden die Zellen in Selektionsmedium bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5\% \text{ CO}_2$ kultiviert bis eine 80-90%ige Konfluenz erreicht wurde. Das Selektionsmedium wurde dann gegen Erntemedium ausgetauscht und der konditionierte Zellkulturüberstand konnte 2-3 Tage später abgenommen und bis zur Aufreinigung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden. Dieser Erntezyklus wurde mehrmals wiederholt.

6.2.3 Proteinbiochemische Methoden

6.2.3.1 Proteinreinigung

Die m- oder h- α 3(IV)NC1 Fusionsproteine wurden aus dem konditioniertem Medium bei 4°C über eine anti-FLAG® M2 Affinitätssäule isoliert und das an die Matrix gebundene Protein konnte mit 0.1 M Glycin von der Säule eluiert und anschließend über Nacht gegen PBS dialysiert werden. Die Einengung der Proben erfolgte mit Vivaspin 20 Säulen auf etwa 1-2 ml und die Proteinkonzentration des aufgereinigten m- oder h- α 3(IV)NC1 wurde mittels BCA Test bestimmt.

Aliquots à 1 ml mit einer Konzentration von 2 mg/ml wurden bei -80 °C gelagert.

6.2.4 Immunologische Methoden

Die Blutentnahme für serologische Untersuchungen während eines Versuches wurde von den Tierpflegerinnen der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Der Urin für die Bestimmung der Albumin/ Kreatinin Ratio als Maß für die Schädigung der Niere wurde über Nacht in metabolischen Käfigen gesammelt. Die Bestimmung der Kreatininkonzentration erfolgte im Institut für Klinische Chemie/ Zentrallaboratorien des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

6.2.4.1 Indirekter Antikörper-ELISA

Zum Nachweis von m- α 3(IV)NC1-spezifischen Autoantikörpern gegen im Blut wurde ein indirekter Antikörper ELISA durchgeführt. Dazu wurden beschichtete 96-well Platten mit 1.35 μ g/ml m- α 3(IV)NC1 in Beschichtungspuffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach drei-maligem Waschen mit Waschpuffer wurden unspezifische Bindungsstellen mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Nach dem Blocken wurden die Platten erneut dreimal gewaschen und dann für 1 Stunde bei 4 °C mit den verdünnten Plasmaproben inkubiert. Die Seren wurden 1:5000 in Verdünnungspuffer mit 5 μ g/ml FLAG® Peptid verdünnt. Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend durch viermaliges Waschen von der Platte entfernt. Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde auf der Platte belassen. Ungebundene Sekundärantikörper wurden erneut durch viermaliges Waschen entfernt und die Entwicklung des ELISAs erfolgte mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB).

6.2.4.2 Albumin-ELISA

Zur Bestimmung der Albuminkonzentration im Urin wurde das *Mouse Albumin ELISA Quantitation Set* von Bethyl Laboratories, Inc., (Montgomery, USA) verwendet. Abweichend von den Herstellerangaben wurde die Platte über Nacht bei 4 °C beschichtet und die Inkubation der Proben auf der Platte erfolgte ebenfalls bei 4 °C. Die Urinproben wurden so verdünnt, dass die gemessene optische Dichte (OD) innerhalb des linearen Kurvenverlaufs der Standardreihe lag.

6.2.5 Histologie

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden längs halbierte Nieren in 4% Formaldehyd über Nacht fixiert und am nächsten Tag dreimal für 30 min mit PBS gewaschen. Die Einbettung erfolgte in Paraffin und wurde von Mariola Reszka aus der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

6.2.5.1 PAS-Reaktion zur histochemischen Untersuchung von Halbmondbildungen, Fibrineinlagerung und Sklerose

Die Untersuchungen und Einschätzungen des renalen Endschadens wurden von dem Nephrologen Dr. Helmut Hoyer im Institut für Pathologie am Universitätsspital Basel durchgeführt. Dazu wurden die in Paraffin eingebetteten Nieren direkt nach der Einbettung in die Schweiz geschickt und dort nach *periodoc acid-Schiff reaction* (PAS-Reaktion) nach den für humane Glomerulonephritiden etablierten Standardmethoden ausgewertet.

6.2.5.2 Mac-2-Färbung zur immunhistochemischen Untersuchung der glomerulären Makrophagen

Für die immunhistochemische Darstellung der intraglomerulären Makrophagen wurden die Nierenschnitte mit einem Mac-2 Antikörper gefärbt. Dazu wurden sie zunächst deparaffiniert und rehydratisiert und anschließend für 15 min bei 90 °C im Dampfgerat gekocht. Unspezifische Bindungen und Hintergrundfärbungen wurden durch die Inkubation mit einem Blockpuffer minimiert. Nach viermaligem Waschen erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers anti-Maus Mac-2 über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper als erstes gründlich von den Schnitten gewaschen und dann wurde für 30 min ein Brückenantikörper anti-Ratte IgG dazugegeben. Nach erneutem Waschen und der Inkubation mit dem

AP-Polymer (AP=alkalische Phosphatase) für 30 min bei Raumtemperatur, konnten die gebundenen Antikörper durch Zugabe von Neufuchsin gefärbt werden. Schlussendlich erfolgte die Kernfärbung mit Hämatoxylin und die Differenzierung der Färbung mit Salzsäure (HCl)-Alkohol.

