

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

III. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor: Prof. Dr. med. Tobias B. Huber

Untersuchung der Emigration von Leukozyten in der experimentellen Glomerulonephritis

Dissertation

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

vorgelegt von:

Tobias Fabian Koyro
aus Hamburg

Hamburg 2018

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.07.2018**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. Ulf Panzer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Willi Mittrücker

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	4
1.1 EINFÜHRUNG.....	4
1.1 GLOMERULONEPHRITIDEN	5
1.2 PATHOGENESE DER RAPID-PROGRESSIVEN GLOMERULONEPHRITIDEN	6
1.4 CHEMOKINE UND CHEMOKINREZEPTOREN	9
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 VERSUCHSTIERE	14
2.2 GENOTYPISIERUNG/PHANOTYPISIERUNG	16
2.3 URINDIAGNOSTIK	17
2.4 HISTOLOGIE	18
2.5 RNA ISOLATION AUS NIERENGeweBE	19
2.6 KONFOKALE MIKROSKOPIE	20
2.7 EINZELZELLSUSPENSION	20
2.7.1. Niereneinzelzellsuspension	20
2.7.2 Präparation von Leukozyten aus Lymphknoten.....	21
2.7.3 Präparation von Leukozyten aus der Milz	21
2.7.4. FÄRBUNG MITTELS FLUORCHROMGEKOPPELTER ANTIKÖRPER	21
2.8 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	22
2.9 CHEMOTAXIS ASSAY	23
3. ERGEBNISSE.....	25
3.1 ETABLIERUNG EINES MAUSMODELLS ZUR FOTOKONVERSION VON INTRARENALen T ZELLEN	25
3.2 GENOTYPISIERUNG VON KAEDe MÄUSEN	29
3.3 CHEMOTAXIS ASSAY	29
3.3 UNTERSUCHUNG DER EMIGRATION VON LEUKOZyTEN IN DER HOMÖOSTASE	30
3.4 UNTERSUCHUNG DER EMIGRATION VON LEUKOZyTEN IN DER INFLAMMATION (NTN)	32
3.5 BEEINFLUSSUNG DER EMIGRATION DURCH DEFIZIENZ DER CHEMOKINREZEPTOREN CXCR3 UND CCR7	34
3.6 NACHWEIS VON DENDRITISCHEN ZELLEN UND T ZELLEN IN LYMPHOZELEN	37
4. DISKUSSION.....	39
5. ZUSAMMENFASSUNG	43
6. SUMMARY	44
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	45
8. LITERATURVERZEICHNIS	46
9. DANKSAGUNG	51
10. PUBLIKATIONEN.....	53
11. LEBENSlauf	54
12. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	56

1. Einleitung

1.1 Einführung

Glomerulonephritiden stellen eine der häufigsten Ursachen für eine terminale Niereninsuffizienz dar. Die dabei beobachtete Infiltration von Leukozyten in die Niere ist ein wichtiges Kennzeichen der humanen und experimentellen Glomerulonephritiden. In den letzten Jahren konnte in mehreren Arbeiten die Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und unterschiedlichen T Zell Populationen in die Niere funktionell charakterisiert werden. Der Verbleib infiltrierender Entzündungszellen ist weitestgehend unbekannt.

Mit Kaede-transgenen Mäusen stehen genetisch modifizierte Mäuse zur Verfügung, die es erstmalig erlauben, Zellen in der Niere über einen Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. In renalen Zellen kann das Fluoreszenzprotein Kaede mit einer Lichtquelle von grüner in rote Fluoreszenz umgewandelt werden. Dadurch wird es erstmalig möglich, die Migration von Zellen in der Niere zu verfolgen.

Mit Hilfe dieser Maus sollen die Migration von Leukozyten aus der Niere heraus in lymphatisches Gewebe untersucht werden. Es sollten dendritische Zellen sowie B Zellen und T Zellen unter homöostatischen Bedingungen und im Modell einer experimentellen Glomerulonephritis (nephrotoxische Nephritis, NTN) gesondert betrachtet werden. Des Weiteren soll die Rolle des Chemokinrezeptors CCR7 bei der Emigration einzelner Leukozytenpopulationen aus der Niere heraus mit Hilfe einer CCR7-defizienten Maus charakterisiert werden, da für diesen Rezeptor eine Rolle in der Emigration von Leukozyten aus entzündetem Gewebe beschrieben ist.

Ein besseres Verständnis der Immunopathogenese von Autoimmunerkrankungen wie den Glomerulonephritiden unter Einbeziehung der Zellmigration und des Verbleibs von pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zellen kann langfristig zu gezielteren und nebenwirkungsärmeren Therapien von Patienten führen.

1.1 Glomerulonephritiden

In Deutschland und Europa ist die Gruppe der Glomerulonephritiden zusammen mit der diabetischen und der hypertensiven Nephropathie die Hauptursache für eine terminale Niereninsuffizienz, ca. 10-15 Prozent der Patienten sind hiervon betroffen (Chadban and Atkins, 2005). Als Folge der terminalen Niereninsuffizienz ist eine intermittierende oder dauerhafte Dialysetherapie und ggf. eine Nierentransplantation notwendig.

Bei den Glomerulonephritiden handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen. Die aggressivste Verlaufsform stellt die Gruppe der rasch progressiven Glomerulonephritiden (RPGN) dar, welche sich wiederum in unterschiedliche Untergruppen mit verschiedener Ätiologie und Pathogenese einteilen lässt. Erkrankungen, die zu einer RPGN führen können sind u.a. sog. „pauci-immune“ Vaskulitiden, wie die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, ehemals M. Wegener), die mikroskopische Polyangiitis (MPA), die eosinophile Granulomatose (eGPA, Churg-Strauss) und die Purpura Schoenlein-Henoch (IgA-Vaskulitis). Weiterhin können Unterformen des Lupus erythematodes (v.a. Typ I-III) und das Goodpasture-Syndrom zu einer RPGN führen (vgl. auch *Nephrologie* Kuhlmann 6. Auflage, Seite 92).

Gemein ist allen Untergruppen der zellvermittelte renale Schaden mit einer charakteristischen Histologie (Bolton, 1996, Couser, 2012).

Erfolgt keine adäquate Therapie zeigt diese Gruppe von Glomerulonephritiden ein rasches Fortschreiten, welches innerhalb von Wochen zur terminalen Niereninsuffizienz oder zum Tod führen kann, daher ist eine frühe und aggressive Therapie indiziert (Bolton, 1996). Allerdings sind die etablierten Therapien bisher unspezifisch und reich an Nebenwirkungen.

Schätzungen zur Inzidenz der RPGN liegen bei sieben Fällen pro eine Million Einwohner/Jahr (Couser, 1999). Die häufigste RPGN ist die pauci-immune Glomerulonephritis. In einer Untersuchung von Anganco et al. mit 82 Patienten wurde bei 36 (43,9%) eine pauci-immune GN bei ANCA-assoziiierter Vaskulitis, bei 35 (42,7%) eine RPGN mit Immunkomplexen und bei einem Patienten (1,2%) eine „idiopathische RPGN“ gefunden (Anganco et al., 1994).

1.2 Pathogenese der rapid-progressiven Glomerulonephritiden

Die Pathogenese der rapid-progressiven Glomerulonephritiden (RPGN) wird als heterogen angenommen, dies wird in den unterschiedlichen immunhistologischen Befunden deutlich. 1988 wurde von Couser und Abrass eine immunpathogenetische Klassifikation der RPGN vorgeschlagen, die noch heute gültig ist (Couser and Abrass, 1988).

Dabei werden drei Formen der RPGN unterschieden:

Typ 1: Rapid-progressive Glomerulonephritis mit Nachweis von Anti-GBM-Antikörpern im Serum und glomerulär linearen IgG-Ablagerungen in der Immunhistologie

Typ 2: Die RPGN mit glomerulären Immunkomplexablagerungen

Typ 3: RPGN ohne immunhistologische glomeruläre Befunde (sog. „pauci-immune Glomerulonephritis“)

Bei dem ersten Typ der RPGN lassen sich im Serum der betroffenen Patienten Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran (Anti-GBM-Antikörper) nachweisen. Immunhistologisch kommt es zu einer linearen Ablagerung von IgG Antikörpern an der glomerulären Basalmembran. Das Epitop der Antikörper wurde als die „non-collagenous 1 (NC1) Domäne der $\alpha 3$ Kette des Typ IV Kollagen ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$)“ identifiziert. Typ IV Kollagen der glomerulären Basalmembran besteht aus $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$ -Ketten. Die pathogenen Antikörper binden dabei zwei dominante Epitope auf der $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ Domäne (EA- $\alpha 3$ and EB- $\alpha 3$) und an ein homologes Epitop auf der $\alpha 5(\text{V1})\text{NC1}$ Domäne (EA- $\alpha 5$) (Ooi et al., 2008, Reynolds, 2011). Normalerweise bildet die NC1 Domäne Hexamere, sodass die Epitope nicht mit pathogenen Antigenen in Kontakt kommen (Pedchenko et al., 2010). Erst durch eine Konformationsänderung werden die Epitope freigelegt und anschließend wahrscheinlich durch bindende Antikörper stabilisiert, was wahrscheinlich zu dem rapid progressiven Verlauf beiträgt (Pedchenko et al., 2010). Bei der anti-GBM-Erkrankung ist eine starke Assoziation zum HLA Klasse 2 Haplotyp HLA-DRB1*15:01 bekannt. Der Einfluss dieses Allels auf die autoimmun-Antwort wurde mittels in vitro mit humanen T Zellen, welche das $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ Epitop erkennen, bestätigt (Phelps and Rees, 1999). Kommt es zusätzlich zu einem pulmonalen Befall im Sinne eines pulmo-renalen Syndroms spricht man vom „Goodpasture-Syndrom“.

Bei der RPGN mit glomerulären Immunkomplexablagerungen (RPGN Typ 2) können wiederum verschiedene Erkrankungen zu Grunde liegen. Zu diesem histologischen Erscheinungsbild führen zum einen infektiöse und postinfektiöse Glomerulonephritiden, zum anderen Autoimmunerkrankungen wie die Lupusnephritis, die Kryoglobulinämie und die Purpura-Schoenlein-Henoch. Schließlich können eine IgA-Nephropathie und eine membranoproliferative Glomerulonephritis zu glomerulären Immunkomplexablagerungen führen.

Bei der pauci-immunen RPGN zeigen sich keine spezifischen immunhistochemischen glomerulären Befunde. Die pauci-immune RPGN tritt im Rahmen von Vaskulitiden der kleinen Gefäße (ANCA-assoziierte Glomerulonephritiden), wie der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, ehemals M. Wegener), der Mikroskopischen Polyangiitis (MPA) oder Eosinophilen Granulomatose (eGPA, Churg-Strauss Syndrom) auf.

Bei der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) lassen sich im Serum der Patienten c-ANCA (cytoplasmatische anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper) nachweisen, die gegen die Proteinase-3 (PR-3) gerichtet sind. Bei der mikroskopischen Polyangiitis lassen sich hingegen p-ANCA gegen die Myeloperoxidase (MPO) nachweisen.

Bei den meisten Patienten mit pauci-immuner RPGN lassen sich auch Antikörper gegen LAMP2 (lysosome-associated membrane glycoprotein 2) nachweisen. Die Häufigkeit der LAMP2-Antikörper ist umstritten (Roth et al., 2012). Alle drei Antigene werden durch Degranulation von neutrophilen Granulozyten im Rahmen der NETose in den geschädigten Glomeruli freigesetzt, wobei LAMP-2 auch auf dem Endothel der glomerulären Kapillaren exprimiert wird (Kessenbrock et al., 2009, Bosch, 2011).

Neben der Beteiligung von neutrophilen Granulozyten gibt es Hinweise für eine Beteiligung des zellulären Immunsystems (Abdulahad et al., 2011). So fällt histologisch eine periglomeruläre Infiltration von T Zellen auf (Velden et al., 2012). Im Blut von Patienten mit ANCA-assoziierten Vaskulitiden lassen sich MPO bzw. PR-3 spezifische Th1 und Th17 Zellen nachweisen (Abdulahad et al., 2011).

Durch verschiedene Studien konnten Hinweise für eine Pathogenität der MPO/PR-3 Antikörper gewonnen werden (Lyons et al., 2012, Jennette et al., 2013). Jedoch kann es im Mausmodell auch in B Zell depletierten Mäusen zu einer Vaskulitis kommen, die dann im Sinne einer Typ IV Immunreaktion (Allergie vom verzögerten Typ) abläuft (Ruth et al., 2006).

Der Auslöser der Vaskulitis bleibt trotz erheblicher Fortschritte im Verständnis der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritiden unklar. Es gibt Hinweise für einen Zusammenhang zwischen einer nasalen Besiedelung mit St. Aureus. Seit längerem ist bekannt, dass die nasale St. Aureus Besiedelung mit einem erhöhten Rezidivrisiko einher geht (Chen and Kallenberg, 2010). Dabei wird ein molekulares Mimikry zwischen bakteriellen Proteinen und der Proteinase-3 angenommen. Es kommt zur Induktion von PR-3 spezifischen B Zellen und sukzessiver Antikörperproduktion. Ein pathogenetischer Zusammenhang konnte allerdings bisher nicht überzeugend gezeigt werden (Tadema et al., 2011). Allerdings gibt es einen gut untersuchten Zusammenhang über ein molekulares Mimikry zwischen LAMP-2 und dem bakteriellen Peptid FimH (Kain et al., 2008). Antikörper gegen LAMP-2 binden FimH. Im Ratten-Modell konnte durch eine Immunisierung von WKY Ratten eine LAMP-2 Autoantikörperbildung induziert werden. Diese Autoantikörper binden LAMP-2 in der Ratte und auch humanes LAMP-2 (Kain et al., 2008).

Als etabliertes Modell für die rapid-progressive Glomerulonephritis dient das Modell der Nephrotoxischen Nephritis (NTN), dieses wird durch Injektion von heterologen Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran in Mäusen induziert (Tipping and Holdsworth, 2006). Das nephrotoxische Serum wurde dabei durch Immunisierung von Schafen mit Extrakten aus Glomeruli von Mäusen gewonnen. Durch die Injektion von aus dem Serum der immunisierten Schafe gewonnenen Antikörpern wird in den Mäuse eine Typ IV Immunreaktion induziert, hierbei kommt es zunächst zu einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und Th17 positiven $\gamma\delta$ -T Zellen (Turner et al., 2012, Disteldorf et al., 2015). In der Folge kommt es zur Bildung von antigenspezifischen T Zellen und deren Infiltration in die Niere, diese ist wesentlich abhängig vom Chemokinrezeptor CXCR3 (Panzer et al., 2007) in Bezug auf pathogene Th1 Zellen und CCR6 in Bezug auf Th17 Zellen. Dabei konnte kürzlich gezeigt werden, dass diese pathogenen Th17 Zellen aus dem Darm stammen, diesen S1P-R1-abhängig verlassen und CCR6-abhängig in die Niere eintreten. Durch Modulation des intestinalen Mikrobioms kann der Krankheitsverlauf beeinflusst werden. Sog. „germ free mice“, also Mäuse, denen Bakterien im Darm fehlen, weisen dabei einen milderen Krankheitsverlauf auf (Krebs et al., 2016a).

1.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Die Chemokine sind zytotaktische Proteine, die sich aus ca. 75-125 Aminosäuren zusammensetzen und ein Molekulargewicht von ca. 8-14 kDa aufweisen. Der Name leitet sich von ihrer Funktion (Chemotaxis induzierende Zytokine) her (Fernandez and Lolis, 2002). Insgesamt setzt sich die Gruppe der Chemokine aus ca. 50 verschiedenen Molekülen zusammen und werden von verschiedenen Zellpopulationen, wie Immunzellen, Fibroblasten, hämatopoetischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen gebildet (Griffith et al., 2014, Kim and Luster, 2015). In den vergangenen Jahren wurden, neben der Chemotaxis-induzierenden Funktion, zusätzlich der zahlreichen weiteren Funktionen der Chemokine bekannt bzw. näher charakterisiert. So konnte gezeigt werden, dass Chemokine u.a. Überleben, Differenzierung und Migrationsgeschwindigkeit von Zellen, insbesondere Immunzellen modulieren können (Allen et al., 2007). Weiterhin spielen sie eine Rolle in der Entwicklung und Reifung von lymphoiden Organen und bei der Wanderung von dendritischen Zellen und T Zellen in den drainierenden Lymphknoten (Lian and Luster, 2015, Teixeira et al., 2013).