Blockpuffer, Brückenantikörper und der dazugehörige Verdünnungspuffer, sowie das AP-Polymer entstammen dem ZytoChem Plus AP Polymer Kit von ZYTOMED Systems GmbH (Berlin, Deutschland).

6.2.6 Molekularbiologische Methoden

Für die RNA Analysen aus murinen Nieren wurden während der Organentnahme jedes Versuches kleine Stücke der Niere schockgefroren und bei -80 °C bis zur Isolation der RNA gelagert.

6.2.6.1 RNA Isolation

Für die Isolierung von RNA aus Nierengewebeproben wurde das *NucleoSpin® RNA Kit* von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Konzentration wurde anschließend photometrisch am NanoDrop 2000c von Thermo Fisher Scientific Inc. (Wilmington, USA) bestimmt und die RNA-Proben bei -80 °C gelagert.

6.2.6.2 cDNA Synthese

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte nach Herstellerangaben mittels des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* von Applied Biosystems (Foster City, USA). Für die Synthese wurde das in Tabelle 12 dargestellte PCR-Programm verwendet.

Tabelle 12 cDNA Synthese Programm

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur [°C]	25	37	85	4
Zeit [min]	10:00	120:00	5:00	∞

Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

6.2.6.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die Quantifizierung der mRNA aus Nierenproben wurde die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR angewendet. Dabei wurden pro Reaktion 20 ng cDNA für die Quantifizierung der Zielgene eingesetzt und 0.04 ng cDNA für das Haushaltsgen. Alle Proben wurden jeweils als Triplikat quantifiziert. Sowohl bei der Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR mit *SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix*, also auch mit spezifischen *TaqMan® Genexpressionsassays* wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Das verwendete PCR-Programm entsprach dem Standardprogramm des *StepOnePlus™ Real-time PCR Systems* und ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13 PCR-Programm für die quantitative Echtzeit-PCR

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3*	Schritt 4*
Temperatur [°C]	50	95	95	60
Zeit [min:s]	2:00	10:00	0:15	1:00

*Die Schritte 3 und 4 wurden 40-mal wiederholt.

7 Literaturverzeichnis

1. Kurts, C., Panzer, U., Anders, H.-J. & Rees, A. J. The immune system and kidneydisease: basic concepts and clinicalimplications. *Nature Publishing Group* 1–16 (2013). doi:10.1038/nri3523
2. Goodpasture, E. W. The significance of certain pulmonary lesions in relation to the etiology of influenza. *The American Journal of the Medical Sciences* (1919).
3. Pedchenko, V. *et al.* Molecular Architecture of the Goodpasture Autoantigen in Anti-GBM Nephritis. *new England Journal of Medicine* **363**, 343–354 (2010).
4. Hudson, B. G. & Tryggvason, K. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. ... *England Journal of ...* **348**, 2543–2556 (2003).
5. Zhao, J., Yan, Y., Cui, Z., Yang, R. & Zhao, M.-H. The immunoglobulin G subclass distribution of anti-GBM autoantibodies against rHalpha3(IV)NC1 is associated with disease severity. *Hum. Immunol.* **70**, 425–429 (2009).
6. Ooi, J. D., Phoon, R. K. S., Holdsworth, S. R. & Kitching, A. R. IL-23, not IL-12, Directs Autoimmunity to the Goodpasture Antigen. *Journal of the American Society of Nephrology* **20**, 925–927 (2009).
7. Peto, P. & Salama, A. D. Update on antiglomerular basement membrane disease. *Curr Opin Rheumatol* **23**, 32–37 (2011).
8. Phelps, R. G. & Rees, A. J. The HLA complex in Goodpasture's disease: A model for analyzing susceptibility to autoimmunity. *Kidney Int* **56**, 1638–1653 (1999).
9. Lockwood, C. M., Pearson, T. A., Rees, A. J. & Evans, D. J. Immunosuppression and plasma-exchange in the treatment of Goodpasture's syndrome. *The Lancet* (1976). doi:10.1016/S0140-6736(76)93089-0
10. Lahmer, T. & Heemann, U. Autoimmunity Reviews. *Autoimmunity Reviews* **12**, 169–173 (2012).
11. Greco, A. *et al.* Goodpasture's syndrome: A clinical update. *Autoimmunity Reviews* (2014). doi:10.1016/j.autrev.2014.11.006
12. Miner, J. H. Renal basement membrane components. *Kidney Int* **56**, 2016–2024 (1999).
13. Wieslander, J. *et al.* Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: localization to noncollagenous regions of type IV collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 3838–3842 (1984).