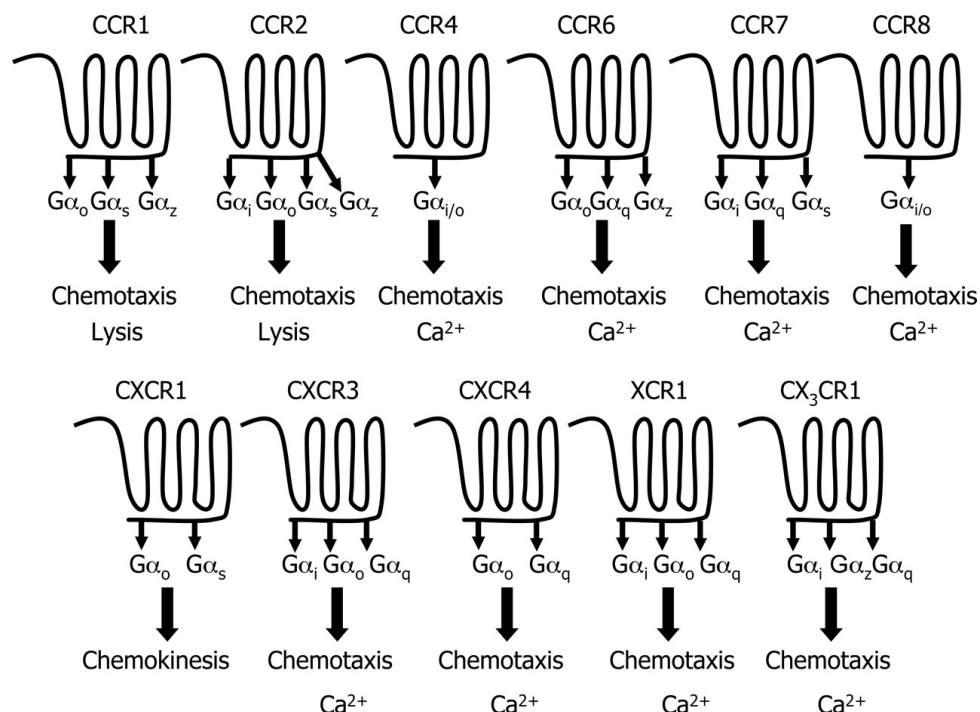


Abb. 1: Übersicht über Signaltransduktion und Funktion verschiedener Chemokinrezeptoren

Gezeigt ist die Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und die hierüber in den Zellen induzierte Funktion. Grafik aus: (Maghazachi, 2005).

Man unterscheidet vier Subgruppen an Chemokinen, deren Nomenklatur sich von der Anzahl und Position der Cysteinreste am Amino-Terminus herleitet. CC-Chemokine weisen zwei direkt aufeinander folgende Cysteine auf. In der CXC-Familie liegt zwischen den zwei Cysteinen eine beliebige Aminosäure. In der CX3C-Familie liegen drei beliebige Aminosäuren zwischen den Cysteinen. Die XC-Chemokinfamilie besitzt nur ein Cystein am Aminoterminal. Neben den Nomenklaturnamen besitzen die Chemokine häufig noch historische Namen, welche ihnen im Rahmen der Erstbeschreibung gegeben wurden (Bacon et al., 2002, Griffith et al., 2014).

Hauptfunktion der Chemokine ist die Induktion einer Chemotaxis in Anhängigkeit eines Chemokingradienten. Dabei können inflammatorische, nicht-inflammatorische und duale Chemokine unterschieden werden (Zlotnik and Yoshie, 2000). Duale Chemokine können dabei sowohl homöostatische als auch inflammatorische Prozesse induzieren. Beispiele hierfür sind die Chemokine CXCL1 und CCL21. CXCL1 wird beispielsweise im Rahmen von Entzündungsreaktionen in verschiedenen Endorganen vermehrt gebildet (Zlotnik and Yoshie, 2012). Im Knochenmark ist CXCL1 allerdings in der Homöostase an der Auswanderung von neutrophilen Granulozyten in das Blut beteiligt. CCR7 spielt in der Homöostase eine wichtige Rolle in der Immigration von Leukozyten in Lymphknoten, kann aber bei chronischen Entzündungsprozessen im entzündeten Gewebe vermehrt gebildet werden und so einen vermehrten Influx von Entzündungszellen, v.a. T Zellen modulieren.

Chemokine wirken über die, zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehörenden, Chemokinrezeptoren. Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren richtet sich nach den Gruppen von Chemokinen, welche sie binden und teilen sich entsprechend in XC-, CC-, CXC- CX3C-Rezeptoren ein. Aktuell sind beim Menschen 24 unterschiedliche CC-Chemokine, 16 CXC-Chemokine, ein CX3C-Chemokin, zwei XC-Chemokine und vier sog. „atypische Chemokinrezeptoren“ (ACKRs) bekannt (Sokol and Luster, 2015). Analog zu der Einteilung der Chemokine in pro-inflammatorische und homöostatische Chemokine erfolgt die Einteilung der Rezeptoren entsprechend in pro-inflammatorische und homöostatische Chemokinrezeptoren. Entsprechend der Bedeutung der Chemokine für das Immunsystem sind Chemokinrezeptoren auf nahezu allen Leukozytenpopulationen exprimiert (Zlotnik and Yoshie, 2012).

Chemokine sind bedingt rezeptorspezifisch, d.h. CC- und CXC-Chemokine binden ausschließlich an CC- respektive CXC-Rezeptoren. Aktuell sind zehn verschiedene

Rezeptoren für CC-Chemokine bekannt (CCR1-CCR10), sechs für CXC-Chemokine (CXCR1-CXCR6) und einer CX3C-Chemokine (CX3CR1) (Zlotnik et al., 2006).

Chemokinrezeptoren wirken als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf verschiedene intrazelluläre Signalwege (Allen et al., 2007). Die Signaltransduktion erfolgt dabei über Serin/Threonin Kinasen wie MAPK, Akt oder Tyrosinkinasen wie JAK, Src und Pyk2 (Kohout et al., 2004). Unabhängig davon scheinen Chemokine auch Veränderungen in der Genexpression von Zellen induzieren zu können, dabei wirken sie beispielsweise über den JAK-STAT Signalweg, den NF-kappa-B (nuclear factor kappa/light-chain enhancer of activated B cells) oder das CREB-Protein (cAMP response element binding protein) (Griffith et al., 2014).

Die Tertiärstruktur der Chemokine ist streng konserviert. Der Aminoterminal ist ungeordnet, es folgt eine beta-Faltblattstruktur, der Carboxy-Terminus endet mit einer α -Helix. Im Zuge der Differenzierung von Zellen des Immunsystems, können diese je nach Grad ihrer Differenzierung, ihr Chemokinrezeptorexpressionsprofil verändern.

Der Chemokinrezeptor CCR7 (CD197) wurde erstmals 1993 identifiziert und anfänglich Epstein-Barr-Virus induced Gene-1 (EBI-1) benannt (Birkenbach et al., 1993). Er gehört zur Gruppe der CC-Chemokinrezeptoren und bindet die Chemokine CCL19 und CCL21 (Forster et al., 2008). CCR7 wird auf zahlreichen Zellen des Immunsystems und auf Thymozyten exprimiert. Daher sind verschiedene Funktionen beschrieben. (Comerford et al., 2013). Daher sind verschiedene Funktionen beschrieben. So spielt er eine Rolle in der Entwicklung und Reifung des Thymus, der sekundär lymphatischen Organe und in der Wanderung von Immunzellen v.a. in und innerhalb von Lymphknoten (Masopust and Schenkel, 2013, Lian and Luster, 2015). Weiterhin wird eine Rolle in der Entwicklung und im Ablauf von chronischen Inflammationsreaktionen, in der Metastasierung von malignen Zellen und der Tumorgenese angenommen (Hauser and Legler, 2016).

T Zellen, vor allem naive sowie sog. central memory T Zellen und regulatorische T Zellen exprimieren CCR7 konstitutiv, dabei spielt er eine wesentliche Rolle in der Zirkulation der T Zellen zwischen peripherem Gewebe, Blut und sekundär-lymphatischen Organen (Comerford et al., 2013).

Dendritische Zellen exprimieren den Rezeptor vor allem nach Antigenaufnahme. Die CCR7 Expression ermöglicht ihnen, in den drainierenden Lymphknoten zu migrieren,

dort mit T Zellen in Interaktion zu treten und eine Inflamationsreaktion zu initiieren oder modulieren (Worbs et al., 2017).

Die Liganden CCL19 und CCL21 werden von Stromazelle primärer und sekundärer lymphatischer Organe produziert und daher als homöostatische Chemokine angesehen. CCL21 wird zusätzlich von lymphatischen Endothelzellen gebildet (Vigl et al., 2011).

Mäuse ohne CCR7 bzw. CCL19 oder CCL21 zeigen typischerweise eine pathologische Lymphknotenarchitektur auf Grund der beeinträchtigten Migration und Organisation von Lymphozyten in die sekundär-lymphatischen Organe (Comerford et al., 2013).

Der Chemokinrezeptor CXCR3 (auch G-protein coupled receptor 9 oder CD183 genannt) gehört zur Gruppe der CXC-Rezeptoren und bindet die Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 (Tokunaga et al., 2018). Er wurde erstmals 1989 beschrieben und wird hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems, wie Monozyten, T Zellen, hier vor allem Th1 Zellen, NK Zellen und Dendritischen Zellen exprimiert, weiterhin ist auch eine Expression auf Tumorzellen beschrieben (Griffith et al., 2014, Groom and Luster, 2011a). Auf naiven T-Zellen ist der Rezeptor nur gering exprimiert, wird bei Kontakt zu Antigen-präsentierenden Dendritischen Zellen hoch-reguliert und führt so zu einer Th1 Polarisation (Groom and Luster, 2011b). Die Liganden CXCL9/10/11 sind unter nicht-inflammatorischen Bedingungen nur wenig exprimiert. In der Inflamationsreaktion bilden Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen Interferon-gamma-initiiert vermehrt CXCL9/10/11 und induzieren so eine Th1 Reaktion (Masopust and Schenkel, 2013, Bromley et al., 2008).

Hauptfunktion von CXCR3 ist die Rekrutierung von aktivierten Immunzellen, v.a. Th1 Zellen in der Inflammation. So konnte bereits früh eine Anreicherung von CXCR3⁺ T Zellen in verschiedenem entzündeten Gewebe festgestellt werden (Qin et al., 1998, Shields et al., 1999). Weiterhin konnte in zahlreichen Inflamations-, Infektions-, Tumor und Transplantationsmodellen eine Anreicherung der CXCR3 Liganden CXCL9/10/11 gezeigt werden (Groom and Luster, 2011b).

Funktionen von CXCR3 sind dabei neben der Rekrutierung von T Zellen, zahlreich, so ist der Rezeptor auf CD4⁺ und CD8⁺ Memory T Zellen exprimiert und spielt so eine Rolle in der Reaktivierung von Immunantworten gegen pathogene Erreger, Tumorzellen oder der bei der Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen.

Über CXCR3 werden Immunantworten in einem „Feed-forward loop“ amplifiziert indem durch Infiltration von pro-inflammatorischen CXCR3 positiven T Zellen die Einwanderung von CXCR3 negativen T Zellen unterdrückt wird (Groom and Luster, 2011a, Groom and Luster, 2011b)

Neben der Expression von CXCR3 auf pro-inflammatorischen Th1 Zellen ist weiterhin die Expression dieses Rezeptors auf regulatorischen T Zellen (Tregs) beschrieben und führt zu einer Infiltration von regulatorischen T Zellen in entzündetes Gewebe (Koch et al., 2009). Die Funktionalität dieser rekrutierten T Zellen ist dabei unklar, da es trotz einer Infiltration von Tregs zu einem Fortschreiten oder einer Aufrechterhaltung der Inflamationsreaktion kommen kann (van Amelsfort et al., 2004, van Amelsfort et al., 2007, Groom and Luster, 2011a).

In der Niere und im Modell der nephrotoxischen Nephritis (NTN) ist der Einfluss von Chemokinen auf die Infiltration und Positionierung von Immunzellen etabliert und wurde in der vergangenen Zeit besser verstanden (Seegerer, 2003, Kurts et al., 2013). So konnte gezeigt werden, dass Th1 und Th17 Zellen wesentlichen Anteil an dem Verlauf der NTN haben und Chemokine einen wesentlichen Anteil an der Regulation der Entzündungsreaktion haben (Paust et al., 2012). Die Infiltration von pathogenen Th1 Zellen hängt wesentlich vom Chemokinrezeptor CXCR3 ab (Panzer et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden dass CXCR3⁺ regulatorische T Zellen die Th1 Antwort in kontrollieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CXCR3⁺ regulatorische T Zellen auch vermehrt in Nieren von Patienten mit ANCA Vaskulitis vorkommen (Paust et al., 2016).

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Aufzucht, Haltung und Arbeit mit den Versuchstieren erfolgte in der Forschungstierhaltung des UKE (VTH) bzw. den OP-Räumen der VTH im Campus Forschung. Die Tiere wurden in Gruppen von ein bis fünf Tieren in Käfigen des Typs 1284 Eurostandard Typ II long (Tecniplast, Deutschland) gehalten und hatten dabei Futter und Wasser zur freien Verfügung. Die Haltungstemperatur lag bei 21°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50-55% und einem alternierenden Tag-Nacht-Wechsel von 12 Stunden. Der fachgerechte Umgang mit den Versuchstieren wurde von mir in einem 5-tägigen versuchstierkundlichen Kurs (FELASA Typ B) sowie durch Anleitung durch erfahrene Arbeitsgruppenmitarbeiter erlernt.

Die C57/B6 Tiere stammen aus der UKE-eigenen Zucht. Kaede-transgene Mäuse wurden von Michio Tomura (Osaka Ohtani University) zur Verfügung gestellt, auf den C57/B6 Hintergrund der UKE eigenen Zucht rückgekreuzt und in der VTH gezüchtet. CXCR3^{-/-} Mäuse wurden von Panzer et al. generiert, 2007 publiziert (Panzer et al., 2007) und werden seit Generierung in der Forschungstierhaltung des UKE gezüchtet. CCR7^{-/-} Mäuse wurden von den Jackson Lab. (USA) bestellt und in der Tierhaltung des UKE gezüchtet.

CXCR3^{-/-} bzw. CCR7^{-/-} Mäuse wurden mit Kaede-transgenen Mäusen verpaart und in der Versuchstierhaltung des UKE gezüchtet.

Alle Mausexperimente erfolgten auf Grundlage von entsprechenden, genehmigten Tierversuchsanträgen und unter Einhaltung der entsprechenden gesetzlichen Grundlagen, insbesondere dem Tierschutzgesetz.

Die Kaede transgene Maus wurde erstmals 2008 von Michio Tumura publiziert und zum Tracking von Lymphozyten aus Lymphknoten verwendet (Tomura et al., 2008). Das Kaede Protein wurde erstmals 2002 von Ando et. aus der Steinkoralle (*Trachyhyllia geoffroyi*) kloniert und weiter charakterisiert (Ando et al., 2002). Dabei handelt es sich um ein Fluoreszenzprotein, was natürlicherweise nach Anregung mit Licht der Wellenlängen 500-550nm eine Fluoreszenz im Grünen (518 nm) zeigt. Durch Fotokonversion, d.h. Exposition des Proteins zu near UV-A Licht (350-400 nm) ändert sich die Fluoreszenz in das rote Spektrum mit einem Emissionsmaximum bei 582nm.

Die Fotokonversion ist dauerhaft und wird nicht durch das zur Anregung verwendete Licht mit der Wellenlänge 500-550nm induziert. Die Effizienz der Fotokonversion hängt dabei von dem verwendeten Licht und dem intrazellulären pH-Wert ab.

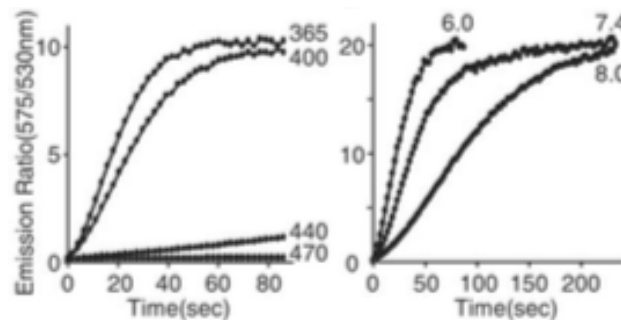


Abb. 1: Fotokonversion des Kaede Proteins in Abhängigkeit von Zeit und Wellenlänge des zur Fotokonversion verwendeten Lichts

In der linken Abbildung wird die Emissionsratio(575nm/530nm) von mit Kaede Protein transfizierten HeLa Zellen nach Fotokonversion mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen (365nm, 400nm, 440nm und 470nm) gezeigt. Es wird deutlich, dass die Fotokonversion bereits bei Licht der Wellenlänge 440nm deutlich reduziert und bei 470nm quasi nicht mehr vorhanden ist. Im rechten Teil der Abbildung wird die Emissionsratio bei unterschiedlichen intrazellulären pH-Werten (6,0; 7,4; 8,0) Grafik aus: (Ando et al., 2002)

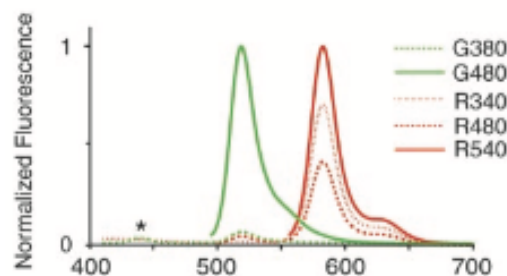


Abb. 2: Emissionsspektrum des Kaede Proteins in seinen zwei Konformationen bei Anregung mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge.

Die Abbildung zeigt die Anregung der unkonvertierten Form (Grün, G) mit Licht der Wellenlänge 380nm und 480nm (G380, G480) sowie die Anregung der konvertierten Form (Rot, R) mit Licht der Wellenlängen 340nm, 480nm und 540nm (R340, R480, R540). Abbildung aus: (Ando et al., 2002).