Literaturverzeichnis

14. Butkowski, R. J., Langeveld, J. P., Wieslander, J., Hamilton, J. & Hudson, B. G. Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.* **262**, 7874–7877 (1987).
15. Wieslander, J., Kataja, M. & Hudson, B. G. Characterization of the human Goodpasture antigen. *Clinical & Experimental Immunology* **69**, 332–340 (1987).
16. Saus, J., Wieslander, J., Langeveld, J. P., Quinones, S. & Hudson, B. G. Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV. *J. Biol. Chem.* **263**, 13374–13380 (1988).
17. Netzer, K. O. *et al.* The goodpasture autoantigen. Mapping the major conformational epitope(s) of alpha3(IV) collagen to residues 17-31 and 127-141 of the NC1 domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 11267–11274 (1999).
18. Vanacore, R. *et al.* A sulfilimine bond identified in collagen IV. *Science* **325**, 1230–1234 (2009).
19. Cui, Z. & Zhao, M.-H. Advances in human antiglomerular basement membrane disease. *Nature Reviews Nephrology* **7**, 697–705 (2011).
20. Steblay, R. W. Glomerulonephritis Induced in Sheep by Injections of Heterologous Glomerular Basement Membrane and Freund's Complete Adjuvant. *J. Exp. Med.* **116**, 253–& (1962).
21. Sado, Y. *et al.* Induction of anti-GBM nephritis in rats by recombinant α 3(IV)NC1 and α 4(IV)NC1 of type IV collagen. *Kidney Int* **53**, 664–671 (1998).
22. Ryan, J. J., Reynolds, J., Norgan, V. A. & Pusey, C. D. Expression and characterization of recombinant rat alpha 3(IV)NC1 and its use in induction of experimental autoimmune glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **16**, 253–261 (2001).
23. 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* **17**, 860–868 (2003).
24. Hopfer, H. *et al.* Characterization of the renal CD4+ T-cell response in experimental autoimmune glomerulonephritis. *Kidney Int* **82**, 60–71 (2012).
25. 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).
26. Gill, J. *et al.* Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev* **195**, 28–50 (2003).

Literaturverzeichnis

27. 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).
28. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* **133**, 775–787 (2008).
29. Gregersen, P. K. & Behrens, T. W. Genetics of autoimmune diseases — disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet* **7**, 917–928 (2006).
30. Zhu, J. & Paul, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**, 1557–1569 (2008).
31. Turner, J.-E., Paust, H.-J., Steinmetz, O. M. & Panzer, U. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int* **77**, 1070–1075 (2010).
32. Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N. & Mills, K. H. G. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical & Experimental Immunology* **162**, 1–11 (2010).
33. Monney, L. *et al.* Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**, 536–541 (2002).
34. Komiyama, Y. *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* **177**, 566–573 (2006).
35. Hünemörder, S. *et al.* TH1 and TH17 cells promote crescent formation in experimental autoimmune glomerulonephritis. *J. Pathol.* **237**, 62–71 (2015).
36. Dixon, F. J. What Are Sensitized Cells Doing in Glomerulonephritis? *new England Journal of Medicine* **283**, 536–537 (1970).
37. Rocklin, R. E., Lewis, E. J. & David, J. R. In Vitro Evidence for Cellular Hypersensitivity to Glomerular-Basement-Membrane Antigens in Human Glomerulonephritis. *new England Journal of Medicine* **283**, 497–501 (1970).
38. Bolton, W. K. What sensitized cells just might be doing in glomerulonephritis. *Journal of Clinical Investigation* **109**, 713–714 (2002).
39. Couser, W. G. Sensitized cells come of age: A new era in renal immunology with important therapeutic implications. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 664–665 (1999).
40. Wu, J., Hicks, J., Borillo, J., Glass, W. F. & Lou, Y.-H. CD4(+) T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis. *Journal of Clinical Investigation* **109**, 517–524 (2002).
41. Reynolds, J., Khan, S. B., Allen, A. R., Benjamin, C. D. & Pusey, C. D. Blockade of the CD154-CD40 costimulatory pathway prevents the development of experimental

- autoimmune glomerulonephritis. *Kidney Int* **66**, 1444–1452 (2004).
42. Reynolds, J. *et al.* CD28-B7 blockade prevents the development of experimental autoimmune glomerulonephritis. *Journal of Clinical Investigation* **105**, 643–651 (2000).
 43. Nishikawa, K. *et al.* Effect of CTLA-4 chimeric protein on rat autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* **24**, 1249–1254 (1994).
 44. Zou, J. *et al.* Healthy Individuals Have Goodpasture Autoantigen-Reactive T Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 396–404 (2008).
 45. Cairns, L. S. The Fine Specificity and Cytokine Profile of T-Helper Cells Responsive to the 3 Chain of Type IV Collagen in Goodpasture's Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **14**, 2801–2812 (2003).
 46. Ooi, J. D. *et al.* The HLA-DRB1*15:01-restricted Goodpasture's T cell epitope induces GN. *Journal of the American Society of Nephrology* **24**, 419–431 (2013).
 47. Kalluri, R., Danoff, T. M., Okada, H. & Neilson, E. G. Susceptibility to anti-glomerular basement membrane disease and Goodpasture syndrome is linked to MHC class II genes and the emergence of T cell-mediated immunity in mice. *Journal of Clinical Investigation* **100**, 2263 (1997).
 48. Gershon, R. K. & Kondo, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* **18**, 723–737 (1970).
 49. Nishizuka, Y. & Sakakura, T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* **166**, 753–755 (1969).
 50. Penhale, W. J., Farmer, A., McKenna, R. P. & Irvine, W. J. Spontaneous Thyroiditis in Thymectomized and Irradiated Wistar Rats. *Clinical & Experimental Immunology* **15**, 225–236 (1973).
 51. Sakaguchi, S., Takahashi, T. & Nishizuka, Y. Study on Cellular Events in Post-Thymectomy Autoimmune Oophoritis in Mice .2. Requirement of Lyt-1 Cells in Normal Female Mice for the Prevention of Oophoritis. *J. Exp. Med.* **156**, 1577–1586 (1982).
 52. Penhale, W. J., Irvine, W. J., Inglis, J. R. & Farmer, A. Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. *Clinical & Experimental Immunology* **25**, 6–16 (1976).
 53. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains

- (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology* **155**, 1151–1164 (1995).
54. Willerford, D. M. *et al.* Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* **3**, 521–530 (1995).
55. Brunkow, M. E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics* **27**, 68–73 (2001).
56. Bennett, C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics* **27**, 20–21 (2001).
57. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330–336 (2003).
58. Itoh, M. *et al.* Thymus and Autoimmunity: Production of CD25+CD4+ Naturally Anergic and Suppressive T Cells as a Key Function of the Thymus in Maintaining Immunologic Self-Tolerance. *The Journal of Immunology* **162**, 5317–5326 (1999).
59. Kuniyasu, Y. *et al.* Naturally anergic and suppressive CD25+CD4+ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int. Immunol.* **12**, 1145–1155 (2000).
60. Fontenot, J. D. *et al.* Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity* **22**, 329–341 (2005).
61. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–1886 (2003).
62. Mucida, D. Reciprocal TH17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Science* **317**, 251–256 (2007).
63. Benson, M. J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M. & Noelle, R. J. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J. Exp. Med.* **204**, 1765–1774 (2007).
64. Sun, C. M. *et al.* Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* **204**, 1775–1785 (2007).
65. Coombes, J. L. *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- and retinoic acid dependent mechanism. *J. Exp. Med.* **204**, 1757–1764 (2007).

Literaturverzeichnis

66. Corthay, A. How do Regulatory T Cells Work? *Scandinavian Journal of Immunology* **70**, 326–336 (2009).
67. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nature Publishing Group* **8**, 523–532 (2008).
68. Costantino, C. M., Baecher-Allan, C. & Hafler, D. A. Multiple Sclerosis and Regulatory T Cells. *J Clin Immunol* **28**, 697–706 (2008).
69. Notley, C. A. & Ehrenstein, M. R. The yin and yang of regulatory T cells and inflammation in RA. *Nat Rev Rheumatol* **6**, 572–577 (2010).
70. Tang, Q. Z. *et al.* In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* **199**, 1455–1465 (2004).
71. Paust, S. & Cantor, H. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev* **204**, 195–207 (2005).
72. Paust, H.-J. *et al.* Regulatory T cells control the Th1 immune response in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* **80**, 154–164 (2011).
73. Ooi, J. D. *et al.* Endogenous foxp3(+) T-regulatory cells suppress anti-glomerular basement membrane nephritis. *Kidney Int* **79**, 977–986 (2011).
74. Ostmann, A. *et al.* Regulatory T cell-derived IL-10 ameliorates crescentic GN. *Journal of the American Society of Nephrology* **24**, 930–942 (2013).
75. Kitching, A. R., Tipping, P. G., Timoshanko, J. R. & Holdsworth, S. R. Endogenous interleukin-10 regulates Th1 responses that induce crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* **57**, 518–525 (2000).
76. Lahl, K. *et al.* Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* **204**, 57–63 (2007).
77. Lacotte, S., Brun, S., Muller, S. & Dumortier, H. CXCR3, Inflammation, and Autoimmune Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1173**, 310–317 (2009).
78. Lasagni, L. *et al.* An Alternatively Spliced Variant of CXCR3 Mediates the Inhibition of Endothelial Cell Growth Induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and Acts as Functional Receptor for Platelet Factor 4. *J. Exp. Med.* **197**, 1537–1549 (2003).
79. Sierra-Filardi, E. *et al.* CCL2 Shapes Macrophage Polarization by GM-CSF and M-CSF: Identification of CCL2/CCR2-Dependent Gene Expression Profile. *The Journal of Immunology* **192**, 3858–3867 (2014).
80. HO, M. K. & SPRINGER, T. A. Mac-2, a Novel 32,000 Mr Mouse Macrophage Subpopulation-Specific Antigen Defined by Monoclonal-Antibodies. *The Journal of*

- Immunology* **128**, 1221–1228 (1982).
81. DING, L., Linsley, P. S., HUANG, L. Y., GERMAIN, R. N. & Shevach, E. M. IL-10 Inhibits Macrophage Costimulatory Activity by Selectively Inhibiting the Up-Regulation of B7 Expression. *The Journal of Immunology* **151**, 1224–1234 (1993).
 82. Moore, K. W., O'Garra, A. & Malefyt, R. W. Interleukin-10. *Annual review of ...* (1993).
 83. Koppelman, B., Neefjes, J. J., de Vries, J. E. & Malefyt, R. D. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alpha beta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* **7**, 861–871 (1997).
 84. Trinchieri, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* (1995).
 85. Moore, K. W. & de Waal Malefyt, R. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of ...* **19**, 683–765 (2001).
 86. Mosser, D. M. & Zhang, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* **226**, 205–218 (2008).
 87. KUHN, R., LOHLER, J., RENNICK, D., RAJEWSKY, K. & MULLER, W. Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. *Cell* **75**, 263–274 (1993).
 88. Bettelli, E. *et al.* IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *The Journal of Immunology* **161**, 3299–3306 (1998).
 89. Castro, A. G. *et al.* Anti-interleukin 10 receptor monoclonal antibody is an adjuvant for T helper cell type 1 responses to soluble antigen only in the presence of lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **192**, 1529–1534 (2000).
 90. Hart, K. M., Byrne, K. T., Molloy, M. J., Usherwood, E. M. & Berwin, B. IL-10 immunomodulation of myeloid cells regulates a murine model of ovarian cancer. *Front Immunol* **2**, 29 (2011).
 91. Jones, M. *et al.* IL-10 Restricts Memory T Cell Inflation during Cytomegalovirus Infection. *The Journal of Immunology* **185**, 3583–3592 (2010).
 92. Pitt, J. M. *et al.* Blockade of IL-10 signaling during bacillus Calmette-Guérin vaccination enhances and sustains Th1, Th17, and innate lymphoid IFN- γ and IL-17 responses and increases protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* **189**, 4079–4087 (2012).
 93. Frentsch, M. *et al.* Direct access to CD4⁺ T cells specific for defined antigens