Die Kaede-transgene Maus exprimiert das Kaede Protein unter dem CAG Promotor ubiquitär in allen Zellen (Abb. 3). Das Protein ist dabei frei im Zytoplasma löslich und zwischen diesem und dem Kern frei diffundieren (Ando et al., 2002). Durch Fotokonversion kommt es zu einem bis zu 2000fachen Anstieg des Quotienten der Floreszenzen der roten und grünen Farbe (Ando et al., 2002). Das fotokonvertierte Kaede Protein bleibt dabei über mehrere Generationen von proliferierenden Zellen nachweisbar (Tomura et al., 2008).

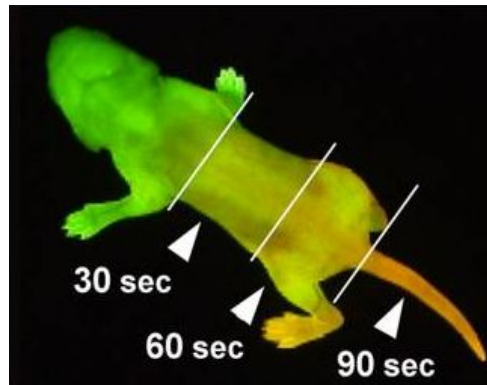


Abb. 3: Kaede-transgene Maus, nach Fotokonversion (0, 30, 60, 90 Sekunden). Gezeigt ist eine Kaede-transgene Maus, welche von kranial nach kaudal in ansteigender Zeit fotokonvertiert wurde. Der Anteil an rötlicher Fluoreszenz steigt mit entsprechend zunehmender Fotokonversionszeit. Abbildung aus (Tomura et al., 2008).

2.2 Genotypisierung/Phänotypisierung

Zur Genotypisierung der Kaede Mäuse wurde durch die Tierpfleger der UKE Forschungstierhaltung bei 4-6 Wochen alten Mäusen durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus Blut gewonnen. Aus diesem wurden, nach hypotoner Lyse der Erythrozyten, Blutleukozyten gewonnen. Diese wurden durchflusszytometrisch auf Fluoreszenz des Kaede Proteins im FITC Kanal untersucht. Bei positiver Fluoreszenz wurden die Tiere als Kaede positiv phänotypisiert. Bei fehlender Fluoreszenz als Kaede negativ. Eine PCR-technische Genotypisierung der Kaede transgenen Mäuse erfolgte nicht.

Die Genotypisierung der $CCR7^{-/-}$ und $CXCR3^{-/-}$ Mäuse erfolgte durch DNA Extraktion aus Schwanzbiopsien. Zur DNA Extraktion wurde das XNAT2 Extract N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma, Deutschland) verwendet. Die DNA wurde entsprechend amplifiziert und der Genotyp mittels Gelelektrophorese untersucht.

Folgende Primer wurden verwendet:

5'-CATCAGCATTGACCGCTACGT-3' und 5'-GGTACGGATGATAATGAGGTAGCA-3' für die Genotypisierung der $CCR7^{-/-}$ Maus.

CXC-EX2-F₁, 5'-TGT CCT CCT TGT AGT TGG GCT-3'; CXC-UTR-R1, 5'-TTG GCC TGA GCT GCT GGG AT-3'; and Neo5'-R, 5'-CTA AAG CGC ATG CTC CAG ACT GCC-3' für die Genotypisierung der $CXCR3^{-/-}$ Maus.

2.3 Urindiagnostik

Zur Quantifizierung der Albuminurie als Indikator für den glomerulären Schaden wurde Urin durch Haltung der Mäuse in Stoffwechselkäfigen gewonnen. Hierzu wurden die Mäuse maximal 5 Stunden in Käfigen, bestehend aus einer 96-well Mikrotiterplatte und einem Gehäuse gehalten. Während der Haltung hatten die Mäuse stets freien Zugang zu Trinkwasser. Nach Ablauf der fünf Stunden wurden die Mäuse aus dem Stoffwechselkäfig entfernt und der Urin in der Mikrotiterplatte abpipetiert. Mit Faeces oder Trinkwasser verunreinigter Urin wurde nicht verwendet. Der Urin wurde in 1,5 ml Eppendorf Tubes gegeben. Die Quantifizierung der Albumin-Kreatinin-Ratio erfolgte durch Bestimmung der Albuminkonzentration mittels ELISA (Bethyl-Laboratories, USA) und Messung der Kreatininkonzentration, diese erfolgte im Zentrallabor des UKE. Aus beiden Werten wurde der Albumin/Kreatinin Quotient bestimmt.

Zur Bestimmung der Albuminkonzentration im Urin wurde dieser zunächst semiquantitativ mittels Urin-Sticks (Multistix 10 SG, Bayer, Germany) untersucht. Entsprechend der semiquantitativ gemessenen Proteinurie konnte der Urin dann nach folgendem Schema mit sample dilution buffer (100ml post-coat buffer + 0,5 ml Tween) verdünnt werden.

Schema Urinverdünnung

Urin Stix Testergebnis	Verdünnungsfaktor
Negativ/spur	1 : 100
+	1 : 500
+/++	1 : 1.000
++	1 : 10.000
++/+++	1 : 20.000
+++	1 : 50.000
+++/++++	1 : 100.000
++++	1 : 200.000

Die quantitative Bestimmung der Albuminkonzentration im Urin erfolgte mittels ELISA. Dafür wurde das Mouse Albumin Quantification ELISA Set (E90-134, Bethyl

Laboretries USA) verwendet. Die Bestimmung erfolgte gemäß Protokoll des Herstellers. Hiernach wurde eine 96-Well-Immunosorbent-Platte über Nacht mit je 100 µl 1:100 in Coating-Buffer verdünntem Anti-Mausalbumin-Antikörpern bei 4°C inkubiert. Nach dem Coating wurde die Platte drei Mal mit Washing-Buffer gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden durch 30-minütige Inkubation mittels Post-coat-Buffer (300 µl/Well bei Raumtemperatur) geblockt. Nach erneutem Waschen mit Wasch-Buffer erfolgte die Auftragung der entsprechend im Sample-Diluent verdünnten Proben jeweils als Doppelbestimmung sowie die Auftragung eines Albumin-Standard (Absteigende Konzentration von Albumin: 1000 ng/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,25 ng/ml, 16,125 ng/ml und 7,8 ng/ml) sowie zwei Wells, welche nur mit Sample-Diluent („Blank“) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Hiernach erfolgte die fünfmalige Waschung mit Waschpuffer. Nach Zugabe von 100 µl Substrat (TMB/H₂O₂) wurde der ELISA im Dunklen bei Raumtemperatur für ca. 10-15 Minuten entwickelt und anschließend mit 100 µl 2M Schwefelsäure gestoppt. Die Quantifizierung des Farbumschlages erfolgte photometrisch bei 450 nm.

2.4 Histologie

Nierengewebe für die histologische Auswertung wurde durch Gewinnung einer ca. 1 mm dicken, scheibenförmigen Gewebeprobe aus der fotokonvertierten Niere gewonnen. Diese wurde in 4%igem Formalinlösung (pH 7,4) 24 Stunden fixiert. Die Formalinlösung wurde durch Mischen von 37%igem Formalin (Hersteller Morphisto, Deutschland) mit Sörensen-PBS-Puffer angesetzt. Sörensen-Puffer wurde durch Lösen von 3,03 g Natriumhydrogen-1-phosphat und 14,14 g Natriumhydrogen-2-phosphat in destilliertem Wasser gewonnen. Nach 24 stündiger Fixierung wurden die Gewebeproben drei Mal für ca. 30 Minuten mit 5 ml PBS gewaschen und in 5 ml PBS aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Die Einbettung erfolgte in der Citadelle in einer steigenden Ethanolreihe (2,5 Stunden 60%, 1 Stunde 70%, je 2 Mal eine Stunde und einmal 1,5 Stunden 96% bzw. 100% Ethanol). Anschließend erfolgte die Einweichung in Xylol zwei Mal eine Stunde und einmal 1,5 Stunden und schließlich das Einbetten in flüssigem Paraffin und das Gießen in Blöcke, in welchen die Nierenscheiben abkühlten.

Nach Abkühlen der Blöcke wurden diese mit dem Mikrotom ca. 1,5 µm dicke Scheiben abgeschnitten und auf Objektträger überführt. Diese wurden über Nacht bei 40°C

gebacken. Am folgenden Tag wurden die Objektträger nacheinander für 5 min in Xylol, einer absteigenden Ethanolreihe (je 2 Mal 100%, 96%, 75% Ethanol) und schließlich in destilliertem Wasser gebadet.

Die histologischen und immunhistologischen Färbungen wurden nach Standardprotokollen der Pathologie des UKE durchgeführt. Es wurden folgende Marker und Antikörper verwendet: CD3 (A0452, Dako, Germany), F4/80 (BM8, BMA, Germany) und PAS.

Die Auswertung erfolgte standardisiert durch verblindet mit einem Zeiss LSM 520 beta Mikroskop (Zeiss, Germany).

Die interstitielle Fibrose wurde mit Photographien von PAS Schnitten ausgewertet auf welche dann ein Gitter mit 40 Punkten gelegt wurde. Jeder Punkt wurde in eine der vier Kategorien („glomerulär“, „interstitiell“, „tubulär“ und „vaskulär“) eingeordnet. War eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, wurde der Punkt als „nicht zuortbar“ eingestuft.

Die glomeruläre Schädigung wurde in PAS Schnitten durch Auszählung von 50 Glomeruli ermittelt. Jedes Glomerulum wurde auf einer Skala von 0 („keine Schädigung“) bis 4 („maximale Schädigung“) eingeordnet. Der Wert für eine maximale Schädigung betrug entsprechend 200 Punkte.

Die Halbmonde als Marker für die Aggressivität der Grunderkrankung wurden an Hand von 30 Glomeruli quantifiziert. Die Zellzahl wurde an Hand von 20 Gesichtsfeldern in 20x Vergrößerung und an 30 Glomeruli bestimmt.

2.5 RNA Isolation aus Nierengewebe

Zur Gewinnung von RNA aus dem Nierengewebe wurde bei der Organentnahme ein Teil des Nierenpols in ein 1,5 ml Tube gegeben und auf Flüssigstickstoff gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Zur RNA Präparation wurden die Gewebestücke in einen Homogenisator gegeben und dann mittels eines Glasdouncers und dann mit Guanidinthiocyanat-Lösung (88g 4M Guanididnthiozyanat, 1g 0,5% N-Laurylsarcosin, 150ml RNase freiem Wasser, 5ml 1M Natriumcitrat, 210 µl β-Mercaptopurin) homogenisiert. Durch die GTC Lösung wird das Nierengewebe lysiert, RNasen und freiwerdende Proteinkomplexe denaturiert. Das Homogenisat wird in ein 50ml Reaktionsgefäß gegeben und zur Lyse eine Stunde auf Eis inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde die DNA durch Zugabe von Natrium-Acetat, Chloroform/Isoamylalkohol und wassergesättigtem Phenol von den Proteinen und den Nukleoproteinkomplexen getrennt. Nach Zugabe von Natriumacetat wurde die RNA ausgefällt. Anschließend wurde der Ansatz in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min bei 9500rpm zentrifugiert, dabei entstanden 2 Phasen, die obere, nukleinsäurehaltige wurde in ein RNase freies Tube gegeben, mit kühlem Isopropanol resuspendiert und über Nacht bei -20°C inkubiert.

2.6 Konfokale Mikroskopie

Zur Untersuchung der Eindringtiefe der Fotokonversion in die Niere wurde die Fotokonversion wie oben beschrieben intravital durchgeführt. Anschließend wurde die Niere explantiert und eine ca. 1 cm dicke Scheibe etwas überhalb des Nierenhilus entnommen. Ohne weitere Fixierung wurde diese auf dem konfokalen Mikroskop (Nikon A1R, Nikon, Japan) platziert. Die Auswertung erfolgte mit der Nikon Imaging Software (NIS Elements Confocal, Nikon, Japan).

2.7 Einzelzellsuspension

2.7.1. Niereneinzelzellsuspension

Zur Präparation von Leukozyten aus Mausnieren wurde nach Explantation der Niere aus der Maus die Nierenkapsel entfernt und die Niere in ca. 1mm² große Würfel geteilt, Diese wurden dann in Verdaumedium (RPMI 1640 + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin, Life Technologies, Deutschland) aufgenommen und 45 min bei 37°C unter Zusatz von DNase I (0,01 mg/ml, Roche, Germany) und Collagenase D (0,4mg/ml, Roche, Deutschland) verdaut. Danach erfolgte der mechanische Gewebeaufschluss mittels GentleMACS Dissoziator (Miltteny Biotec, Deutschland). Der Überstand wurde abzentrifugiert (4°C, 300g, 7 min) und das Homogenisat in Percoll 37% (GE Healthcare, USA) aufgenommen und erneut zentrifugiert (Raumtemperatur, 500g, 20 Minuten). Das Pellet wurde danach für 5 Minuten in Erythrozythen-Lyse Puffer (Tris-HCl pH 7,6 + Ammonium-Chlorid, frisch angesetzt) resuspendiert, um eine hypotone Lyse der Erythrozyten zu erreichen. Die Lyse wurde durch Zugabe von MACS Puffer (Miltteny Biotec, Deutschland) gestoppt und die Proben mehrfach mit MACS Puffer gewaschen. Schließlich wurden die Proben dann über ein 30µm Sieb in FACS Tubes aufgenommen und erneut mit MACS Puffer

gewaschen. Das Pellet wurde im Rücklauf resuspendiert und mit 5 µl Mausserum für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit Antikörpern (siehe auch 2.7.4).

2.7.2 Präparation von Leukozyten aus Lymphknoten

Zur Präparation von Leukozyten aus dem renalen bzw. inguinalen Lymphknoten wurde diese nach Explantation aus der Maus in mit HBSS (Life Technologies, Deutschland) gefüllten 1,5ml Eppendorf Tubes aufgenommen. Es erfolgte eine manuelle mechanische Dissoziation der Lymphknoten über ein 30 µm Sieb in ein FACS Tube unter mehrmaligem Waschen mit MACS Puffer. Danach wurden die Proben zentrifugiert (300g, 4°C, 7min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im Rücklauf resuspendiert. Nach Inkubation mit 5µl Mausserum erfolgte die Färbung mittels FACS Antikörpern (siehe auch 2.7.4).

2.7.3 Präparation von Leukozyten aus der Milz

Zur Präparation von Leukozyten aus der Milz wurde diese nach Explantation aus der Maus in ein mit HBSS gefülltes Eppendorf Tube aufgenommen und auf Eis gelagert. Es erfolgte die manuelle Dissoziation der Milz über ein 70 µm Sieb in ein 15ml Falcon Tube. Die in HBSS suspendierten Zellen wurden gezählt und ca. 1 Mio. Zellen entnommen, in FACS Tubes überführt und mehrfach mit MACS Puffer gewaschen. Das Pellet wurde im Rücklauf resuspendiert und mit 5µl Mausserum inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit Antikörpern (siehe auch 2.7.4).

2.7.4. Färbung mittels fluorchromgekoppelter Antikörper

Nach Gewinnung der Einzelzellsuspensionen aus den unterschiedlichen Gewebearten wie oben beschrieben wurde diese mittels fluorchrom-gekoppelter Antikörper gefärbt. Hierfür wurden die einzelnen Proben in 100 µl MACS Puffer aufgenommen. Nach Inkubation mit 5µl Mausserum zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen erfolgte die Färbung mit dem Antikörpermastermix, welcher aus den unterschiedlichen Antikörpern in der entsprechenden Konzentration zusammengestellt worden war. Die Färbung erfolgte dabei für 15 Minuten bei 4°C im Dunklen zum Schutz der fluorchromgekoppelten Antikörper vor dem Tageslicht. Nach Ablauf der 15 Minuten wurde die Färbung mittels Zugabe von 3 ml MACS Puffer gestoppt.

Bei Färbung von Chemokinrezeptoren wurde ein zweiter Färbeschritt durchgeführt, dabei wurden die Proben wiederum in jeweils 100 µl MACS Puffer aufgenommen und anschließend der Antikörpermix hinzugegeben. Die Färbung erfolgte dann bei 37°C im Inkubator für 15 Minuten. Die Färbung wurde wiederum durch Zugabe von 3 ml MACS Puffer gestoppt.

Aus Nieren gewonnene Einzelzellsuspensionen wurden zusätzlich noch mit dem Farbstoff NiR (near-infra-red, Thermo Fischer, USA), welcher nicht-vitale Zellen markiert, gefärbt. Hierzu wurden die Proben in 100 µl PBS Puffer (Life Technologies, Deutschland) aufgenommen. Der Farbstoff NiR wurde dann im Verhältnis 1:1000 hinzugegeben und die Suspension insgesamt 30 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubiert. Die Färbung wurde durch Zugabe von 3 ml PBS Puffer gestoppt und die Proben danach noch zwei Mal mit PBS Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben in 200 µl PBS Puffer (Life Technologies, Deutschland) aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

2.8 Durchflusszytometrie

Mittels FACS Analyse (fluorescence activated cell sorting) können Zellen anhand von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen oder intranukleären Proteinen durch Markierung mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern unterschieden werden. Durch Anregung mit einem Laser kommt es beim Passieren des Laserstrahls zu einer fluoreszenz-spezifischen Emission. Hierzu werden die mit den fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markierten Zellen in einer Einzelzellsuspension in einem sog. FACS Tube aufgenommen. In dem Tube wird ein Überdruck erzeugt, welcher die Suspension in das Gerät drückt. Hier passieren die einzelnen Zellen je nach Gerätekonfiguration einen oder mehrere Laser. Durch Anregung mit den Lasern emittieren die Farbstoffe charakteristische Emissionsspektren. Die Anregung der Farbstoffe erfolgt über Licht unterschiedlicher Wellenlängen, daher lassen sich mehrere Parameter simultan messen. Weiterhin können über den sog. Forward- und Side-Scatter Größe und Granularität der Zellen bestimmt werden. Die Lichtemissionen werden über Filter über Spiegel, Filter und Linsen an sogenannte Fotomultiplier umgeleitet und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dieses wird dann über ein Computerprogramm (z.B. FACS DIVA, BD Bioscience, USA) in Form von FACS Plots optisch ausgegeben.

Die Färbung der, wie oben beschrieben gewonnenen Zellen, erfolgte nach Standardprotokollen der Hersteller der fluoreszenz-gekoppelten Antikörper (BD Bioscience, eBioscience, beide USA). Folgende Parameter und Antikörper wurden verwendet:

Epitop	Antikörper (Clon)
CD45	30-F11
CD3	17A2
CD4	GK1.5
CD8	57-6.7
CD11b	M1/70
CD11c	N418
CD19	6D5
CXCR3 (CD183)	17-1831
CCR7 (CD197)	4B12
MHCII	M5/114.15.2

Tabelle 1: Antikörper in der Durchflusszytometrie

Die Tabelle zeigt die für die genannten Versuche benutzten Epitope und die zugehörig Antikörperclone

Die Messungen der Proben erfolgten am Arbeitsgruppen-eigenen BD LSR II Gerät bzw. am BD LSR Fortessa der FACS Core Facility des UKE (Laser: 405nm, 488nm, 561nm und 640nm). Die Messung der Kaede Fluoreszenz erfolgte im FITC Kanal (Kaede grün, 488nm Laser) bzw. im PE Kanal (Kaede rot, 561nm Laser).

Das Akquirieren der Daten geschah mit der BD FACSDiva Software (BD, USA, Version 6.0), die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software (TreeStar, USA, Version 10.X).

2.9 Chemotaxis Assay

Zur Untersuchung der Migrationskapazität von fotokonvertierten und nicht-fotokonvertierten Leukozyten der Maus wurde ein chemotaktischer Assay durchgeführt. Hierzu wurden dendritische Zellen (CD11c⁺) und CD4⁺ T Zellen aus Milzen von Kaede Mäusen nach o.g. Protokoll isoliert. Die Anreicherung von CD11c respektive CD4⁺ Zellen erfolgte mittels der MACS Technologie (CD11c⁺ Dendritic cell isolation Kit bzw. CD4⁺ Cell Isolation, Kit Milteny Biotec Germany) nach Standardprotokollen des Herstellers.

Nach Aufreinigung der Zellen wurden diese in Kulturmedium (RPMI 1640, 10% FCS, 50 U/ml Penicillin/Streptomycin und 1% L- Glutamine, alles Gibco, USA) aufgenommen und bei einer Zelldichte von 1 Mio. Zellen/ml eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 4 Minuten bei 250g zentrifugiert und in Chemotaxismedium überführt, dabei wurde das Chemotaxismedium aus RPMI (1640, w/o red Phenol, Gibco USA), 5% FCS (Gibco, USA), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, USA) und 2% L-Glutamin (Gibco, USA) angesetzt.

Anschließend erfolgte die Auftragung der Zellen in eine 24-well Boyden Chamber (Nr. 3421, Porengröße 5 µm, Corning, USA,). Die Migration erfolgte gegen Chemotaxismedium (Kontrolle), 10 nM CXCL12 (Peprotech, USA) bzw. 50 nM CCL21 (Peprotech, USA). Es wurden jeweils 600.000 Zellen pro Ansatz verwendet. Die Migration erfolgte bei 37°C für 2 Stunden im Inkubator. Anschließend wurden die Einsätze entfernt und die Zellzahl im unteren Teil der Boyden Chamber mittels Durchflusszytometrie gemessen. In Relation zu der eingesetzten Zellzahl und der Negativkontrolle wurde der Chemotaxis Index berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Mausmodells zur Fotokonversion von intrarenalen T Zellen

In einen ersten Schritt wurde ein Versuchsaufbau etabliert, der eine Fotokonversion von ca. 35 Prozent aller intrarenalen CD45⁺ Zellen ermöglichte. Hierzu wurden die Kaede positiven Mäuse zunächst mittels Isofluran (5 Vol.-Prozent zur Einleitung und 3 Vol.-Prozent zur Erhaltung der Narkose) in Narkose gelegt, Mindestens zehn Minuten vorher wurde eine Analgesie mit Buprenorphin (0,1 mg/kg KG) appliziert. Die linke Flanke der Maus wurde rasiert und mit alkoholhaltiger Lösung (Cutasept Bode Chemie, Deutschland) desinfiziert. Nach Sicherstellung einer adäquaten Narkosetiefe wurde links lateral ein ca. 1 cm langer Flankenschnitt gesetzt. Die linke Niere wurde vorsichtig unter Schonung der Lymph- und Blutgefäße aus dem Retroperitoneum präpariert. Anschließend wurde diese auf einem Pappstreifen gelagert und der Lichtquelle (Blue Wave LED Near UV-A, Dymax USA) exponiert. Die Maus, inklusive der Lymphwege und Lymphnoten war durch den Pappstreifen vollständig bedeckt (siehe Abb. 4). Die Niere wurde dann im Abstand von 4 cm zur Lichtquelle insgesamt eine Minute fotokonvertiert. Anschließend wurde der Pappstreifen entfernt und die Niere reponiert.

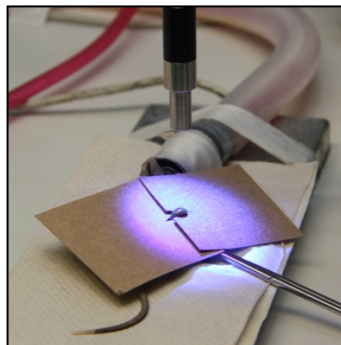


Abb. 4: Versuchsaufbau zur Fotokonversion der linken Niere

Lagerung der Maus in der Narkoseanlage, Bedeckung der Maus durch eine Karton. Fotokonversion durch Dymax LED Lampe im Abstand von vier Zentimetern.

Es erfolgte ein Wundverschluss mittels Naht des Peritoneums (PDS 2-0, Ethicon, USA) und der Haut Mittels Hautklammern (B. Braun, Deutschland). Postoperativ erhielten die Mäuse eine Analgesie mit Tramadol über das Trinkwasser (12,5mg/100ml).

Der optimale Abstand und Konvertierungsdauer wurden durch Untersuchung verschiedener Bedingungen unter Variierung des Abstandes und der

Fotokonversionszeit ermittelt. Hierbei erwies sich die Kombination aus 4 cm Abstand der Niere zur Lichtquelle und 1 Minute Fotokonversionszeit als optimal.

Mittels des o.g. Versuchsaufbaus konnte im Mittel 35 Prozent der intrarenalen CD45⁺ Zellen fotokonvertiert werden. Differenziert nach Subpopulationen zeigten sich Unterschiede in der Rate der fotokonvertierten Zellen (siehe Abb. 7). So wurden ca. 55 Prozent der dendritischen Zellen fotokonvertiert, bei den CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen lag die Fotokonversionsrate bei ca. 25 Prozent. Die CD19⁺ B Zellen waren ca. 30 Prozent fotokonvertiert. Dies ist am ehesten durch die unterschiedlichen Verteilungen der verschiedenen Zellpopulationen innerhalb der Niere erklärbar.

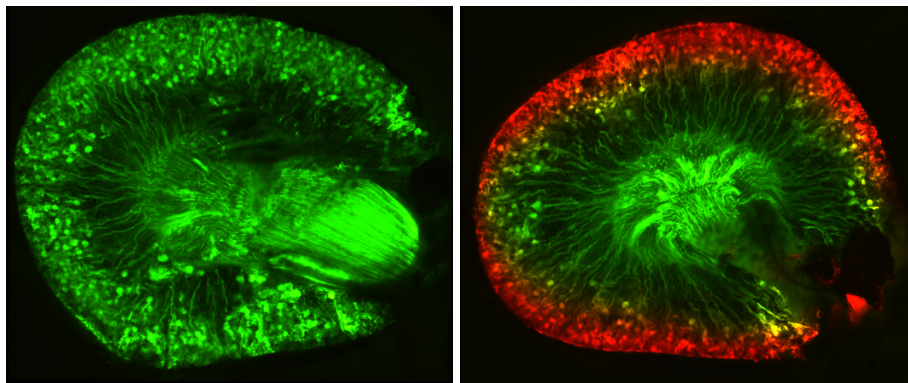


Abb. 5: Konfokale Mikroskopie einer nicht fotokonvertierten Niere (links) und einer nach o.g. Methode fotokonvertierter Niere (rechts).

Es fällt auf, dass vor allem die Nierenrinde und nicht das Nierenmark konvertiert wird.

Gemeinsam war allen Zellpopulationen, dass sie nur innerhalb der fotokonvertieren Niere, aber nicht in der kontralateralen Niere, der Milz, dem Blut oder den renalen oder inguinalen Lymphknoten nachweisbar waren.

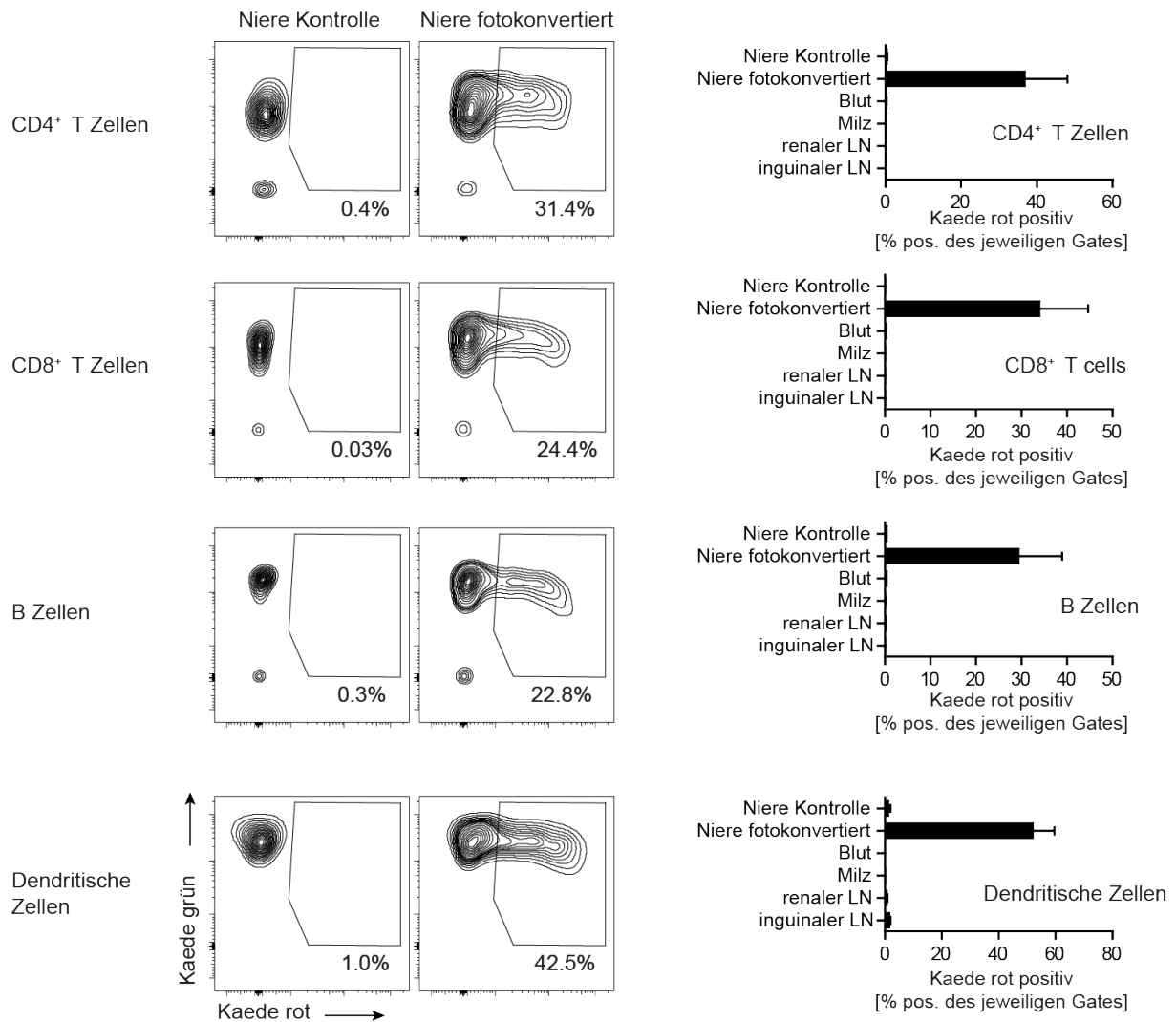


Abb. 6: Fotokonversionsraten von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen unmittelbar nach Fotokonversion

Dargestellt werden FACS Blots von Leukozytensubpopulationen. Auf der Ordinate wird die Fluoreszenz des nicht fotokonvertierten Kaede Proteins („Kaede grün“) aufgetragen, auf der Abszisse die Fluoreszenz des fotokonvertierten Kaede Proteins („Kaede rot“). Auf der rechten Seite der Abbildung ist die Quantifizierung (Prozent fotokonvertierte Zellen der jeweiligen Subpopulation) für verschiedene Organe dargestellt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Fotokonversion streng auf die Niere begrenzt war. Die Anteile der fotokonvertierten Zellen in anderen Organsystemen war vernachlässigbar gering (siehe auch Abb. 6). So konnten unmittelbar nach Fotokonversion keine fotokonvertierten Zellen im renalen oder inguinalen Lymphknoten nachgewiesen werden. Im Blut und in der Milz lagen die Anteile bei weniger als 0,5 % aller CD45 positiven Zellen.

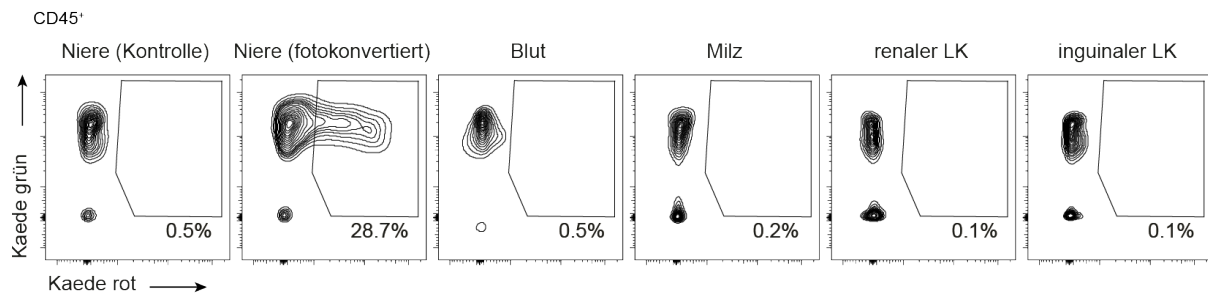


Abb. 7: FACS Blots von verschiedenen Organen direkt nach Fotokonversion der linken Niere

Es wird der Erfolg (Rate an fotokonvertierten Zellen) und die Spezifität der Foto-konversion von CD45⁺ unmittelbar nach der Prozedur gezeigt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Niere durch den Prozess der Fotokonversion nicht geschädigt wurde. Hierzu wurden Histologien der wie oben beschrieben fotokonvertierten Niere mit solchen verglichen, die lediglich Sham-operiert, d.h. aus der Maus herauspräpariert, allerdings nicht fotokonvertiert wurden. In der histologischen Auswertung zeigten sich keine Unterschiede in Bezug auf den mikroskopischen Schaden. Auch ließ sich kein Unterschied in der Albuminurie oder im Serum Harnstoff der Mäuse finden.