- according to CD154 expression. *Nat Med* **11**, 1118–1124 (2005).
94. Wong, D., Phelps, R. G. & Turner, A. N. The Goodpasture antigen is expressed in the human thymus. 1–7 (2001). doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00014.x
 95. Salama, A. D. *et al.* In Goodpasture's disease, CD4(+) T cells escape thymic deletion and are reactive with the autoantigen alpha3(IV)NC1. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 1908–1915 (2001).
 96. Cui, Z., Wang, H. Y. & Zhao, M. H. Natural autoantibodies against glomerular basement membrane exist in normal human sera. *Kidney Int* **69**, 894–899 (2006).
 97. Ma, H., Sandor, D. G. & Beck, L. H. The role of complement in membranous nephropathy. *Seminars in Nephrology* **33**, 531–542 (2013).
 98. Borza, D.-B., Zhang, J.-J., Beck, L. H., Meyer-Schwesinger, C. & Luo, W. Mouse models of membranous nephropathy: the road less travelled by. *Am J Clin Exp Immunol* **2**, 135–145 (2013).
 99. Mayer, C. T. *et al.* Few Foxp3 +regulatory T cells are sufficient to protect adult mice from lethal autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2990–3002 (2014).
 100. Rausch, S. *et al.* Establishment of nematode infection despite increased Th2 responses and immunopathology after selective depletion of Foxp3 +cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 3066–3077 (2009).
 101. Berod, L. *et al.* Rapid Rebound of the Treg Compartment in DEREK Mice Limits the Impact of Treg Depletion on Mycobacterial Burden, but Prevents Autoimmunity. *PLoS ONE* **9**, e102804 (2014).
 102. Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* **6**, 1142–1151 (2005).
 103. D'Cruz, L. M. & Klein, L. Development and function of agonist-induced CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* **6**, 1152–1159 (2005).
 104. Murakami, M., Sakamoto, A., Bender, J., Kappler, J. & Marrack, P. CD25+CD4+T cells contribute to the control of memory CD8+T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8832–8837 (2002).
 105. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. & Sakaguchi, S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* **201**, 723–735 (2005).

Literaturverzeichnis

106. Setiady, Y. Y., Coccia, J. A. & Park, P. U. In vivo depletion of CD4+ FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγRIII+ phagocytes. *European journal of ...* (2010). doi:10.1002/eji.200939613/pdf
107. Boyman, O. Selective Stimulation of T Cell Subsets with Antibody-Cytokine Immune Complexes. *Science* **311**, 1924–1927 (2006).
108. Wilson, M. S. *et al.* Suppression of Murine Allergic Airway Disease by IL-2:Anti-IL-2 Monoclonal Antibody-Induced Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* **181**, 6942–6954 (2008).
109. 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. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 751–760 (2009).
110. Joller, N. *et al.* Treg Cells Expressing the Coinhibitory Molecule TIGIT Selectively Inhibit Proinflammatory Th1 and Th17 Cell Responses. *Immunity* **40**, 569–581 (2014).
111. Knickelbein, J. E. *et al.* Noncytotoxic Lytic Granule-Mediated CD8+ T Cell Inhibition of HSV-1 Reactivation from Neuronal Latency. *Science* **322**, 268–271 (2008).
112. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* **13**, 227–242 (2013).
113. Menke, J. *et al.* Programmed death 1 ligand (PD-L) 1 and PD-L2 limit autoimmune kidney disease: distinct roles. *The Journal of Immunology* **179**, 7466–7477 (2007).
114. Stavnezer, J., Guikema, J. E. J. & Schrader, C. E. Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 261–292 (2008).
115. Moens, L. & Tangye, S. G. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front Immunol* **5**, 1–13 (2014).
116. Lim, H. W., Hillsamer, P., Banham, A. H. & Kim, C. H. Cutting Edge: Direct Suppression of B Cells by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* **175**, 4180–4183 (2005).
117. Iikuni, N., Lourenco, E. V., Hahn, B. H. & La Cava, A. Cutting Edge: Regulatory T Cells Directly Suppress B Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* **183**, 1518–1522 (2009).
118. Yang, R. *et al.* Levels of epitope-specific autoantibodies correlate with renal