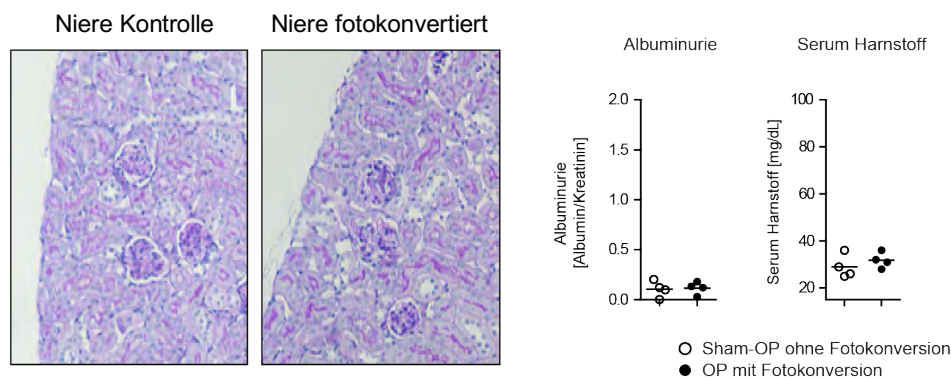


Abb. 8: Histologien von fotokonvertierten und nicht fotokonvertieren Nieren (PAS); Albuminurie und Serum-Harnstoff Werte von Sham-operierten und fotokonvertierten Mäusen

Dargestellt werden auf der linken Seite der Abbildung PAS Schnitte von Nierengewebe von nicht fotokonvertierten Nieren (links) und fotokonvertierten Nieren (rechts), es zeigt sich keine histologische Schädigung der Niere. Im rechten Teil der Abbildung ist die Albuminurie und der Serum-Harnstoff dargestellt. Diese dienen als Surrogatparameter für eine Schädigung der Niere von Sham-operierten Mäusen und fotokonvertierten Mäusen, hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

3.2 Genotypisierung von Kaede Mäusen

Kaede Mäuse sind transgene Organismen, welche das Kaede Protein unter dem VAG Promotor ubiquitär in allen Zellen exprimieren. Voraussetzung für die experimentellen Arbeiten ist, dass die Versuchstiere das Kaede-Transgen tragen und somit das Kaede Protein exprimieren. Daher erfolgte die Entscheidung, ob die Tiere für Versuche zur Verfügung stehen, nachdem eine Phänotypisierung mittels FACS Analyse von Blutleukozyten durchgeführt wurde. Hierfür wurde ca. 4 Wochen alten Mäusen durch die Tierpfleger der Forschungstierhaltung des UKE durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus Blut abgenommen. Die Blutleukozyten wurden durch hypotone Lyse der Erythrozyten aufgereinigt und durchflusszytometrisch auf den FITC Kanal messbarer Fluoreszenz des Kaede Proteins untersucht. Dabei wurden die Mäuse entsprechend als Kaede positiv oder negativ phänotypisiert. Eine Genotypisierung z.B. mittels PCR erfolgte nicht.

3.3 Chemotaxis Assay

Wie bereits in Punkt 3.1 diskutiert ergaben sich keine Hinweise für eine Schädigung der Niere durch den Prozess der Fotokonversion. Um zu zeigen, dass keine Schädigung der Leukozyten und damit einer Einschränkung ihrer Migrationskapazität eintritt, wurde ein chemotaktischer Assay durchgeführt. Dies geschah unter Anleitung und in Zusammenarbeit von Frau Dr. Sonja Krohn.

Für den Assay wurden dendritische Zellen und CD4⁺ Lymphozyten aus der Milz nach o.g. Protokoll aufgereinigt. Die Migrationskapazität wurde gegen die Chemokinliganden CCL 21 und CXCL12 α untersucht. Verglichen wurden *in vitro* fotokonvertierte Zellen, die aus Milzen von Kaede gewonnen wurden. Der Erfolg der Fotokonversion wurde durchflusszytometrisch validiert. 100 Prozent der exponierten Zellen konnten fotokonvertiert werden.

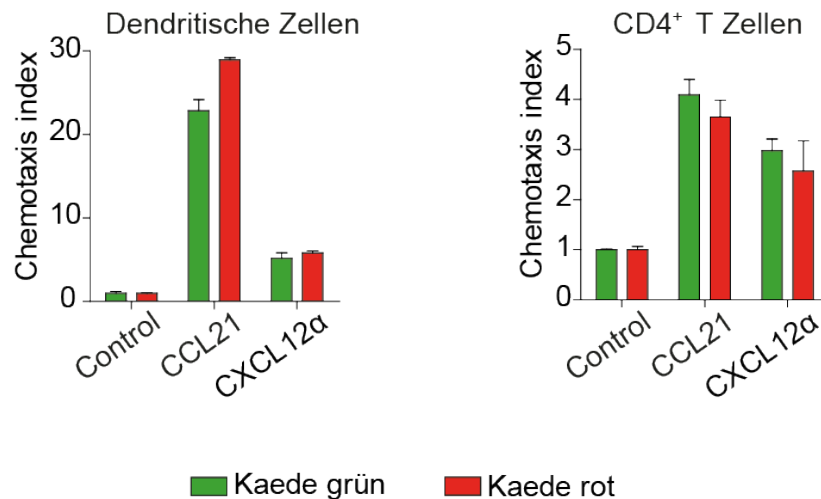


Abb. 9: Chemotaxis Assay

Dargestellt wird der Chemotaxis Index von *in vitro* fotokonvertierten und nicht fotokonvertierten dendritischen Zellen und CD4 T Zellen in Bezug auf die Chemokine CCL21 und CXCL12 α . Hier zeigt sich kein Unterschied in der migratorischen Kapazität beider Zellpopulationen

Es fand sich kein Unterschied in der Migrationskapazität der fotokonvertierten (Kaede rot positiven) und der nicht fotokonvertierten (Kaede grün positiv, Kaede rot negativ) Zellen. Als Kontrolle diente Chemotaxismedium. Wie in Abbildung 9 gezeigt konnte bei dendritischen Zellen ein Chemotaxis Index von ca. 25 gegen CCL21 erreicht werden. Bei CD4 positiven T Zellen betrug dieser knapp vier. Als Positiv-Kontrolle diente das Chemokin CXCL12 α . Hier wurden Chemotaxis Indices von 4 (Dendritische Zelle) und knapp 3 (CD4 positive T Zellen) erreicht. Als Negativkontrolle und Normierung diente Chemokin-freies Chemotaxismedium.

3.3 Untersuchung der Emigration von Leukozyten in der Homöostase

In einem ersten Schritt wurde das nun etablierte Modell der Fotokonversion der linken Niere genutzt, um die Emigration von Leukozyten in der Homöostase, d.h. in der gesunden, nicht-nephritischen Maus zu untersuchen. Hierzu wurde bei Mäusen eine Fotokonversion der linken Niere, wie oben beschrieben durchgeführt. Die Organentnahme erfolgte 1, 3 oder 5 Tage nach Fotokonversion. Ausgewertet wurde der Prozentsatz an fotokonvertierten, also der im o.g. Zeitraum aus der Niere ausgewanderten Zellen im renalen Lymphknoten. Der inguinale Lymphknoten diente als Kontrolle.

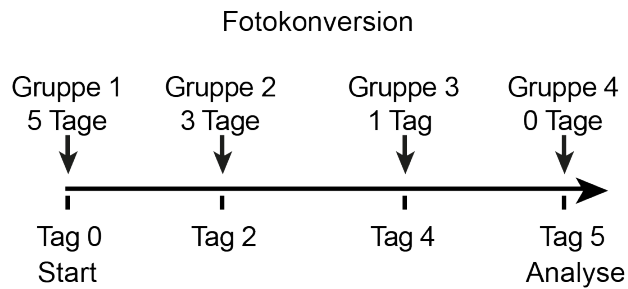


Abb. 10: Versuchsablauf der Zeitkinetik

Der Versuch wurde mit der Fotokonversion der ersten Gruppe fünf Tage vor Organentnahme begonnen, drei respektive einen Tag vor der Organentnahme wurden die Gruppen zwei und drei fotokonvertiert. Am Tag der Organentnahme erfolgte die Fotokonversion der letzten Gruppe.

Betrachtet wurden CD45⁺ Zellen insgesamt. Weiterhin wurden Subpopulationen von CD4⁺ T Zellen, CD8⁺ T Zellen, CD19⁺ B Zellen und Dendritischen Zellen (CD11c⁺MHC2⁺) ausgewertet. In der gesunden, d.h. nicht nephritischen Maus ließ sich lediglich eine Emigration von dendritischen Zellen in den renalen Lymphknoten nachweisen. Bei allen anderen Zellpopulationen bestand kein Unterschied bzgl. der Emigration.

Die maximale Emigration der dendritischen Zellen konnte 1 Tag nach Fotokonversion nachgewiesen werden. Hier betrug der Anteil im renalen Lymphknoten ca. 1 % und fiel zu den Zeitpunkten 3 und 5 Tage nach Fotokonversion auf 0,75 % und 0,5 % ab. Rechnet man die o.g. Prozentzahlen entsprechend der ca. 35%igen Fotokonversionsrate um, so stammen ca. 3 % der im renalen Lymphknoten vorhandenen dendritischen Zellen aus der Niere. Die Frequenzen an Kaede rot positiven Zellen im inguinalen Lymphknoten lagen bei ca. 0,1 - 0,2%.

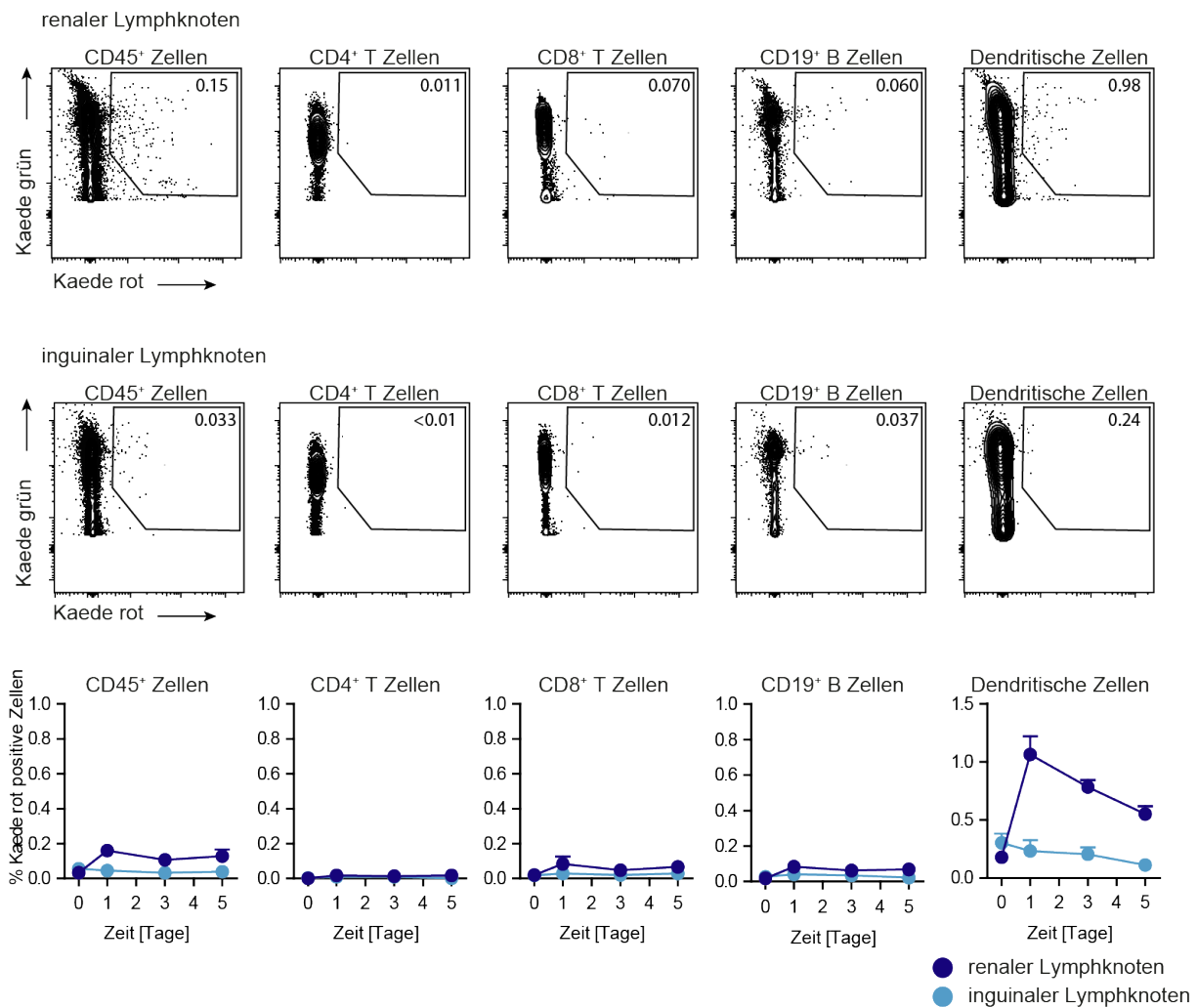


Abb. 11: FACS Blots und Statistik der Emigration in der Homöostase

Im oberen Teil der Abbildung wird der Anteil an fotokonvertierten Zellen von Leukozytensubpopulationen im renalen Lymphknoten drei Tage vor Organentnahme gezeigt, als Kontrolle ist im mittleren Teil der Abbildung gleiches für den inguinalen Lymphknoten dargestellt. Im unteren Teil ist die Quantifizierung über den Versuchszeitraum (Tage 5-0).

3.4 Untersuchung der Emigration von Leukozyten in der Inflammation (NTN)

In einem weiteren Schritt wurde die Emigration von Leukozyten im Modell der nephrotoxischen Nephritis (NTN-Modell) untersucht. Hierzu wurde zunächst eine Zeitkinetik über 10 Tage durchgeführt. Dabei wurde bei Mäusen an Tag 0 eine nephrotoxische Nephritis durch Injektion von 0,7ml nephrotoxischem Schafserum induziert. An Tag 3 wurde die Proteinurie als Surrogatparameter für die induzierte glomeruläre Schädigung semiquantitativ mittels Urin-Stix erfasst. Nicht nephritische Mäuse wurden aus dem Versuch entfernt. An Tag 5 wurde die erste Gruppe von Mäusen nach o.g. Prozedur fotokonvertiert. An Tag 7 erfolgte die 2. Gruppe und an

Tag 9 die 3. Gruppe. Die Organentnahme erfolgte einheitlich an Tag 10 nach NTN-Induktion (siehe Abb. 12).

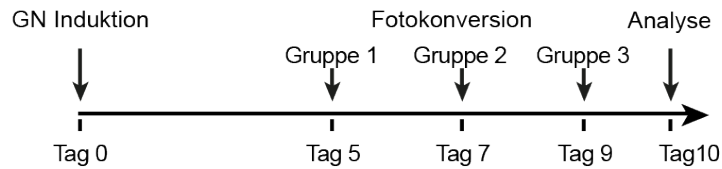


Abb. 12: Versuchsablauf der NTN Zeitkinetik

Für die Zeitkinetik wurde eine nephrotoxische Nephritis an Tag 0 (Versuchsstart) induziert, die Fotokonversion erfolgte fünf, sieben und neun Tage danach, die Organentnahme und Analyse an Tag 10.

Hier konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Homöostase, wo nur dendritische Zellen, aber keine T Zellen emigrieren, in der Inflammation eine Emigration von $CD4^+$ T Zellen stattfindet. Weiterhin konnten zeitabhängige Unterschiede in der Emigration nachgewiesen werden. So fand sich ein Maximum der Emigration, wenn die Fotokonversion sieben Tage nach NTN Induktion und die Organentnahme an Tag zehn nach NTN Induktion, also drei Tage nach Fotokonversion stattfand. Hier konnten 0,31 % fotokonvertierte $CD4^+$ T Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich hierzu fiel die Rate an detektierbaren fotokonvertierten T Zellen zu den anderen untersuchten Zeitpunkten deutlich ab.

Die Prozenzrate an emigrierten dendritischen Zellen war im Inflammationsmodell auf 8,6 Prozent gegenüber dem nicht nephritischen Zustand deutlich gesteigert. Auch ließen sich neben $CD4^+$ T Zellen auch emigrierte $CD19^+$ B Zellen und $CD8^+$ T Zellen nachweisen. Insgesamt waren ca. 0,4 Prozent aller $CD45^+$ Immunzellen fotokonvertiert.

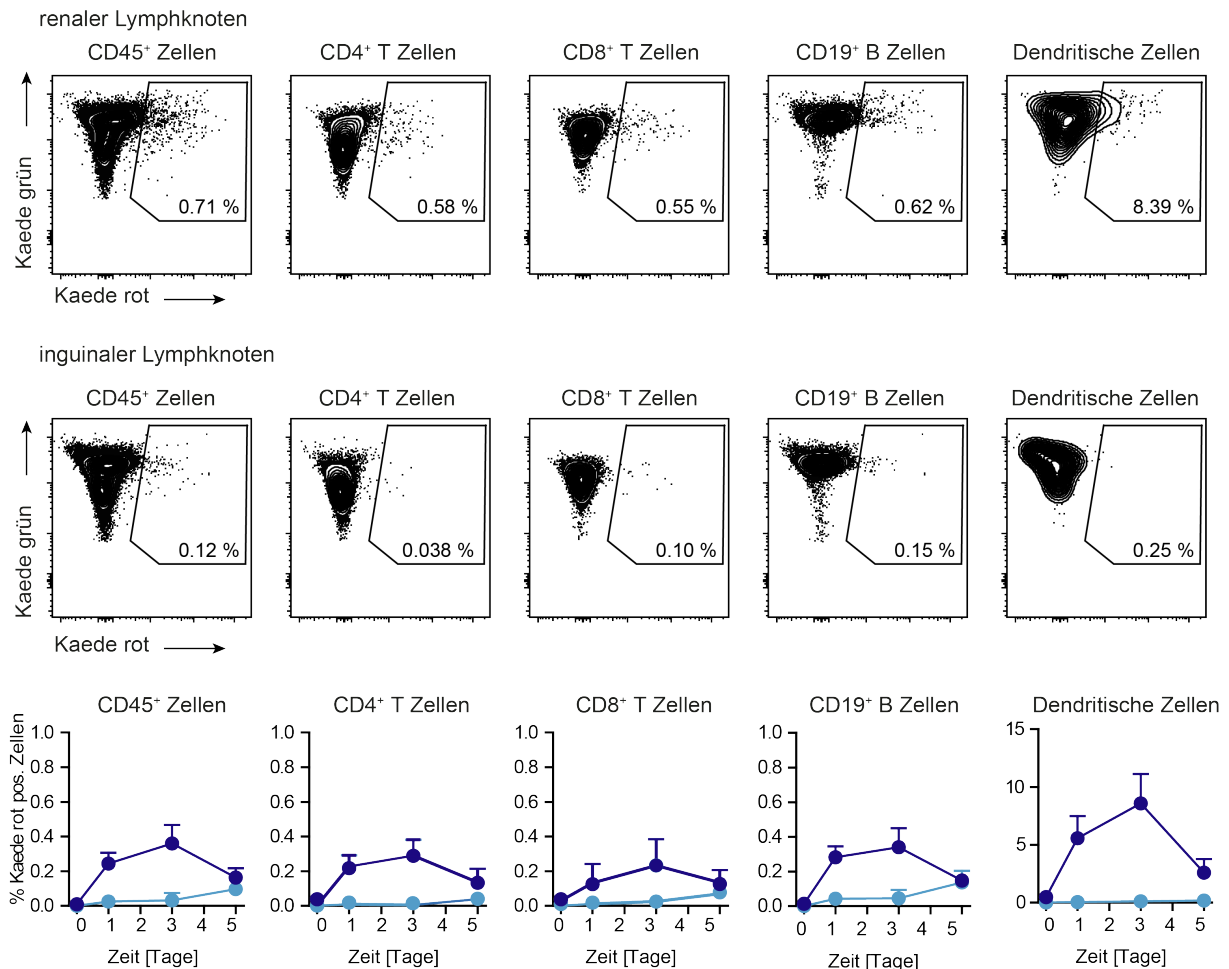


Abb. 13: FACS Blots und Statistik der NTN Zeitkinetik

Im oberen Teil der Abbildung wird der Anteil an fotokonvertierten Zellen von Leukozytensubpopulationen im renalen Lymphknoten drei Tage vor Organentnahme (sieben Tage nach NTN-Induktion) gezeigt, als Kontrolle ist im mittleren Teil der Abbildung gleiches für den inguinalen Lymphknoten dargestellt. Im unteren Teil ist die Quantifizierung über den Versuchszeitraum (Tage 5-0 vor Organentnahme).

3.5 Beeinflussung der Emigration durch Defizienz der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR7

In einem nächsten Schritt wurde die Emigration von Leukozyten in Kaede Mäusen mit der Emigration in Kaede Mäusen verglichen, welche einen Knock-out für einen, die Emigration möglicherweise beeinflussenden, Rezeptor tragen. Wie bereits erwähnt, ist eine Rolle des Chemokinrezeptors CCR7 bei der Emigration von T Zellen aus peripherem Gewebe vorbeschrieben. Daher wurde die bereits beschriebene Kaede transgene Maus mit einer CCR7^{-/-} Maus gekreuzt.

Zum Vergleich der Emigration im Inflammationsmodell der nephrotoxischen Nephritis wurde diese bei Kaede und bei Kaede * CCR7^{-/-} Mäusen induziert. An Tag 3 nach der NTN Induktion erfolgte ein Screening auf Proteinurie als Marker für die Aktivität der Erkrankung, nur proteinurische d.h. erkrankte Tiere wurden in den Versuch

aufgenommen. Am Tag sieben nach NTN Induktion wurde die Fotokonversion wie eingangs beschrieben durchgeführt. Die Organentnahme erfolgte am Tag 10, also 3 Tage nach der Fotokonversion, zu diesem Zeitpunkt war in vorangegangenen Versuchen das Maximum der Emigration detektiert worden. Wie in vorangegangenen Versuchen wurden renale und inguinale Lymphknoten, sowie die fotokonvertierte Niere entnommen.

In der FACS Analyse der Lymphknoten wurden folgende Parameter untersucht: CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD11b, CD11c, MHC2, CCR7, CXCR3.

Es zeigten sich in den Kaede Mäusen die vorbekannten Prozentzahlen an fotokonvertierten (d.h. emigrierten) Zellen. Im Vergleich hierzu konnten im renalen Lymphknoten der Kaede x CCR7^{-/-} Mäuse deutlich reduzierte Frequenzen an dendritischen Zellen, definiert als CD11c⁺MHC2⁺ doppelt positiv, detektiert werden. Im Gegensatz zu der initialen Hypothese, dass die Emigration von CD4 positiven T Zellen durch das Fehlen des Chemokinrezeptors CCR7 reduziert wird, zeigten sich keine verringerten Frequenzen an CD4⁺ Zellen. Die Frequenzen waren vergleichbar zu denen der Kaede Maus.

Die Frequenzen der dendritischen Zellen waren in den Kaede x CCR7^{-/-} Mäusen auf <1% deutlich reduziert. Die Frequenzen der anderen untersuchten Subpopulationen waren durch die Rezeptordefizienz nicht beeinflusst.

Die Analyse der während der Inflammationsreaktion emigrierten Zellen im renalen Lymphknoten zeigte eine deutliche Mehranreicherung von CXCR3⁺ T Zellen gegenüber den autochtonen (grünen) Zellen im Lymphknoten (siehe Abb. 14). Ca. 35 Prozent der Kaede roten Zellen trugen den Rezeptor CXCR3, bei den grünen Zellen war dies nur bei ca. 5 Prozent der Fall.

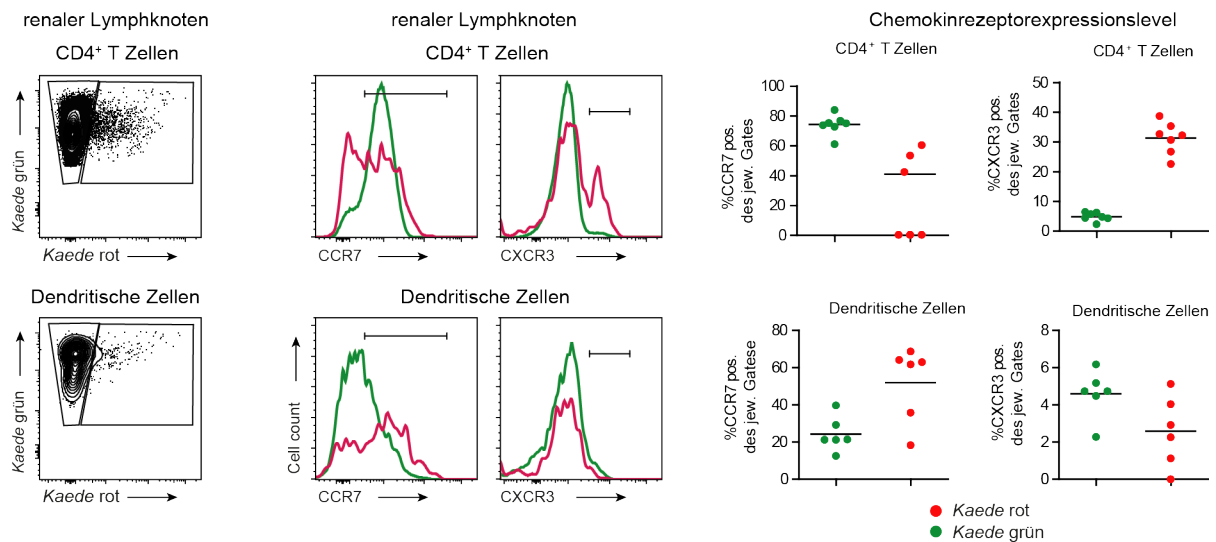


Abb. 14: Expression der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR3 auf CD4⁺ T Zellen und Dendritischen Zellen

Gezeigt ist die Expression (in Prozent) der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR3 auf emigrierten (Kaede rot positiven) und ortsständigen (Kaede rot negativen) CD4 T Zellen und Dendritischen Zellen im renalen Lymphknoten

Wir postulierten daher eine Rolle des Chemokinrezeptors CXCR3 in der Emigration von CD4⁺ T Zellen. Durch Kreuzung der Kaede transgenen Maus mit der CXCR3 knock-out Maus generierten wir Kaede x CXCR3^{-/-} Mäuse und verglichen die Emigration von Leukozyten. Hierzu wurde bei Kaede und bei Kaede x CXCR3^{-/-} Mäusen eine nephrotoxische Nephritis induziert. An Tag drei nach der NTN Induktion erfolgte ein Screening auf Proteinurie als Marker für die Aktivität der Erkrankung, nur proteinurische d.h. erkrankte Tiere wurden in den Versuch aufgenommen. An Tag sieben nach NTN Induktion wurde die Fotokonversion wie eingangs beschrieben durchgeführt. Die Organentnahme erfolgte an Tag zehn, also drei Tage nach der Fotokonversion, zu diesem Zeitpunkt war in vorangegangenen Versuchen das Maximum der Emigration detektiert worden. Wie in vorangegangenen Versuchen wurden renale und inguinale Lymphknoten, sowie die fotokonvertierte Niere entnommen.

In der FACS Analyse der Lymphknoten wurden folgende Parameter untersucht: CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD11b, CD11c, MHC2, CCR7, CXCR3.

In der Analyse der emigrierten Zellpopulationen ließ sich kein signifikanter Unterschied in zwischen den Kaede und den Kaede x CXCR3^{-/-} Mäusen nachweisen. So bestand zwar eine Tendenz zu niedrigeren Frequenzen von CD4⁺ T Zellen bei den Kaede x CXCR3^{-/-} Mäusen, jedoch war diese Tendenz nicht signifikant und kann zusätzlich der geringeren Infiltration von CD4⁺ T Zellen in den CXCR3^{-/-} Mäusen geschuldet sein.

Bei den anderen untersuchten Zellpopulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kaede und der Kaede x CXCR3^{-/-} Maus.

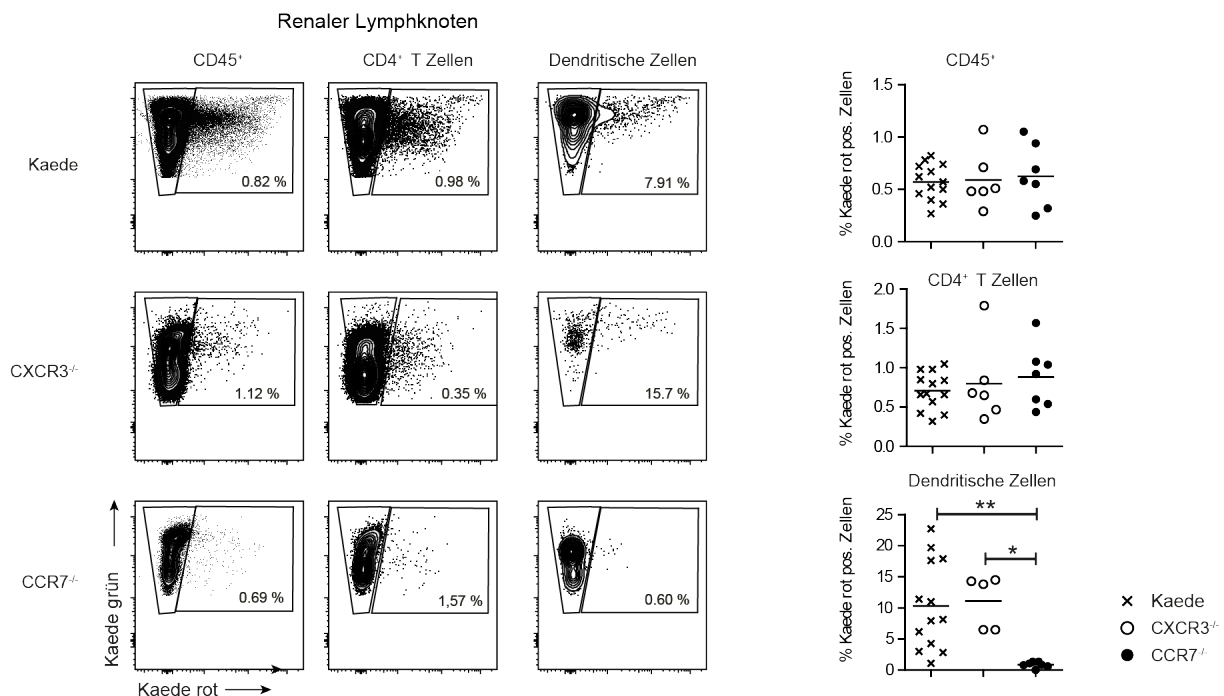


Abb. 15: Vergleich der Emigration von dendritischen Zellen und CD4⁺ T Zellen in Kaede x CXCR3^{-/-}, Kaede x CCR7^{-/-} und Kaede Mäusen

Gezeigt ist der Anteil an emigrierten CD4⁺ T Zellen und dendritischen Zellen im renalen Lymphknoten bei Kaede, Kaede x CCR7^{-/-} und Kaede x CXCR3^{-/-} Mäusen. Die Emigration von dendritischen Zellen ist bei CCR7^{-/-} Mäusen deutlich reduziert.

3.6 Nachweis von dendritischen Zellen und T Zellen in Lymphozelen

Lymphozelen können nach Nierentransplantationen in variablem Umfang auftreten und stellen Ansammlungen von Lymphflüssigkeit dar. Durch die Transplantation verlieren die Transplantatnieren ihren Anschluss an das Lymphsystem, daher kann es zur Flüssigkeitsansammlung im Empfänger kommen. In der Regel muss nur eine Verlaufskontrolle auf Größenprogredienz und keine Therapie erfolgen, da sie sich spontan regredient zeigen, ggf. muss Flüssigkeit abpunktiert werden. Wir gewannen solche Flüssigkeit und führten eine Färbung auf dendritische Zellen und T Zellen durch. Hier konnten dendritische Zellen und T Zelle nachgewiesen werden. Die Analyse des Chemokinrezeptorexpressionsprofils ergab eine Positivität von CCR7 und CXCR3. Hier zeigten 85,8 Prozent aller CD4⁺ T Zellen eine Positivität für CCR7 und 65,6 Prozent aller CD4⁺ Zellen für CXCR3.

Bei den dendritischen Zellen waren 3,01 % positiv für CCR7 und ca. 4,11 Prozent positiv für CXCR3.

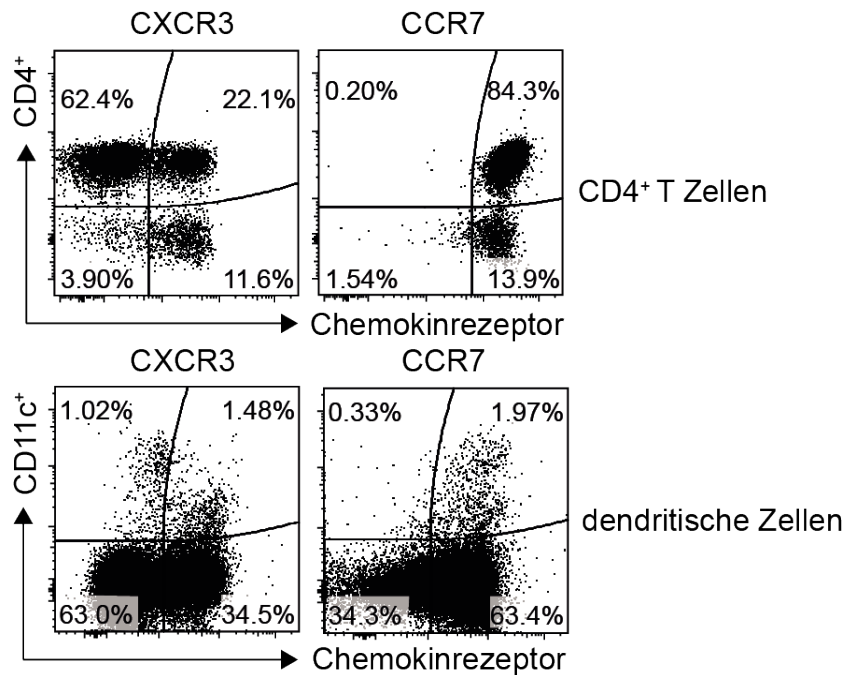


Abb. 16: FACS Analyse von CD4⁺ T Zellen und dendritischen Zellen aus einer Lymphozele auf Positivität der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR7

Gezeigt ist die auf der Abszisse die Positivität der Färbung von CD4⁺ T Zellen (oben) bzw. dendritischen Zellen (unten) auf die Chemokinrezeptoren CXCR3 (rechts) bzw. CCR7 (links).

4. Diskussion

Die Zirkulation von Leukozyten, insbesondere Lymphozyten durch den Körper stellt einen wesentlichen Mechanismus der körpereigenen Immunabwehr gegen pathogene Erreger als auch gegen maligne Erkrankungen dar. Durch eine Fehlregulation des Immunsystems kann es allerdings zu einer Reaktion des eigenen Körpers gegen sich selbst im Sinne einer Autoimmunerkrankung kommen. Die genauen Mechanismen die zu einem Verlust der Toleranz und damit zu autoimmunem Geschehen führen, sind nur unvollständig aufgeklärt.

Autoimmunerkrankungen haben eine steigende Inzidenz und Prävalenz, nahezu jedes Organsystem kann betroffen sein (Cooper et al., 2009). Die Verläufe sind unterschiedlich und reichen von asymptomatischen Verläufen bis hin zum Versagen wichtiger Organfunktionen (u.a. Leber, Nieren, Lunge, Gehirn) bis durch die Autoimmunerkrankung bedingten Tod.