- damage in anti-GBM disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**, 1838–1844 (2009).
119. Marin, N. D. *et al.* Regulatory T cell frequency and modulation of IFN-gamma and IL-17 in active and latent tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **90**, 252–261 (2010).
120. Jia, X.-Y., Cui, Z., Li, J.-N., Hu, S.-Y. & Zhao, M.-H. Identification of Critical Residues of Linear B Cell Epitope on Goodpasture Autoantigen. *PLoS ONE* **10**, e0123277 (2015).
121. Hopfer, H. *et al.* Glomerulopathy Induced by Immunization with a Peptide Derived from the Goodpasture Antigen α 3IV-NC1. *The Journal of Immunology* (2015). doi:10.4049/jimmunol.1401267
122. Goverman, J. M. Immune tolerance in multiple sclerosis. *Immunol Rev* **241**, 228–240 (2011).
123. Wolf, D. CD4+CD25+ Regulatory T Cells Inhibit Experimental Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis in Mice. *Journal of the American Society of Nephrology* **16**, 1360–1370 (2005).
124. Kitching, A. R. Experimental Autoimmune Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis: A Protective Role for IFN. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1764–1774 (2004).
125. Singer, B. D., King, L. S. & D'Alessio, F. R. Regulatory T cells as immunotherapy. *Front Immunol* (2014).
126. Boehmer, von, H. & Daniel, C. Therapeutic opportunities for manipulating TReg cells in autoimmunity and cancer. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 51–63 (2012).
127. Lan, Q. *et al.* Induced Foxp3(+) regulatory T cells: a potential new weapon to treat autoimmune and inflammatory diseases? *J Mol Cell Biol* **4**, 22–28 (2012).
128. Trzonkowski, P. *et al.* First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127– T regulatory cells. *Clinical Immunology* **133**, 22–26 (2009).
129. Marek-Trzonkowska, N. *et al.* Administration of CD4+CD25highCD127– regulatory T cells preserves β -cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* **35**, 1817–1820 (2012).

8 Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Liste verwendeter Spezialgeräte.....	55
Tabelle 2 Verwendete Chemikalien.....	55
Tabelle 3 Verwendete Puffer und Lösungen und deren chemische Zusammensetzung ..	57
Tabelle 4 Verwendete Kits	58
Tabelle 5 Primer für die quantitative Echtzeit-PCR.....	58
Tabelle 6 TaqMan® Genexpressionsassays für die quantitative Echtzeit-PCR.....	59
Tabelle 7 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	59
Tabelle 8 Antikörper für ELISA und Immunhistochemie	60
Tabelle 9 Verwendete Software.....	60
Tabelle 10 Verwendete Mauslinien.....	62
Tabelle 11 Beobachtungskriterien für Mäuse bei denen eine EAG induziert wurde	63
Tabelle 12 cDNA Synthese Programm	70
Tabelle 13 PCR-Programm für die quantitative Echtzeit-PCR	71
Tabelle 14 Verwendete Gefahrenstoffe und ihre Gefährdungs- und Sicherheitshinweise	85

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Nierenanatomie	2
Abbildung 2 Glomeruläre Halbmondbildung in der Niere durch rasch progrediente Glomerulonephritis	3
Abbildung 3 Mehrdimensionale Struktur des Kollagen IV in der glomerulären Basalmembran und Freilegung der immunogenen Epitope.....	6
Abbildung 4 Differenzierung von CD4 ⁺ T-Zellen aus dem Thymus zu Effektor-T-Zellen oder Tregs und deren jeweiliges Zytokin- sowie Transkriptionsfaktorenprofil.....	9
Abbildung 5 Mechanismen der Treg-medierten Immunsuppression.....	12
Abbildung 6 Immunisierungsschema der EAG.....	15
Abbildung 7 Kinetik und Akkumulation von regulatorischen T-Zellen nach Induktion der EAG	16
Abbildung 8 Immunisierungs- und Behandlungsschema zur Analyse der Rolle der Tregs in der späten Phase der EAG.....	18
Abbildung 9 Veränderungen im Körpergewicht.....	19
Abbildung 10 Verlust der Nierenfunktion	20
Abbildung 11 Histologische Befunde in Nierenparaffinschnitten.....	21
Abbildung 12 m- α 3(IV)NC1-spezifische Antikörperantwort vor und während der Behandlung mit DT in der späten Phase der Erkrankung	22
Abbildung 13 qPCR-Analyse von <i>Foxp3</i> und verschiedenen Chemokinen sowie Zytokinen	24
Abbildung 14 FACS-Analyse der CD4 T-Zellfrequenzen in Milz und Niere.....	25
Abbildung 15 Analyse der renalen Makrophagen.....	26
Abbildung 16 Immunhistologische Anfärbung von intraglomerulären Makrophagen ..	27
Abbildung 17 Immunisierungs- und Behandlungsschema	29
Abbildung 18 Körpergewichtsverlauf, m- α 3(IV)NC1-spezifischer Antikörpertiter und klinische Parameter zur Überwachung der Nierenfunktion.....	30
Abbildung 19 FACS-Analyse der Niere zehn Wochen nach der initialen Immunisierung	31
Abbildung 20 FACS-Analyse der Milz zehn Wochen nach der initialen Immunisierung	32

Anhang

Abbildung 21 Repräsentativer <i>Dotplot</i> zur durchflusszytometrischen Analyse $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifischer CD4 T-Zellen in der Milz.....	33
Abbildung 22 h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische CD4 T-Zellen in der Milz.....	34
Abbildung 23 Immunisierungsschema für die parallele Depletion der Tregs während der Induktion der EAG.....	36
Abbildung 24 Veränderungen im Körpergewicht während des gesamten Experiments	37
Abbildung 25 Verlust der Nierenfunktion. DEREK und wt Tiere wurden mit h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ oder als Kontrolle mit Adjuvant immunisiert	38
Abbildung 26 m- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische Antikörper im Blut.....	39
Abbildung 27 FACS-Analyse der CD4 T-Zellen in Milz und Niere	40
Abbildung 28 FACS-Analyse der Tregs in Milz und Niere.....	40
Abbildung 29 FACS-Analyse der Makrophagen in Milz und Niere.....	41
Abbildung 30 Repräsentative <i>Dotplots</i> nach spezifischer Stimulation von Milzzellen ...	42
Abbildung 31 h- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische T-Zellantwort in der Milz.....	43
Abbildung 32 Eingrenzungsstrategie für verschiedene Leukozytenpopulationen in Milz und Niere.....	66
Abbildung 33 Eingrenzungsstrategie für $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -spezifische CD4 ⁺ T-Zellen	67

8.3 Sicherheit und Entsorgung

Alle Versuche wurden unter der Berücksichtigung der Sicherheitsdatenblätter der jeweiligen Chemikalien, sowie der gentechnischen Anlage in Laboren der Sicherheitsstufe 1 und 2 durchgeführt. Chemikalien, Lösungen und Puffer wurden in die dafür vorgesehenen Behälter entsorgt und alle kontaminierten Materialien vor der Entsorgung autoklaviert. Kontaminierte Oberflächen wurden mit 70% Ethanol desinfiziert.

Tabelle 14 Verwendete Gefahrenstoffe und ihre Gefährdungs- und Sicherheitshinweise

Chemikalie	CAS-Nr.	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
Ammoniumchlorid	12125-02-9	302-319	305+351+338
Brefeldin A	20350-15-6	301	301+310
Ethanol	64-17-5	225	210
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	60-00-4	319	305+351+338
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
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

Anhang

Penicillin	69-57-8	317-334	280-302+352- 304+341-333+313- 342+311-501
Phorbol-12-myristat-13- acetat (PMA)	16561-29-8	315	264-280-302+352- 332+313-362
Puromycin	53-79-2	302	-
Salzsäure	7647-01-0	290-314-335	234-260-304+340- 303-361+353- 305+351+338- 309+311-501
Schwefelsäure	7664-93-9	290-314	280-301+330+331- 309+310- 305+351+338
Streptomycin	3810-74-0	361-302	280-308+313

8.3.1 H-Sätze

H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

H290 Kann gegenüber Metallen Korrosiv sein.

H301 Lebensgefahr bei Verschlucken.

H302 Giftig bei Verschlucken.

H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.

H311 Giftig bei Hautkontakt.

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

H315 Verursacht Hautreizungen.

H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

H318 Verursacht schwere Augenschäden.

H319 Verursacht schwere Augenreizung.

H330 Lebensgefahr bei Einatmen.

H331 Giftig bei Einatmen.

H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaische Symptome oder Atembeschwerden verursachen.

H335 Kann die Atemwege reizen.

H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen. (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht)

Anhang

H350 Kann Krebs erzeugen. (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht)

H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen. (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt), (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht)

H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

8.3.2 P-Sätze

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.

P223 Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt verhindern.

P234 In kaltes Wasser tauchen/ nassen Verband anlegen.

P260 Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol nicht einatmen.

P261 Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden.

P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen. (Die vom Gesetzgeber offen gelassene Einfügung ist vom Inverkehrbringen zu ergänzen)

P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

P280 Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

P301 Verschlucken:

P302 Bei Berührung mit der Haut:

P303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):

P304 Bei Einatmen:

P305 Bei Kontakt mit den Augen:

P308 Bei Explosion oder falls betroffen:

P309 Bei Explosion oder Unwohlsein:

P310 Sofort Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.

P311 Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.

P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.

P313 Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P330 Mund ausspülen.

P331 Kein Erbrechen herbeiführen.

P332 Gezielte Maßnahmen.

Anhang

P333 Bei Hautreizung oder –ausschlag:

P338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.

P341 Bei Atembeschwerden an die frische bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P342 Bei Symptomen der Atemwege:

P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.

P352 Mit viel Wasser/ ... waschen.

P353 Haut mit Wasser abwaschen/ duschen.

P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.

P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen.

P380 Umgebung räumen.

P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

P405 Unter Verschluss aufbewahren.

P501 Inhalt/ Behälter ... zuführen.

8.4 Publikationsliste und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

Hopfer, H., Hünemörder, S., Treder, J., Turner, J.-E., Paust, H.-J., Meyer-Schwesinger, C., Hopfer, U., Sachs, M., Peters, A., Bucher-Kocaoglu, B., **Ahrens, S.**, Panzer, U., Mittrücker, H.-W. (2015) Glomerulopathy induced by immunization with a peptide derived from the Goodpasture Antigen α 3IV-NC1. *J. Immunol.* **194**, 3646-3655.

Hünemörder, S., Treder, J., **Ahrens, S.**, Schumacher, V., Paust, H.-J., Menter, T., Matthys, P., Kamradt, T., Meyer-Schwesinger, C., Panzer, U., Hopfer, H., Mittrücker, H.-W. (2015) TH1 and TH17 cells promote crescent formation in Experimental Autoimmune Glomerulonephritis. *J. Pathol.* **237**, 62–71.

Mahnke, J., Schumacher, V., **Ahrens, S.**, Käding, N., Feldhoff, L.M., Huber, M., Rupp, J., Raczkowski, F., Mittrücker, H.-W. (2016) Interferon regulatory factor 4 controls TH1 cell effector function and metabolism. *In Revision*

Kongressbeiträge:

Hünemörder S., Holzer J., **Ahrens S.**, Panzer U., Hopfer H., Mittrücker H.-W. (2013). The role of different CD4 T-cell subsets in Experimental Autoimmune Glomerulonephritis. *43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI)*. Mainz

Hünemörder S., Holzer J., **Ahrens S.**, Panzer U., Hopfer H., Mittrücker H.-W. (2013). The role of different CD4 T-cell subsets in Experimental Autoimmune Glomerulonephritis. *5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN)*. Berlin

Ahrens S., Hünemörder S., Schumacher V., Hopfer H., Mittrücker H.-W. (2015). The role of regulatory T cells in Experimental Autoimmune Glomerulonephritis. *4. Europäischer Kongress für Immunologie (ECI)*. Wien

8.5 Danksagung

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker für die Möglichkeit an diesem spannenden Thema zu arbeiten. Vielen Dank für die vielen fachlichen Diskussionen aber auch alltäglichen Unterhaltungen, deine ständige Präsenz und Unterstützung und natürlich für die Möglichkeit auch nach der Doktorarbeit weiter an diesem Thema zu forschen.

Ich danke Prof. Dr. Wolfram Brune für die Begutachtung meiner Dissertation.

Ich danke Dr. Helmut Hopfer für die Anfertigung und Auswertung der Histologie.

Für eine grandiose Arbeitsatmosphäre danke ich allen Iff's. Vor allem natürlich den Mitgliedern der AG Mittrücker! Valéa, danke für dein phänomenales Labormanagement und deine gelegentlichen Gesangseinlagen. Justus, Moritz, Karsten, Steffi und Fredi, danke für den abwechslungsreichen Laboralltag und den Spaß, den wir täglich haben! Steffi, dir danke ich ganz besonders, vor allem für die Weitergabe deiner Erfahrung auf diesem Forschungsthema, deine Unterstützung und konstruktiven Diskussionen! Vielen Dank auch an die Kaffeejunkies des Instituts, besonders in der Endphase war es mir immer wieder eine Freude!

Sabrina, tausend Dank für deine exzellente Unterstützung mit den Mäusen, deiner offenen Art und deinem großartigen Humor!

Ich danke allen Studenten und Dozenten des ASMB. Ich hab die zwei Jahre genossen und viele interessante Dinge und Techniken gelernt, die mich in meiner Arbeit weitergebracht haben. Vor allem danke ich Kristina, Annkathrin und Hauke für die lustige Zeit vor, während und nach Vorlesungen und Praktika und Sabine für die großartige Organisation!

Tina und Annkathrin, euch beiden danke ich ganz besonders für das letzte Jahr, das gute Essen (immerhin einmal wöchentlich keine Mensa ☺), den Spaß auch abseits des Laboralltags, die Fluchereien und die vielen Gespräche zur ganz besonderen Partyplanung!

Anhang

Miguel und Xenia, ihr beide ward von Anfang an für mich da, habt mir in einer schwierigen Übergangsphase geholfen und unsere gemeinsamen Mittagessen und Kaffeepausen waren immer ein Highlight! Gemeinsam haben wir uns über die Jahre durch alle Hochs und Tiefs gearbeitet und nun sind wir bald endlich alle durch! Ihr seid die Besten und ich will euch niemals missen!

Meiner lieben Janna danke ich für 20 Jahre Freundschaft (plus einen klitzekleinen Sommer Hass am Anfang). Du meine Güte, was haben wir alles schon zusammen erlebt. Du bist ein Teil meines Lebens und egal wo uns unsere Wege hinführen, wir können immer und zu jeder Zeit aufeinander zählen!

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken! Mama und Jess, ich danke euch für die bedingungslose Unterstützung, auch wenn das ein oder andere an meiner Arbeit nicht immer auf Verständnis getroffen ist. Ich danke euch für eure Liebe und dafür, dass ich immer auf euch zählen kann!

Ich danke auch meinen Großeltern, dafür, dass sie immer wieder versucht haben zu verstehen was ich so den ganzen Tag im Labor mache und mir ständig gesagt haben wie stolz sie auf mich sind! Ich vermisse euch!

Als letztes bedanke ich mich bei meinem Verlobten Marco. Du gibst mir jeden Tag Kraft und bist Halt, bist immer an meiner Seite, lebst jedes Hoch und Tief mit mir zusammen, versuchst dich sogar manchmal in Immunologie rein zu fuchsen (wenn ich mal wieder am Verzweifeln bin) und gerade in der Endphase warst du eine großartige fachliche und emotionale Unterstützung für mich. Ohne dich hätte ich das alles nur halb so gut gemeistert. Ich liebe dich über alles und kann es kaum noch erwarten, dass der 23. Juli endlich vor der Tür steht!

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere, dass die Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Datum, Unterschrift