In Bezug auf die Niere sind zahlreiche autoimmune Krankheiten bekannt, welche Nieren-spezifisch sein können, wie z.B. die Anti-GBM Glomerulonephritis oder die membranöse Glomerulonephritis. Andererseits kann die Niere im Rahmen von systemischen Erkrankungen mitbetroffen sein und ggf. das Prognose-bestimmende Organ sein (z.B. beim Systemischen Lupus erythematoses, SLE, ANCA-assoziierte Vaskulitis).

Die rapid progressiven Glomerulonephritiden stellen eine seltene Erkrankung dar, die allerdings, auch bei adäquater Therapie mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität einhergeht (Couser, 1999). Dabei ist die Pathogenese der rapid verlaufenden Glomerulonephritiden unvollständig verstanden. Als Mausmodell für diese aggressiven Verlaufsformen stellt die nephrotoxische Nephritis ein etabliertes und gut charakterisiertes Modell dar (Tipping and Holdsworth, 2006). So konnten in den vergangenen Jahren die Mechanismen der v.a. T Zell Infiltration besser charakterisiert und teilweise Nierenbiopsien von Patienten mit RPGN reproduziert werden (Kurts et al., 2013, Paust et al., 2016).

Allerdings ist in Bezug auf die Niere und das Modell der nephrotoxischen Nephritis zwar die Infiltration von pathogenen Zellen im Lauf der Inflammation und auch die Mechanismen der Endorganschädigung relativ gut charakterisiert (Panzer et al., 2007, Disteldorf et al., 2015). Mit Hilfe der Kaede-transgenen Maus konnte 2016 gezeigt werden, dass ein erheblicher Teil der pathogenen Th17 Zellen aus dem Darm stammen (Krebs et al., 2016a). Jedoch ist unklar, was, einmal in der Niere

angekommen, mit den Zellen geschieht. So sind verschiedene, wahrscheinlich parallel ablaufende Prozesse möglich. Ein Teil der Zellen wird, vermutlich durch aktuell nicht näher charakterisierte Prozesse in Apoptose gehen. Weiterhin gibt es Hinweise für eine Plastizität, also die Möglichkeit einer Umwandlung der einzelnen T-Zell Populationen untereinander. Dabei gibt es Hinweise für eine mögliche therapeutische Bedeutung einer Behandlung mit Anti-CD3 Antikörpern um die Stabilität von pathogenen Th17 Zellen zu beeinflussen (Krebs et al., 2016b).

Eine weitere, hier untersuchte Möglichkeit, besteht in einer Emigration von Leukozyten, insbesondere Lymphozyten aus der Niere heraus in sekundär-lymphatische Organe, wie z.B. den renalen Lymphknoten, wo sie möglicherweise mit anderen Immunzellen in Interaktion treten und den Entzündungsverlauf modulieren bzw. weiter durch den Körper zirkulieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst ein Modell für die Untersuchung der Emigration von Leukozyten aus der Niere etabliert werden. Bisherige Techniken für die Untersuchung der Emigration von Zellen sind stark invasiv und mit deutlicher Gewebeschädigung verbunden und daher nicht sinnvoll auf die Niere anwendbar. So ist die Emigration von T Zellen in der Haut initial mit CFSE gelabelten CD4⁺T Zellen untersucht worden. Debes et al. konnten zeigen, dass die Emigration von T Zellen aus der Haut abhängig von dem Chemokinrezeptor CCR7 ist (Debes et al., 2005). Allerdings geht die Technik der Injektion von Zellen in die Haut mit einer deutlichen Gewebeschädigung einher und die Validität dieser Technik wurde in Frage gestellt (Vander Lugt et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wird durch zur Hilfenahme der Kaede transgenen Maus ein weniger invasiver und gewebsschädigender Ansatz verfolgt um einen Einblick in die Emigration von Leukozyten aus der Niere zu erhalten.

Das Kaede-transgene Mausmodell wurde erstmals 2008 von Michio Tomura publiziert und seine Validität zur Nachverfolgung von Leukozyten konnte gezeigt werden (Tomura et al., 2008). Weiterhin wurde es benutzt um emigrierende T Zellen während kutaner Inflammationsreaktionen näher zu charakterisieren (Tomura et al., 2010). Hier konnte gezeigt werden, dass während kutaner Inflammationsreaktionen hauptsächlich regulatorische T Zellen aus dem Lymphknoten emigrieren und in die Rezirkulation eintreten. Diese Zellen können bei Reaktivierung von Inflammationsreaktionen auch distal der initialen Reaktion detektiert werden.

Ausgehend von dem Kaede Mausmodell wurde ein Versuchsaufbau etabliert, der zuverlässig eine intrarenale Fotokonversion ermöglichte und somit die Voraussetzungen schaffte für eine weitere Charakterisierung der in der Homöostase und während einer Inflamationsreaktion emigrierenden Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass in der Homöostase hauptsächlich dendritische Zellen und keine lymphatischen Zellen emigrieren. Allerdings muss man anmerken, dass in der gesunden, d.h. nicht entzündeten Niere nur wenige lymphatische Zellen vorhanden sind, sodass eine Emigration weiterhin möglich ist, die Sensitivität des Modells allerdings nicht ausreicht, um diese zu detektieren. Der Befund von in der Homöostase emigrierenden dendritischen Zellen ist gut mit der bekannten Literatur über die Emigration von Dendritischen Zellen aus peripherem Gewebe vereinbar und spricht für die Validität des von uns etablierten Modells (Ohl et al., 2004, Scheinecker et al., 2002, Martín-Fontecha et al., 2003).

In der Inflammationssituation im NTN Modell kommt es zu einer massiven Infiltration von Leukozyten in die Niere (Tipping and Holdsworth, 2006). Dabei spielt der Chemokinrezeptor CXCR3 eine entscheidende Rolle in der Infiltration von CD4 Zellen (Panzer et al., 2007). Der Verbleib dieser Zellen ist insgesamt unklar. Es gibt Hinweise für eine Plastizität von T Zellen während der Inflamationsreaktion (Krebs et al., 2016b).

Neben der Plastizität und Apoptose der infiltrierenden Zellen stellt sich die Frage nach einer Emigration, also einer Auswanderung von Leukozyten aus der Niere in den renalen Lymphknoten. Dieser Punkt wurde in der vorliegenden Arbeit adressiert.

Hierfür wurde zunächst ein Modell etabliert, dass die intrarenale Fotokonversion und damit die Möglichkeit zur Nachverfolgung von Zellen ermöglicht. Die fotokonvertierte Niere sowie die fotokonvertierten Zellen werden durch diese Prozedur nicht geschädigt oder in ihrer migratorischen Kapazität beeinträchtigt.

Es konnte gezeigt werden, dass es während der Inflamationsreaktion neben einer gesteigerten Emigration von dendritischen Zellen zu einer signifikanten Emigration von CD4⁺ T Zellen kommt.

Die Emigration von dendritischen Zellen ist stark abhängig vom Chemokinrezeptor CCR7. Bei Mäusen, denen dieser Rezeptor fehlt, ist nahezu keine Emigration von dendritischen Zellen in den renalen Lymphknoten feststellbar. Dies ist gut vereinbar mit den bereits bekannten Daten, die eine wesentliche Rolle des Chemokinrezeptors

CCR7 bei der Emigration von dendritischen Zellen aus peripherem entzündetem Gewebe in den regionären Lymphknoten zeigen (Worbs et al., 2017).

Interessant und unerwartet ist allerdings der Befund, dass der Chemokinrezeptor CCR7 auf T Zellen keine Rolle bei der Emigration von CD4 positiven T Zellen aus der Niere in den renalen Lymphknoten spielt. Bereits publizierte Daten aus Inflammationsmodellen der Haut gehen von einem wesentlichen Einfluss des Chemokinrezeptors CCR7 aus der Haut in den jeweils drainierenden Lymphknoten aus (Debes et al., 2005, Gomez et al., 2015, Teixeira et al., 2013). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CCR7 keinen Einfluss auf die Rezirkulation von sog. central memory T Zellen hat (Vander Lugt et al., 2013). Die Emigration von T Zellen aus peripherem Gewebe scheint also durchaus komplexer reguliert zu sein.

Die Rolle der lymphatischen Endothelien ist ebenfalls aktuell nur unzureichend verstanden, so exprimieren diese die Chemokinliganden, an Hand dessen Gradienten die Immunzellen in den drainierenden lokalen Lymphknoten gleitet werden. In der Homöostase können Leukozyten durch „Gaps“ in der Basalmembran Integrin-unabhängig in die lymphatischen Kapillaren eintreten. Dieser Prozess scheint weitestgehend vom Chemokinliganden CCL21 abzuhängen (Teixeira et al., 2013). Im Rahmen einer Inflammationsreaktion kommt es zu einer komplexeren Regulation der Emigration von Leukozyten, die Bedeutung von Integrinen und anderen Chemokinen neben CCL21 scheint an Bedeutung zu zunehmen (Vigl et al., 2011). Daher kann man sich mehrere mögliche Mechanismen der T Zell Emigration vorstellen. So können möglicherweise andere Chemokine in der Niere die Rolle von CCR7 bei der Emigration von T Zellen übernehmen. Daneben ist eine Redundanz von Chemokinrezeptoren denkbar.

Schließlich kann auch eine Chemokin-unabhängiger Prozess z.B. mediiert durch den Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor vorliegen. Hier sind weitere Untersuchungen zur Klärung der genauen Mechanismen der T Zelle Emigration in der entzündeten Niere notwendig.

5. Zusammenfassung

Glomerulonephritiden stellen eine der häufigsten Ursachen für eine terminale Niereninsuffizienz dar. Die dabei beobachtete Infiltration von Leukozyten ist ein wichtiges Kennzeichen der humanen und experimentellen Glomerulonephritiden. In den letzten Jahren konnte in mehreren Arbeiten die Infiltration von Neutrophilen, Makrophagen, dendritische Zellen und unterschiedlichen T Zell Populationen in die Niere funktionell charakterisiert werden. Allerdings ist der Verbleib von infiltrierenden Entzündungszellen weitestgehend unbekannt.

Mit Kaede-transgenen Mäusen stehen genetisch modifizierte Mäuse zur Verfügung, die es erstmalig erlaubt haben, Zellen in der Niere über einen Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. In renalen Zellen kann ein Fluoreszenzprotein (Kaede) mit einer Lichtquelle von grüner in rote Fluoreszenz umgewandelt werden. Mit Hilfe dieser Maus haben wir die Migration von Leukozyten aus der Niere heraus in sekundär lymphatische Gewebe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Emigration von dendritischen Zellen in den drainierenden renalen Lymphknoten sowohl in der Homöostase als auch im Inflammationsmodell der nephrotoxischen Nephritis (NTN) elementar vom Chemokinrezeptor CCR7 abhängig ist.

Die Emigration von CD4⁺ T Zellen ließ sich nur während der Inflammation nachweisen, in der Homöostase ließ sich keine T Zell Emigration nachweisen.

Die Emigration von dendritischen Zellen hing sowohl in der Homöostase als auch in der Inflammation elementar vom Chemokinrezeptor CCR7 ab, dieser Befund deckt sich mit der bekannten Literatur und spricht für die Validität des etablierten Modells.

Unerwarteterweise hing die Emigration von CD4⁺T Zellen aus der Niere in den drainierenden Lymphknoten (im Gegensatz zu anderem peripherem Gewebe, wie z.B. der Haut) während der Inflammation nicht vom Chemokinrezeptor CCR7 ab. Obwohl die Analyse der emigrierten Zellen im lokoregionären Lymphknoten eine starke Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 zeigte, hatte auch dieser Rezeptor keinen signifikanten Einfluss auf die Emigration von CD4 positiven T Zellen. Wir gehen daher von einem komplexeren, bisher unverstandenen Mechanismus der T Zell Emigration im Rahmen der Inflammationsreaktion der Niere im NTN Modell aus.

6. Summary

Glomerulonephritides are one of the most common causes of end stage renal failure. The observed infiltration of leukocytes is an important hallmark of human and experimental glomerulonephritis. In recent years, the infiltration of neutrophils, macrophages, dendritic cells and various T cell populations into the kidney has been functionally characterized. However, the whereabouts of infiltrating inflammatory cells is largely unknown.

Kaede transgenic mice are genetically modified mice that have for the first time allowed to mark cells in the kidney via a fluorescent dye. In the kidney, infiltrating cells containing a fluorescent protein (Kaede) can be converted with a light source from green to red fluorescence. Using this mouse, we studied the migration of leukocytes from the kidney into secondary lymphoid tissues. It has been shown that the emigration of dendritic cells in draining renal lymph nodes is fundamentally dependent on the chemokine receptor CCR7 in both the homeostasis and the inflammatory model of nephrotoxic nephritis (NTN).

The emigration of CD4⁺ T cells could only be detected during the inflammation, in the homeostasis we did not detect T cell emigration.

Emigration of dendritic cells in both homeostasis and inflammation depended on the chemokine receptor CCR7, which is consistent with known literature and supports the validity of the established model.

Unexpectedly, the emigration of CD4⁺ T cells from the kidney in draining lymph nodes (unlike other peripheral tissues, such as the skin) during inflammation did not depend on the chemokine receptor CCR7. Although analysis of the emigrated cells in the locoregional lymph node showed strong expression of the chemokine receptor CXCR3, this receptor also had no significant influence on the migration of CD4⁺ T cells. We therefore assume a more complex, as yet misunderstood, mechanism of T cell emigration as part of the kidney inflammatory response in the NTN model.

7. Abkürzungsverzeichnis

ANCA	Anti-neutrophile cytoplasmatische Antikörper
CCL/CXCL	Chemokine Ligand
CCR/CXCR	Chemokine receptor
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
DNA	Desoxyribunucleic acid
eGPA	eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	fluorochrome-activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IL	Interleukin
MACS	Magnetic cell separation
MPA	Mikroskopische Polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
MHC2	Major Histocompatibility Complex 2
NTN	Nephrotoxische Nephritis
RNA	Ribunucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
PR-3	Proteinase-3
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
Th	T Helfer Zellen
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VTH	Forschungstierhaltung des UKE

8. Literaturverzeichnis

- ABDULAHAD, W. H., LAMPRECHT, P. & KALLENBERG, C. G. 2011. T-helper cells as new players in ANCA-associated vasculitides. *Arthritis Res Ther*, 13, 236.
- ALLEN, S. J., CROWN, S. E. & HANDEL, T. M. 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*, 25, 787-820.
- ANDO, R., HAMA, H., YAMAMOTO-HINO, M., MIZUNO, H. & MIYAWAKI, A. 2002. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12651-6.
- ANGANGCO, R., THIRU, S., ESNAULT, V. L., SHORT, A. K., LOCKWOOD, C. M. & OLIVEIRA, D. B. 1994. Does truly 'idiopathic' crescentic glomerulonephritis exist? *Nephrol Dial Transplant*, 9, 630-6.
- BACON, K., BAGGIOLINI, M., BROXMEYER, H., HORUK, R., LINDLEY, I., MANTOVANI, A., MAYSUSHIMA, K., MURPHY, P., NOMIYAMA, H., OPPENHEIM, J., ROT, A., SCHALL, T., TSANG, M., THORPE, R., VAN DAMME, J., WADHWA, M., YOSHIE, O., ZLOTNIK, A., ZOON, K. & NOMENCLATURE, I. W. S. O. C. 2002. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res*, 22, 1067-8.
- BIRKENBACH, M., JOSEFSEN, K., YALAMANCHILI, R., LENOIR, G. & KIEFF, E. 1993. Epstein-Barr virus-induced genes: first lymphocyte-specific G protein-coupled peptide receptors. *J Virol*, 67, 2209-20.
- BOLTON, W. K. 1996. Rapidly progressive glomerulonephritis. *Semin Nephrol*, 16, 517-26.
- BOSCH, X. 2011. Systemic lupus erythematosus and the neutrophil. *N Engl J Med*, 365, 758-60.
- BROMLEY, S. K., MEMPEL, T. R. & LUSTER, A. D. 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol*, 9, 970-80.
- CHADBAN, S. J. & ATKINS, R. C. 2005. Glomerulonephritis. *Lancet*, 365, 1797-806.
- CHEN, M. & KALLENBERG, C. G. 2010. ANCA-associated vasculitides--advances in pathogenesis and treatment. *Nat Rev Rheumatol*, 6, 653-64.
- COMERFORD, I., HARATA-LEE, Y., BUNTING, M. D., GREGOR, C., KARA, E. E. & MCCOLL, S. R. 2013. A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine Growth Factor Rev*, 24, 269-83.
- COOPER, G. S., BYNUM, M. L. & SOMERS, E. C. 2009. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *J Autoimmun*, 33, 197-207.
- COUSER, W. G. 1999. Glomerulonephritis. *Lancet*, 353, 1509-15.
- COUSER, W. G. 2012. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*, 23, 381-99.
- COUSER, W. G. & ABRASS, C. K. 1988. Pathogenesis of membranous nephropathy. *Annu Rev Med*, 39, 517-30.
- DEBES, G. F., ARNOLD, C. N., YOUNG, A. J., KRAUTWALD, S., LIPP, M., HAY, J. B. & BUTCHER, E. C. 2005. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nat Immunol*, 6, 889-94.
- DISTELDORF, E. M., KREBS, C. F., PAUST, H. J., TURNER, J. E., NOUAILLES, G., TITTEL, A., MEYER-SCHWESINGER, C., STEGE, G., BRIX, S., VELDEN, J., WIECH, T., HELMCHEN, U., STEINMETZ, O. M., PETERS, A., BENNSTEIN, S. B., KAFFKE, A., LLANTO, C., LIRA, S. A., MITTRUCKER, H. W., STAHL,

- R. A., KURTS, C., KAUFMANN, S. H. & PANZER, U. 2015. CXCL5 drives neutrophil recruitment in TH17-mediated GN. *J Am Soc Nephrol*, 26, 55-66.
- FERNANDEZ, E. J. & LOLIS, E. 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 469-99.
- FORSTER, R., DAVALOS-MISLITZ, A. C. & ROT, A. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*, 8, 362-71.
- GOMEZ, D., DIEHL, M. C., CROSBY, E. J., WEINKOPFF, T. & DEBES, G. F. 2015. Effector T Cell Egress via Afferent Lymph Modulates Local Tissue Inflammation. *J Immunol*, 195, 3531-6.
- GRIFFITH, J. W., SOKOL, C. L. & LUSTER, A. D. 2014. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*, 32, 659-702.
- GROOM, J. R. & LUSTER, A. D. 2011a. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*, 317, 620-31.
- GROOM, J. R. & LUSTER, A. D. 2011b. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol*, 89, 207-15.
- HAUSER, M. A. & LEGLER, D. F. 2016. Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes. *J Leukoc Biol*, 99, 869-82.
- JENNETTE, J. C., FALK, R. J., HU, P. & XIAO, H. 2013. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated small-vessel vasculitis. *Annu Rev Pathol*, 8, 139-60.
- KAIN, R., EXNER, M., BRANDES, R., ZIEBERMAYR, R., CUNNINGHAM, D., ALDERSON, C. A., DAVIDOVITS, A., RAAB, I., JAHN, R., ASHOUR, O., SPITZAUER, S., SUNDER-PLASSMANN, G., FUKUDA, M., KLEMM, P., REES, A. J. & KERJASCHKI, D. 2008. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med*, 14, 1088-96.
- KESSENBROCK, K., KRUMBHOLZ, M., SCHONERMARCK, U., BACK, W., GROSS, W. L., WERB, Z., GRONE, H. J., BRINKMANN, V. & JENNE, D. E. 2009. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*, 15, 623-5.
- KIM, N. D. & LUSTER, A. D. 2015. The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. *Trends Immunol*, 36, 547-55.
- KOCH, M. A., TUCKER-HEARD, G., PERDUE, N. R., KILLEBREW, J. R., URDAHL, K. B. & CAMPBELL, D. J. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*, 10, 595-602.
- KOHOUT, T. A., NICHOLAS, S. L., PERRY, S. J., REINHART, G., JUNGER, S. & STRUTHERS, R. S. 2004. Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J Biol Chem*, 279, 23214-22.
- KREBS, C. F., PAUST, H. J., KROHN, S., KOYRO, T., BRIX, S. R., RIEDEL, J. H., BARTSCH, P., WIECH, T., MEYER-SCHWESINGER, C., HUANG, J., FISCHER, N., BUSCH, P., MITTRUCKER, H. W., STEINHOFF, U., STOCKINGER, B., PEREZ, L. G., WENZEL, U. O., JANNECK, M., STEINMETZ, O. M., GAGLIANI, N., STAHL, R. A., HUBER, S., TURNER, J. E. & PANZER, U. 2016a. Autoimmune Renal Disease Is Exacerbated by S1P-Receptor-1-Dependent Intestinal Th17 Cell Migration to the Kidney. *Immunity*, 45, 1078-1092.

- KREBS, C. F., TURNER, J. E., PAUST, H. J., KAPFFER, S., KOYRO, T., KROHN, S., UFER, F., FRIESE, M. A., FLAVELL, R. A., STOCKINGER, B., STEINMETZ, O. M., STAHL, R. A., HUBER, S. & PANZER, U. 2016b. Plasticity of Th17 Cells in Autoimmune Kidney Diseases. *J Immunol*, 197, 449-57.
- KURTS, C., PANZER, U., ANDERS, H. J. & REES, A. J. 2013. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol*, 13, 738-53.
- LIAN, J. & LUSTER, A. D. 2015. Chemokine-guided cell positioning in the lymph node orchestrates the generation of adaptive immune responses. *Curr Opin Cell Biol*, 36, 1-6.
- LYONS, P. A., RAYNER, T. F., TRIVEDI, S., HOLLE, J. U., WATTS, R. A., JAYNE, D. R., BASLUND, B., BRENCHELY, P., BRUCHFELD, A., CHAUDHRY, A. N., COHEN TERVAERT, J. W., DELOUKAS, P., FEIGHERY, C., GROSS, W. L., GUILLEVIN, L., GUNNARSSON, I., HARPER, L., HRUSKOVA, Z., LITTLE, M. A., MARTORANA, D., NEUMANN, T., OHLSSON, S., PADMANABHAN, S., PUSEY, C. D., SALAMA, A. D., SANDERS, J. S., SAVAGE, C. O., SEGELMARK, M., STEGEMAN, C. A., TESAR, V., VAGLIO, A., WIECZOREK, S., WILDE, B., ZWERINA, J., REES, A. J., CLAYTON, D. G. & SMITH, K. G. 2012. Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med*, 367, 214-23.
- MAGHAZACHI, A. A. 2005. Insights into seven and single transmembrane-spanning domain receptors and their signaling pathways in human natural killer cells. *Pharmacol Rev*, 57, 339-57.
- MARTIN-FONTECHA, A., SEBASTIANI, S., HOPKEN, U. E., UGUCCIONI, M., LIPP, M., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2003. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med*, 198, 615-21.
- MASOPIUST, D. & SCHENKEL, J. M. 2013. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol*, 13, 309-20.
- OHL, L., MOHAUPT, M., CZELOTH, N., HINTZEN, G., KIAFARD, Z., ZWIRNER, J., BLANKENSTEIN, T., HENNING, G. & FORSTER, R. 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, 21, 279-88.
- OOI, J. D., HOLDSWORTH, S. R. & KITCHING, A. R. 2008. Advances in the pathogenesis of Goodpasture's disease: from epitopes to autoantibodies to effector T cells. *J Autoimmun*, 31, 295-300.
- PANZER, U., STEINMETZ, O. M., PAUST, H. J., MEYER-SCHWESINGER, C., PETERS, A., TURNER, J. E., ZAHNER, G., HEYMANN, F., KURTS, C., HOPFER, H., HELMCHEN, U., HAAG, F., SCHNEIDER, A. & STAHL, R. A. 2007. Chemokine receptor CXCR3 mediates T cell recruitment and tissue injury in nephrotoxic nephritis in mice. *J Am Soc Nephrol*, 18, 2071-84.
- PAUST, H. J., RIEDEL, J. H., KREBS, C. F., TURNER, J. E., BRIX, S. R., KROHN, S., VELDEN, J., WIECH, T., KAFFKE, A., PETERS, A., BENNSTEIN, S. B., KAPFFER, S., MEYER-SCHWESINGER, C., WEGSCHEID, C., TIEGS, G., THAISS, F., MITTRUCKER, H. W., STEINMETZ, O. M., STAHL, R. A. & PANZER, U. 2016. CXCR3+ Regulatory T Cells Control TH1 Responses in Crescentic GN. *J Am Soc Nephrol*, 27, 1933-42.
- PAUST, H. J., TURNER, J. E., RIEDEL, J. H., DISTELDORF, E., PETERS, A., SCHMIDT, T., KREBS, C., VELDEN, J., MITTRUCKER, H. W., STEINMETZ, O. M., STAHL, R. A. & PANZER, U. 2012. Chemokines play a critical role in

- the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*, 82, 72-83.
- PEDCHENKO, V., BONDAR, O., FOGO, A. B., VANACORE, R., VOZIYAN, P., KITCHING, A. R., WIESLANDER, J., KASHTAN, C., BORZA, D. B., NEILSON, E. G., WILSON, C. B. & HUDSON, B. G. 2010. Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis. *N Engl J Med*, 363, 343-54.
- PHELPS, R. G. & REES, A. J. 1999. The HLA complex in Goodpasture's disease: a model for analyzing susceptibility to autoimmunity. *Kidney Int*, 56, 1638-53.
- QIN, S., ROTTMAN, J. B., MYERS, P., KASSAM, N., WEINBLATT, M., LOETSCHER, M., KOCH, A. E., MOSER, B. & MACKAY, C. R. 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest*, 101, 746-54.
- REYNOLDS, J. 2011. Strain differences and the genetic basis of experimental autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Int J Exp Pathol*, 92, 211-7.
- ROTH, A. J., BROWN, M. C., SMITH, R. N., BADHWAR, A. K., PARENTE, O., CHUNG, H., BUNCH, D. O., MCGREGOR, J. G., HOGAN, S. L., HU, Y., YANG, J. J., BERG, E. A., NILES, J., JENNETTE, J. C., PRESTON, G. A. & FALK, R. J. 2012. Anti-LAMP-2 antibodies are not prevalent in patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 23, 545-55.
- RUTH, A. J., KITCHING, A. R., KWAN, R. Y., ODOBASIC, D., OOI, J. D., TIMOSHANKO, J. R., HICKEY, M. J. & HOLDSWORTH, S. R. 2006. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and effector CD4+ cells play nonredundant roles in anti-myeloperoxidase crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 17, 1940-9.
- SCHEINECKER, C., MCHUGH, R., SHEVACH, E. M. & GERMAIN, R. N. 2002. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med*, 196, 1079-90.
- SEGERER, S. 2003. The role of chemokines and chemokine receptors in progressive renal diseases. *Am J Kidney Dis*, 41, S15-8.
- SHIELDS, P. L., MORLAND, C. M., SALMON, M., QIN, S., HUBSCHER, S. G. & ADAMS, D. H. 1999. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol*, 163, 6236-43.
- SOKOL, C. L. & LUSTER, A. D. 2015. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.
- TADEMA, H., KALLENBERG, C. G., STEGEMAN, C. A. & HEERINGA, P. 2011. Reactivity against complementary proteinase-3 is not increased in patients with PR3-ANCA-associated vasculitis. *PLoS One*, 6, e17972.
- TEIJEIRA, A., ROUZAUT, A. & MELERO, I. 2013. Initial afferent lymphatic vessels controlling outbound leukocyte traffic from skin to lymph nodes. *Front Immunol*, 4, 433.
- TIPPING, P. G. & HOLDSWORTH, S. R. 2006. T cells in crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 17, 1253-63.
- TOKUNAGA, R., ZHANG, W., NASEEM, M., PUCCINI, A., BERGER, M. D., SONI, S., MCSKANE, M., BABA, H. & LENZ, H. J. 2018. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev*, 63, 40-47.

- TOMURA, M., HONDA, T., TANIZAKI, H., OTSUKA, A., EGAWA, G., TOKURA, Y., WALDMANN, H., HORI, S., CYSTER, J. G., WATANABE, T., MIYACHI, Y., KANAGAWA, O. & KABASHIMA, K. 2010. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest*, 120, 883-93.
- TOMURA, M., YOSHIDA, N., TANAKA, J., KARASAWA, S., MIWA, Y., MIYAWAKI, A. & KANAGAWA, O. 2008. Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein "Kaede" transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10871-6.
- TURNER, J. E., KREBS, C., TITTEL, A. P., PAUST, H. J., MEYER-SCHWESINGER, C., BENNSTEIN, S. B., STEINMETZ, O. M., PRINZ, I., MAGNUS, T., KORN, T., STAHL, R. A., KURTS, C. & PANZER, U. 2012. IL-17A production by renal gammadelta T cells promotes kidney injury in crescentic GN. *J Am Soc Nephrol*, 23, 1486-95.
- VAN AMELSFORT, J. M., JACOBS, K. M., BIJLSMA, J. W., LAFEBER, F. P. & TAAMS, L. S. 2004. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*, 50, 2775-85.
- VAN AMELSFORT, J. M., VAN ROON, J. A., NOORDEGRAAF, M., JACOBS, K. M., BIJLSMA, J. W., LAFEBER, F. P. & TAAMS, L. S. 2007. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+,CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 56, 732-42.
- VANDER LUGT, B., TUBO, N. J., NIZZA, S. T., BOES, M., MALISSEN, B., FUHLBRIGGE, R. C., KUPPER, T. S. & CAMPBELL, J. J. 2013. CCR7 plays no appreciable role in trafficking of central memory CD4 T cells to lymph nodes. *J Immunol*, 191, 3119-27.
- VELDEN, J., PAUST, H. J., HOXHA, E., TURNER, J. E., STEINMETZ, O. M., WOLF, G., JABS, W. J., OZCAN, F., BEIGE, J., HEERING, P. J., SCHRODER, S., KNEISSLER, U., DISTELDORF, E., MITTRUCKER, H. W., STAHL, R. A., HELMCHEN, U. & PANZER, U. 2012. Renal IL-17 expression in human ANCA-associated glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302, F1663-73.
- VIGL, B., AEBISCHER, D., NITSCHKE, M., IOLYEVA, M., ROTHLIN, T., ANTSEFEROVA, O. & HALIN, C. 2011. Tissue inflammation modulates gene expression of lymphatic endothelial cells and dendritic cell migration in a stimulus-dependent manner. *Blood*, 118, 205-15.
- WORBS, T., HAMMERSCHMIDT, S. I. & FORSTER, R. 2017. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 17, 30-48.
- ZLOTNIK, A. & YOSHIE, O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12, 121-7.
- ZLOTNIK, A. & YOSHIE, O. 2012. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 36, 705-16.
- ZLOTNIK, A., YOSHIE, O. & NOMIYAMA, H. 2006. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol*, 7, 243.

9. Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne das Zutuen und die tatkräftige Unterstützung vieler Anderer.

Danken möchte ich den Klinikdirektoren der III. Medizinischen Klinik Herrn Prof. Dr. med. Rolf A.K. Stahl (bis 12/2016) und Herrn Prof. Dr. med. Tobias B. Huber (seit 04/2017) für die Möglichkeit, diese Dissertationsarbeit in der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik anfertigen zu dürfen.

Der Werner-Otto Stiftung danke ich für die großzügige finanzielle Förderung im Rahmen des Werner-Otto Promotionsstipendiums.

Herrn Prof. Dr. med. Ulf Panzer möchte ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, das entgegengebrachte Vertrauen, die allzeitige Unterstützung und ständige Ansprechbarkeit sehr herzlich danken.

Herrn PD Dr. med. Christian Krebs möchte ich für die überragende Betreuung, das entgegengebrachte Vertrauen, die Geduld und das immer offene Ohr besonders danken. Ich habe mich zu jeder Zeit unter seiner wissenschaftlichen Anleitung sicher und wohl gefühlt. Besonders danken möchte ich ihm für seine verständnis- und vertrauensvolle ruhige Art.

Herrn Dr. rer. nat. Hans-Joachim Paust danke ich für seine tatkräftige Unterstützung beim Erlernen und Durchführen von FACS Analysen und Färbungen, aber auch bereichernde fachliche und nichtfachliche Diskussionen.

Für die kompetente praktische Einarbeitung im Labor, tatkräftige technische Unterstützung und besonders für ihre freundliche und aufgeschlossene Art möchte ich mich bei Anett Peters und Anna Kaffke bedanken.

Frau Dr. rer. nat. Sonja Krohn danke ich besonders für die Hilfestellung beim Erlernen und Durchführen von chemotaktischen Assays.

Für ebenfalls technische Unterstützung aber vor allem Rat und Tat in den verschiedenen Phasen der Dissertationsarbeit danke ich Dr. med. Sonja Kapffer und Dr. med. Tilmann Schmidt.

Meinen Eltern Gerlinde und Detlef Koyro, meiner Schwester Katharina Koyro danke ich für ihre unbedingte Liebe und Unterstützung ihres nicht immer einfachen Sohnes/Bruders in allen Lebenslagen.

10. Publikationen

Autoimmune Renal Disease Is Exacerbated by S1P-Receptor-1-Dependent Intestinal Th17 Cell Migration to the Kidney

Krebs CF, Paust HJ, Krohn S, **Koyro T**, Brix SR, Riedel JH, Bartsch P, Wiech T, Meyer-Schwesinger C, Huang J, Fischer N, Busch P, Mittrücker HW, Steinhoff U, Stockinger B, Perez LG, Wenzel UO, Janneck M, Steinmetz OM, Gagliani N, Stahl RA, Huber S, Turner JE, Panzer U

Immunity. 2016 Nov 15;45(5):1078-1092

Plasticity of Th17 Cells in Autoimmune Kidney Diseases

Krebs CF, Turner JE, Paust HJ, Kapffer S, **Koyro T**, Krohn S, Ufer F, Frieze MA, Flavell RA, Stockinger B, Steinmetz OM, Stahl RA, Huber S, Panzer U

J Immunol. 2016 Jul 15;197(2):449-57

Function of the Th17/interleukin-17A immune response in murine lupus nephritis

Schmidt T, Paust HJ, Krebs CF, Turner JE, Kaffke A, Bennstein SB, **Koyro T**, Peters A, Velden J, Hünemörder S, Haag F, Steinmetz OM, Mittrücker HW, Stahl RA, Panzer U

Arthritis Rheumatol. 2015 Feb;67(2):475-87

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: