Die Regulation der Immunantwort bei entzündlichen Nierenerkrankungen durch das Zytokin IL-6 und Amphiregulin

Kumulative Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. Nat.) an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

Vorgelegt von Julia Hagenstein (geb. 27.08.1990)

Hamburg 2021

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Steinmetz

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Streit

Datum der Disputation: 23.04.2021

Prüfungskommission: Prof. Dr. Oliver Steinmetz
Prof. Dr. Wolfgang Streit
Prof. Dr. Tim Gilberger

Vorsitz: PD Dr. Hartwig Lüthen

Inhalt

1. Einleitung 2
1.1. Glomerulonephritis 2
1.2. Immunzellen in der Glomerulonephritis 3
1.2.1. Th17-Zellen 4
1.2.2. Regulatorische T-Zellen 6
1.2.3. Monozyten/Makrophagen 9
1.3. Interleukin 6 und seine Signalwege 10
1.4. Amphiregulin 14
2. Material und Methoden 20
3. Diskussion 21
3.1. Neue Rolle des klassischen IL-6R Signalwegs bei der GN 21
3.2. Die Rolle von Amphiregulin bei der akuten GN 27
3.3. Fazit 34
4. Zusammenfassung 37
5. Summary 39
6. Literaturverzeichnis 41
7. Angaben zum individuellen Anteil 48
8. Danksagung 49
9. Eidesstattliche Erklärung 50
10. Anhang 51

1. Einleitung

1.1. Glomerulonephritis

Der Begriff der Glomerulonephritis (GN) umfasst verschiedene immunvermittelte Erkrankungen, deren gemeinsames Merkmal eine Entzündung in den Nierenkörperchen (Glomeruli) und konsekutiv weiteren Bestandteilen des Nierengewebes ist. Die Glomeruli sind Bestandteil der Nephrone, welche die funktionellen Untereinheiten des Nierengewebes bilden. Im Glomerulus wird der sogenannte Primärharn gebildet, indem das eingetretene Plasma aus dem Gefäßsystem filtriert wird. Die Aufkonzentrierung des Primärharnes durch Rückresorptionsmechanismen findet dann im sich anschließenden Tubulusapparat statt. Damit werden ca. 80% des Primärharns wieder in den Blutkreislauf rücküberführt. Kommt es zur Schädigung der Glomeruli, ist, je nach Ausprägung, die Filterfunktion reduziert oder im Extremfall gar nicht mehr vorhanden[1]. In letzterem Fall spricht man dann von einem terminalen Nierenversagen. Die GN ist neben Diabetes und Bluthochdruck eine der häufigsten Ursachen für die terminale Niereninsuffizienz und geht mit einer hohen Mortalität und Morbidität einher. In Europa und den USA ist die GN bei ungefähr 10-15% der Patienten ursächlich für Ihren terminalen Nierenschaden[2, 3].

Innerhalb der Gruppe der GNs gibt es verschiedene Unterformen, die sich im klinischen Verlauf und den anatomisch betroffenen Bestandteilen des Glomerulus unterscheiden. Die Unterteilung dieser heterogenen Erkrankungsgruppe kann nach verschiedenen Aspekten vorgenommen werden, zu denen die Ätiologie, Histopathologie und klinische Präsentation zählen[4]. Besonders einfach und klar ist eine klinische Unterteilung nach chronischer GN und rapid progressiver GN (RPGN). Bei chronischen Verläufen kommt es zu einer langsamen, aber fortschreitenden Verschlechterung der Nierenfunktion. Die Hauptaufgabe der Behandlung besteht darin, den Progress zu verlangsamen und auftretende Komplikationen rechtzeitig zu erkennen und zu behandeln. Dem gegenüber steht die RPGN oder auch halbmondförmige GN[4]. Die RPGN ist die gefährlichste Form der GN mit einer schlechten Prognose, da unbehandelt die Zerstörung der Niere innerhalb von wenigen Tagen bis Monaten stattfinden kann. Typisch für die RPGN ist der histologische Befund der sogenannten Halbmonde oder Crescents in den Glomeruli. Die rapid progressive GN kann immunhistologisch in drei Subklassen unterteilt werden[2]. Bei der anti-Basalmembran-RPGN werden Autoantiköper gegen die glomeruläre Basalmembran gebildet, die sich linear entlang dieser ablagern. Eine weitere Form

bilden die Immunkomplex vermittelten RPGNs, die mit granulären und multilokulären Immunkomplex-Ablagerungen einhergehen, wie es beispielsweise beim systemischen Lupus erythematodes (SLE) der Fall ist. Die dritte Variante ist die anti-Neutrophilen zytoplasmatische Antikörper (ANCA) assoziierte RPGN. Bei dieser sogenannten pauci-immunen Form finden sich nur sehr dezente Ablagerungen von Immunkomplexen und Komplement. ANCAs sind wahrscheinlich pathogenetisch für die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich, welches zu einer akuten Vaskulitis des Kleingefäßsystems führt[2, 5].

Diese ätiopathogenetisch sehr verschiedenen Formen der RPGN verbindet die Entstehung der charakteristischen Halbmonde, welche die Folge der Infiltration von Immunzellen sind, die den Glomerulus zerstören[4].

Als therapeutische Optionen für die Behandlung der GN gibt es momentan nur die Verwendung von unspezifischen, teils toxischen und nebenwirkungsreichen Medikamenten. Es fehlt an spezifischen, auf Schlüsselmediatoren abgestimmte Therapien für die Klinik. Als Folge dessen führt die GN bei um die 10% der Betroffenen aus der westlichen Bevölkerung zur Dialysepflichtigkeit[3], was die Notwendigkeit effektiverer Behandlungen eindrucksvoll unterstreicht. Das Finden spezifischer Targets und das Entwickeln neuer Therapiestrategien ist daher eine wesentliche Aufgabe der nephrologischen Forschung, um so das Leiden der Patienten und die Notwendigkeit von Dialyse oder Nierentransplantation zu vermeiden.

1.2. Immunzellen in der Glomerulonephritis

Unabhängig von den verschiedenen Formen der GN ist diesen gemeinsam, dass sie das Resultat einer dysregulierten Immunantwort sind. Das bedeutet, dass im Rahmen der meisten Formen der GN pro-inflammatorische Immunzellen glomerulär als auch tubulointerstitiell in die Niere einwandern. Die bekannten infiltrierenden Immunzellen umfassen sowohl Zellen des angeborene Immunsystems wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Innate Lymphoid Cells, natürliche Killerzellen und Mastzellen, als auch verschiedene Populationen von T-Zellen und B-Zellen als Vertreter des adaptiven Immunsystems. In verschiedenen Arbeiten wurden insbesondere CD4+ T-Zellen als dominante Mediatoren für die Entwicklung der GN identifiziert[6, 7]. Die Gruppe der CD4+ T-Zellen ist unterteilt in verschiedene Subklassen, die sich in ihren Effektorfunktionen grundlegend unterscheiden. Wegweisend für die Erkenntnis der Heterogenität von CD4+ T-Zellen und ihrer Unterteilung in unabhängige Subtypen sind die Arbeiten von Mosmann und Coffman. Sie unterschieden zunächst T-Helferzellen in Typ 1 (Th1) und Typ 2 (Th2), die sich an

Hand von spezifischen Transkriptionsfaktoren (TF) und ihrer Zytokinsekretion unterscheiden ließen[8]. Inzwischen sind eine Vielzahl an weiteren Subkassen entdeckt worden, wie insbesondere T-Helferzellen des Typ17 (Th17)[9].

Die grundsätzliche Aufgabe von T-Helferzellen ist die Kontrolle und Eliminierung von Pathogenen. Jedoch ist eine pathologische Überaktivierung oder Dysregulation von T-Helferzellen verantwortlich für die Entstehung diverser Krankheiten. Eine überschießende Th2 Immunantwort ist die Hauptursache für Allergien. Sie bewirkt primär eine verstärkte Produktion von IgE und die Rekrutierung von entzündungsfördernden eosinophilen Granulozyten[10]. Th2-Zellen sind charakterisiert durch die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA3 und Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) sowie der Expression der charakteristischen Zytokine Interleukin (IL-) 4, IL-5 und IL-13[11, 12]. Dysregulierte Th1 und Th17 Antworten sind zentral für das Entstehen von Autoimmunität und für die Initiierung vieler Formen der GN, wie insbesondere der RPGNs[7].

Um überschießende Immunantworten zu vermeiden, kommt es zur Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Treg). Sie stellen neben Th1-, Th2- und Th17-Zellen einen weiteren wichtigen Subtyp der CD4+ T-Zellen dar. Die anti-inflammatorische Funktion der Tregs wird im Wesentlichen durch die Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors Forkhead box P3 (FoxP3) vermittelt. Tregs können über viele verschiedene Mechanismen Immunantworten unterdrücken und Toleranz vermitteln. Zu diesen gehören unter anderem die Expression anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10, IL-35 und den Transforming growth factor beta (TGF-ß) sowie die Blockade von Oberflächenmolekülen für die T-Zellaktivierung, durch Expression von cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) und dem induzierbaren T-Zell-Costimulator (ICOS)[13, 14].

Im Folgenden werden die für meine Arbeiten besonders relevanten Immunzellen sowie ihre Rolle für die GN näher dargestellt.

1.2.1. Th17-Zellen

Nachdem Coffman und Mosmann 1986 erstmals beschrieben, dass CD4+ T-Zellen in zwei unabhängige Subklassen differenziert werden können, wurde ca. 20 Jahre später mit den Th17-Zellen eine weitere Subklasse definiert[15, 16]. Sie grenzt sich funktionell deutlich von Th1- und Th2-Zellen ab und zeichnet sich durch die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-17A, IL-17F und IL-22 aus. Die durch diese Zytokine aktivierten Effektorzellen der Th17 Antwort sind neutrophile Granulozyten. Diese

werden durch verschiedene IL-17 induzierte Chemokine wie den C-X-C Motiv-Liganden 1 und 5 (CXCL1, CXCL5) ins entzündete Gewebe gelockt und aktiviert[17]. Neben der klaren Unterscheidung der Th17 Zellen von anderen T Helferzell Subtypen durch spezifische Effektorzytokine, ist auch die Differenzierung der Th17-Zellen durch charakteristische Zytokine individuell gesteuert. Th17-Zellen entstehen aus naiven CD4+ T-Zellen unter einem kombinierten Einfluss von IL-6 und TGF-ß, verstärkt durch Bindung von IL-1ß und Tumornekrosefaktor alpha (TNFα)[18]. Hierdurch wird die Expression der zentralen Transkriptionsfaktoren signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) und retinoic-acid-receptor-related orphan Rezeptor gamma (RORγt) und -alpha (RORα) initiiert[19]. Diese drei Master-TFs sind notwendig für die Funktion der Th17-Zelle und ihrer Zytokinexpression. So ist die Induktion der IL-21 Sekretion aus Th17-Zellen von STAT3 abhängig. IL-21 bewirkt im Prozess der Differenzierung, eine Autoamplifizierung der Th17-Zellen. Diese autokrine Schleife führt ebenfalls zur Expression des IL-23 Rezeptors auf der Th17-Zelloberfläche. Über die Bindung von IL-23 wird die Th17-Antwort in der Folge weiter amplifiziert und stabilisiert[20]. Ein weiteres charakterisierendes Merkmal ist die Expression des C-C-Typ Chemokinrezeptors 6 (CCR6), der für das Einwandern der Th17-Zellen in entzündete Gewebe entscheidend ist[21-23].

In den letzten Jahren wurden Th17-Zellen als entscheidende Mitverursacher von Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis, Rheumatoider Arthritis und verschiedener Formen der GN identifiziert[24-28]. Gerade bei Patienten mit ANCA assoziierter Vaskulitis, Lupusnephritis oder IgA Nephropathie konnte die verstärkte Sekretion der Th17 charakteristischen Zytokine IL-17A/F, IL-21 und IL-23 nachgewiesen werden[29-31]. Die Infiltration von Th17-Zellen in die Niere unterstützt die Entzündung durch die Sekretion dieser charakteristischen pro-inflammatorischen Zytokine, die ihrerseits weitere pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine wie CXCL1 und CXCL5 hochregulieren, was in der Folge zur Rekrutierung von Neutrophilen führt. Im Nephrotoxischen Nephritis (NTN) Modell der akuten GN konnte in unserer Abteilung gezeigt werden, dass Th17-Zellen in einer frühen Phase in die Niere infiltrieren und durch die Rekrutierung von Neutrophilen maßgeblich am Fortschreiten des Nierenschadens beteiligt sind[32]. Das sowohl IL-17, als auch das Th17 stabilisierende Zytokin IL-23 maßgeblich am renalen Gewebeschaden beteiligt sind, zeigte die Beobachtung, dass ein Fehlen von IL-17A oder IL-23 (IL-23p19) im NTN-Modell zu einer reduzierten Crescentbildung und einer verbesserten Nierenfunktion führten. Weiterhin zeigte die *in vitro* Stimulation von renalen Mesangiumzellen mit IL-17A einen Anstieg der Sekretion pro-inflammatorischer Chemokine, die wichtig für die Infiltration von Monozyten und Neutrophilen sind[25]. Aber nicht nur das Fehlen der

Th17 Effektorzytokine beeinflusst die Ausprägung der GN, sondern auch das Fehlen des Th17 Mastertranskriptionsfaktors RORγt. Die spezifische Deletion von RORγt in CD4+ T-Zellen bewirkt eine Verbesserung der experimentellen GN und führt zu einem fast völligen Fehlen der IL-17A Sekretion in der Niere. Dies verdeutlicht eindrucksvoll die Abhängigkeit des Zytokins IL-17 von der RORγt Expression in Th17-Zellen[33].

Ein weiteres wichtiges Effektor-Molekül ist der von Th17-Zellen exprimierte Wanderungsrezeptor CCR6. Dieser besitzt eine entscheidende Rolle für die Migration der Th17-Zellen in die Niere und damit auch für ihre gewebeschädigende Funktion. Allerdings ist ein generelles Ausschalten von CCR6 therapeutisch ungeeignet, weil auch verschiedene protektive regulatorische T-Zellen mittels CCR6 wandern[34]. Neben CCR6 scheint zudem auch der für die Wanderung der Th1 charakteristische C-X-C Typ Chemokinrezeptor 3 (CXCR3) einen gewissen Einfluss auf die Funktion und Pathogenität von Th17-Zellen im Rahmen von GNs zu haben. Im genetischen Mausmodell der Lupusnephritis reduzierte ein Fehlen des CXCR3 neben der Th1 Antwort zudem auch die Th17-Antwort und führte zu einem verringerten glomerulären Gewebeschaden[28]. Insgesamt zeigen diese verschiedenen Studien aus unserer Abteilung die zentrale Relevanz von Th17-Zellen für die Pathogenese der GN und heben ihr Potenzial als therapeutisches Target hervor.

1.2.2. Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen stellen das Gegenstück zur pro-inflammatorischen Th-Zellantwort dar und werden über die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 definiert. Treg wurden lange als einheitliche, homogene CD4+ Zellpopulation angesehen, was aber aufgrund der Diversität der zu regulierenden Th-Zellen und deren Rolle in verschiedensten Immunerkrankungen höchst unwahrscheinlich erscheint. Inzwischen geben die publizierten Daten einen sehr deutlichen Hinweis, dass auch die Treg Zellen in individuelle Subkassen unterteilt werden können, um spezifisch die unterschiedlichen Th-Subklassen zu inhibieren[13, 35, 36]. Diese spezifischen Treg Subtypen teilen interessanterweise den Transkriptionsfaktor und wichtige Oberflächenmoleküle für die Migration mit der korrespondierenden, zu supprimierenden Th-Zelle. In der nachfolgenden Übersicht sind die derzeit bekannten Foxp3+ Treg Subklassen mit ihren spezifischen TFs und der regulierten Th-Zell Population dargestellt.

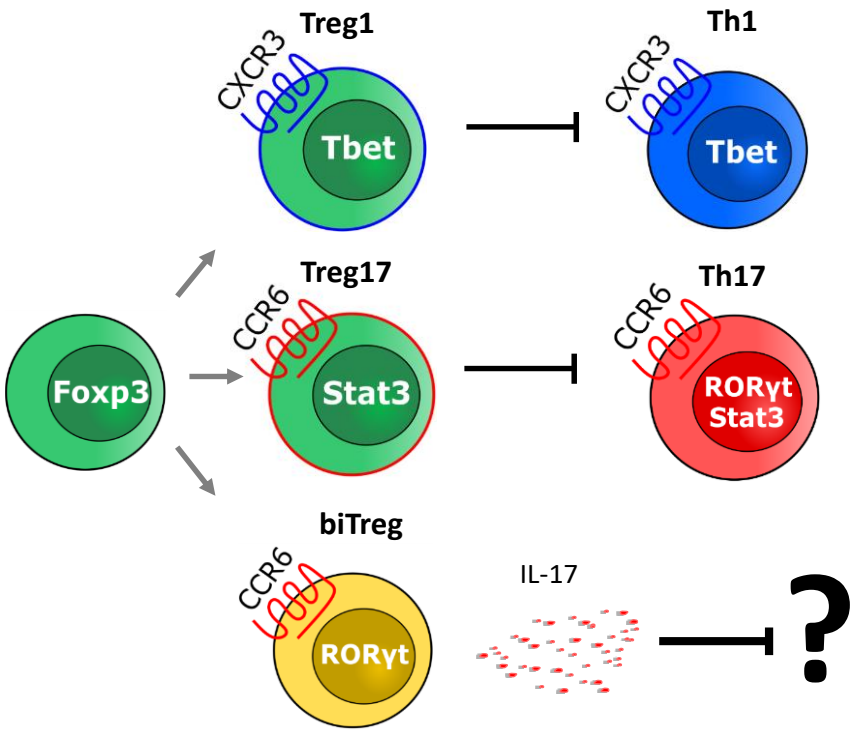


Abbildung 1: In Analogie zu den Effektor-T-Zellen kommt es zur linienspezifischen Differenzierung naiver regulatorischer T-Zellen. Treg1-Zellen sind optimiert für die Regulation von Th1 Zellen und benötigen für Ihre Funktion die Aktivierung von T-bet sowie den Chemokinrezeptor CXCR3[35], Treg17-Zellen sind spezialisiert auf die Regulation von Th17-Zellen und vom Transkriptionsfaktor Stat3 sowie der Expression des Chemokinrezeptors CCR6 abhängig[37], biTregs exprimieren den Transkriptionsfaktor RORγt, tragen den CCR6 und können IL-17 sezernieren[38]. Die genaue Funktion von biTregs, sowie deren potentielle Spezialisierung auf die Regulation einer definierten Th-Zell Antwort ist aktuell unklar.

T-Box-Transkriptionsfaktor TBX21 (T-bet)+ FoxP3+ Tregs sind beteiligt an der Herunterregulierung der Th1 Immunantwort und teilen neben dem Transkriptionsfaktor T-bet auch CXCR3 mit Th1 Zellen. Im Kontext der GN konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass ein Fehlen von T-bet in Tregs eine überschießende Th1 Immunantwort zur Folge hat, was zur verstärkten Schädigung des Nierengewebes führt[39]. Als ein wichtiger Mechanismus zeigte sich, dass Treg1 Zellen über den CXCR3 in dieselben Areale der Inflammation wandern können, wie CXCR3 tragende Th1 Zellen. Auf diese Art und Weise entsteht räumliche Nähe zwischen Treg1 und Th1 Zellen, was eine optimale Suppression ermöglicht[39].

Eine andere und bereits in der GN beschriebene Subklasse sind die STAT3 positiven Treg Zellen. Ein Fehlen dieser, von uns als Treg17 bezeichneten Zellen, führt zur Ausbildung eines spontanen Hyper-Th17 Phänotyps mit Ausbildung einer spontanen Colitis[37]. Im Feld der Nephrologie konnte unsere Gruppe zudem zeigen, dass das Fehlen von Treg17 Zellen zur Verschlechterung von Modellen der akuten GN und der

chronischen Lupusnephritis führt[37, 40]. Als wichtigen Mechanismus konnte unsere Gruppe das Fehlen des CCR6 Rezeptors auf STAT3 defizienten Tregs ermitteln. Dieser ermöglicht Treg17 Zellen physiologischerweise in die räumliche Nähe von ebenfalls CCR6 gesteuerten Th17-Zellen zu wandern, um diese zu supprimieren[40]. Durch ein Fehlen des CCR6 auf Tregs wird diese Interaktion gestört und es resultiert eine unkontrollierte Th17 Inflammation.

Wie in der Abbildung oben ersichtlich, gibt es noch einen weiteren Treg-Subtyp. Dieser aktiviert RORγt, den neben STAT3 zweiten Master-TF von Th17-Zellen, und exprimiert genau wie Th17 und Treg17 Zellen in großen Maß den CCR6[41].

Wir konnten jedoch zeigen, dass RORγt+FoxP3+ Tregs eine unabhängige und stabile Population darstellen, die sich klar von Th17-Zellen sowie STAT3+ Treg17 Zellen abgrenzt[38]. Die Analysen des Zytokinprofils von RORγt+FoxP3+ Tregs ergab, dass sie sowohl wichtige, charakteristische Treg Zytokine wie IL-10 und IL-35 exprimieren, gleichzeitig jedoch auch das Th17 assoziierte pro-inflammatorische Zytokin IL-17.

Weiterhin konnten verschiedene Gruppen beweisen, dass RORγt+FoxP3+ Treg sowohl im Blut gesunder Individuen vorkommt, als auch bei entzündlichen Erkrankungen wie Colitis, Psoriasis und Peridontitis[42-44]. Welche physiologische Rolle diese potentiell bi-funktionalen Zellen (von uns deshalb als „biTregs“ bezeichnet) haben ist aktuell noch unbekannt und ist daher Gegenstand laufender Untersuchungen auch unserer Arbeitsgruppe. Im Rahmen experimenteller GN Modelle fanden wir, dass biTregs zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Niere und systemisch massiv expandieren. Funktionell ist zu beobachten, dass biTregs sowohl pro-, als auch anti-inflammatorische Eigenschaften haben. Der Transfer von exogenen biTregs bewirkte eine Abschwächung der renalen Entzündung. Umgekehrt weisen endogene biTregs eine teilweise pro-inflammatorische Funktion auf, die in wesentlichen Teilen von der RORγt Aktivierung abhängt. Gezeigt werden konnte dieser Effekt *in vivo* im Modell der akuten GN in Mäusen mit selektiver RORγt Defizienz in Tregs[38]. In Analogie konnte unsere Gruppe im Modell des SLE beobachten, dass das Fehlen von RORγt in endogenen Tregs vor pulmonaler Vaskulitis und Lupusnephritis schützt[40]. Mechanistisch führt das Fehlen von RORγt in Tregs zum kompletten Verlust der IL-17 Produktion von biTregs, bei gleichzeitig verstärkter Treg Aktivierung und einer Hochregulation der anti-inflammatorischen Th2 Antwort über unbekannte Mechanismen[45]. Einen ähnlichen Effekt konnten Ohnmacht et al. in einer parallel durchgeführten Arbeit in Modellen der Colitis finden. In dieser Studie wurde das Mikrobiom als Initiator für die Expansion von biTregs ermittelt und ihr spezifisches Fehlen resultierte in einer übersteigerten Th2 Antwort[46]. Zusammengefasst legt das nahe, dass biTregs wahrscheinlich in Abhängigkeit von

RORγt signifikant direkt oder indirekt an der Regulation der Th2 Immunantwort beteiligt sind.
Die zugrundeliegenden Mechanismen, genau wie die Prozesse, die zur Differenzierung von biTregs führen, sind jedoch noch weitgehend ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen.

1.2.3. Monozyten/Makrophagen

Monozyten sind eine sehr heterogene Gruppe von Leukozyten, die freigesetzt aus dem Knochenmark, im Blut zirkulieren und in Abhängigkeit der Umgebung verschiedene Oberflächenmoleküle und Rezeptoren hochregulieren. Als Resultat entstehen pro- oder anti-inflammatorische Subtypen, welche sich nach Einwanderung in verschiedene Gewebe weiter gewebespezifisch differenzieren können[47]. Inflammatorische Monozyten tragen den Traffickingrezeptor CCR2 und besitzen eine starke Neigung zur Infiltration ins entzündete Gewebe. Als weiterer Oberflächenmarker findet sich bei ihnen die Expression des lymphocyte antigen 6 complex, locus C (Ly6C). Im Gewebe sind sie als pro-inflammatorische Makrophagen wesentlich am Gewebeschaden beteiligt[48, 49]. Demgegenüber stehend entwickeln sich unter homöostatischen Bedingungen anti-inflammatorische Monozyten. Diese patrouillieren länger im Blut und regulieren den CCR2 sowie Ly6C herunter, bei gleichzeitiger Hochregulierung des fürs Überleben und die Migration wichtigen Fraktalkinrezeptors (CX3CR1). Eingewandert ins Gewebe differenzieren diese Monozyten zu geweberesidenten Makrophagen oder dendritischen Zellen (DC), die den Zellbestand auffüllen und funktionell reparative und anti-inflammatorische Eigenschaften aufweisen[50].
Makrophagen sind somit auch funktionell eine stark heterogene Leukozytenpopulation. Die wohl bekannteste und am besten definierte Unterteilung ist die in klassisch und alternativ aktivierte Makrophagen. Induziert werden klassisch aktivierte Makrophagen, welche auch als M1 Makrophagen bezeichnet werden, durch Lipopolysaccharide (LPS) und Interferon gamma (IFNγ). Infolgedessen produzieren sie vermehrt pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-1ß und TNFα, besitzen eine starke Zytotoxizität und sind maßgeblich an der Zerstörung des Gewebes beteiligt[51]. Neben der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen ist eine gesteigerte Genexpression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) ein weiteres Merkmal von M1 Makrophagen. Dem gegenüber stehen die alternativ aktivierten Makrophagen oder auch M2 Makrophagen. Diese werden durch die Zytokine IL-4 und

IL-13 aktiviert und besitzen eine starke anti-inflammatorische Funktion, wodurch sie den Heilungsprozess der Entzündung regulieren und weisen zusätzlich eine hohe Phagozytose-kapazität auf. Darüber hinaus können M2 Makrophagen über die Expression des Enzyms Arginase 1, verschiedener anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 oder TGF-ß und der Expression des Mannoserezeptors CD206 von M1 Makrophagen unterschieden werden[52]. Da es sich bei der Polarisierung und Differenzierung von Makrophagen um einen multifaktoriellen Prozess handelt, gibt es neben den genannten noch eine Vielzahl an weiteren Faktoren, die an der Differenzierung beteiligt sind. Es ist auch immer noch nicht in Gänze geklärt, in wie weit diese entzündungsfördernden bzw. die regenerativen und entzündungsauflösenden Eigenschaften von M1 und M2 Makrophagen einem stabilen Phänotyp entsprechen oder sich plastisch im Verlauf eines Entzündungsprozesses ändern[53].

Ein gängiges Konzept ist jedoch, dass M1 Makrophagen durch Zellen der Th1 Antwort induziert werden und als Th1 Effektor-Arm betrachtet werden können. M2 Makrophagen hingegen werden durch Th2-Zellen programmiert und aktiviert und vermitteln wichtige Effekte der Typ 2 Inflammation[51, 54] Bezüglich entzündlicher Nierenerkrankungen wurde in verschiedenen experimentellen Modellen ein signifikanter Einfluss von Makrophagen auf die Pathogenese beschrieben[55-57].

Zudem wurde in humanen Studien eine Korrelation von infiltrierenden Makrophagen mit der Stärke des renalen Schadens gezeigt[58-60]. Makrophagen stellen daher neben CD4+ T-Zellen eine weitere zentrale Leukozytenpopulation für die Initiierung und den Progress von entzündlichen Nierenerkrankungen dar.

1.3. Interleukin 6 und seine Signalwege

Interleukin IL-6 ist ein hoch pleiotropes Zytokin, das Homöostase, metabolische Prozesse und verschiedene Arme der Immunantwort beeinflussen kann. Schon lange ist IL-6 als wichtiger Koordinator des angeborenen und adaptiven Immunsystems bekannt. Initial wurden essentielle Funktionen für die Differenzierung von B-Zellen und der Regulierung des Überlebens von T-Zellen beobachtet[61]. Das wurde im Verlauf durch eine Vielzahl an weiteren Aufgaben in der Steuerung des Immunsystems, als auch durch eine Beteiligung an nicht-immunologischen Prozessen, wie dem Lipidmetabolismus, der Insulinresistenz oder der Regulation der Akut-Phasen-Reaktion ergänzt[62]. Bezogen auf die Steuerung des Immunsystems wurde kürzlich eine weitere elementare Rolle von IL-6 entdeckt. Es ist verantwortlich für die

Differenzierung von naiven CD4+ T-Zellen zu hoch pathogenen Th17-Zellen. Ein kombiniertes Wirken der Zytokine TGF-ß und IL-6 initiiert die RORγt Aktivierung, was die Th17-Zelldifferenzierung einleitet. Gleichzeitig vermutete man, dass die Bildung von regulatorischen T-Zellen durch IL-6 supprimiert wird, was somit zusätzlich indirekt die entzündliche Th17 Antwort unterstützt[63, 64]. Dieses anfänglich eindeutige Bild von IL-6 auf die T-Zelldifferenzierung wurde im Verlauf der letzten Jahre zunehmend revidiert durch die Beobachtung positiver Effekte von IL-6 auf regulatorische T-Zellen in Maus und Mensch. So konnte in verschiedenen Studien beobachtet werden, dass IL-6 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 induziert[65, 66]. Andere Autoren zeigten passend dazu, dass IL-6 die Generierung von Typ1 regulatorischen T-Zellen (Tr1) aus naiven T-Zellen bewirken kann und zusätzlich die Produktion von IL-10 unterstützt, was in verschiedenen Modellen zu einer verminderten Gewebeentzündung der Lunge und des Intestinums führte[67, 68]. Ebenfalls war eine anti-inflammatorische Rolle bei der genetischen Überexpression von IL-6 zu erkennen, welches überraschenderweise die Anzahl von Tregs nicht verminderte, sondern sogar erhöhte[69]

Die sehr interessante Studie von Medzhitov und Kollegen zu diesem Thema betrachtet die Rolle von IL-6 für die Differenzierung von T-Zellen sehr detailliert. Sie verdeutlicht, dass IL-6, anders als zuvor stets angenommen, kein genereller Inhibitor für die Treg Funktion und Entwicklung ist, sondern, dass es beide T-Zell Typen expandieren kann. Jedoch scheint IL-6 Effektor-T-Zellen gegenüber Tregs etwas zu bevorzugen[70]. Diese Orientierungsstudie war sehr hilfreich für das generelle Verständnis von IL-6 für die Regulierung der Th17/Treg Balance. Zudem wurde bereits in früheren Studien beobachtet, dass durch Stimulation mit IL-6 FoxP3+ Zellen ungewöhnlicher Weise auch den Th17 Transkriptionsfaktor RORγt co-exprimieren, was als Instabilität und Trans-Differenzierung der Treg zu „Th17 effector like cells“ gedeutet wurde[62]. Aber dank neuerer Studien, eingeschlossen unser eigenen, ist inzwischen bekannt, dass die Aktivierung von RORyt in Tregs nicht eine Transdifferenzierung zu Th17-Zellen anzeigt, sondern es sich bei RORyt positiven Tregs um eine eigenständige Treg Subpopulation handelt[38, 71]. Diese biTregs konnten, wie bereits weiter oben ausführlich beschrieben, als eine sehr potente Treg-Population mit einem großen Einfluss auf die Regulierung der GN identifiziert werden.
Die nachfolgende Abbildung (Abbildung 2) soll, bezogen auf CD4+ T-Zellen, die bekannten inflammatorischen Funktionen von IL-6 auf der einen Seite und die postulierte anti-inflammtorische Rolle auf Treg Populationen zusammenfassen und veranschaulichen.

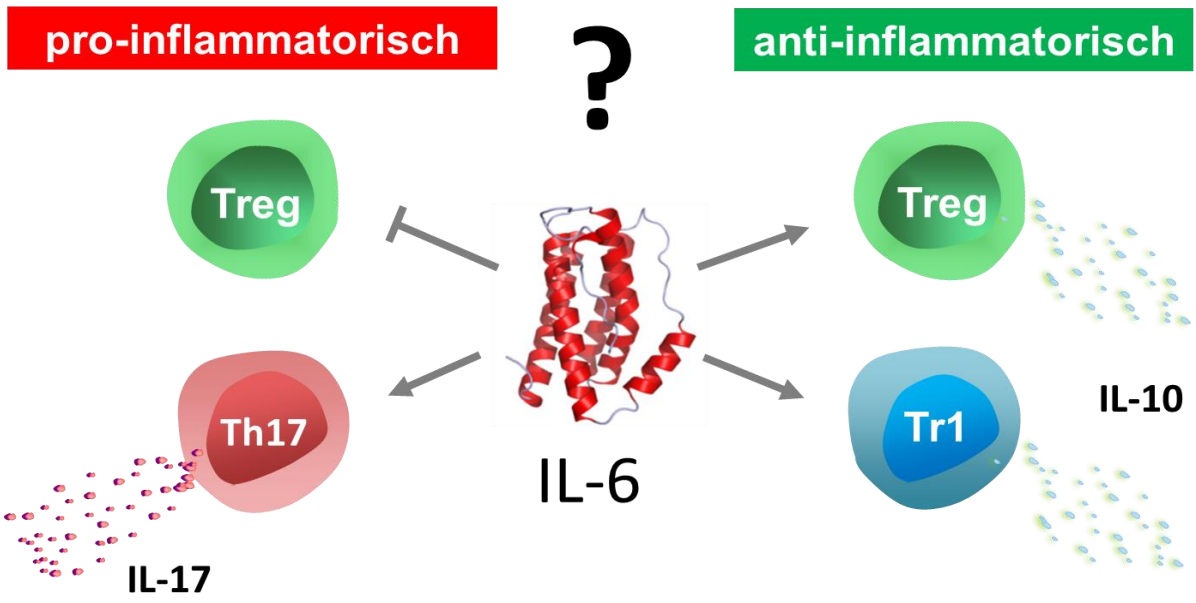


Abbildung 2: Schematische Darstellung der gegensätzlichen pro- und anti-inflammatorischen Effekte von IL-6 auf CD4+ T-Zellen. Zum einen besitzt IL-6 pro-inflammatorische Funktionen durch Induktion von Th17-Zellen und die Minderung der Treg Stabilität und Entwicklung. Zudem deuten neuere Daten jedoch daraufhin, dass IL-6 ebenso anti-inflammatorisch wirken kann, durch Induktion von IL-10 sezernierenden Tr1 Zellen sowie potentiell durch Verstärkung der suppressiven Funktion von Tregs.

Insgesamt ist die *in vivo* Relevanz von IL-6 für die Entwicklung, Aktivierung und Homöostase regulatorischer T-Zellen noch immer wenig untersucht. Das könnte mit der Komplexität seiner Signalübertragung zusammenhängen.

Der mittels IL-6 induzierte Signalweg braucht zum einen den selektiven IL-6 Rezeptor (IL-6R) und zum anderen das ubiquitär exprimierte und promiskuitive membranständige Glykoprotein gp130. Eine starke Induktion von IL-6 wird in der Regel durch Entzündungsprozesse, wie bei Infektionen oder im Rahmen von immunologischen Erkrankungen induziert, wobei die Sekretion von IL-6 aus diversen Zellen möglich ist[64]. Die anschließende Signalübertragung kann verschieden ablaufen. Der so genannte klassische Signalweg ist, dass IL-6 an den auf der Zelle exprimierten IL-6R bindet, welcher im Anschluss mit gp130 dimerisiert und damit die Januskinase abhängige Signaltransduktion aktiviert. Diese Signalübertragung ist limitiert auf Hepatozyten und verschiedene Arten von Leukozyten, weil nur diese Zellen den IL-6R tragen. Eine andere identifizierte Art für die Signalübertragung ist das Trans-Signaling. Dafür wird zunächst der IL-6R durch Metalloproteasen von der Zellmembran getrennt und existiert dann in einer löslichen Form (sIL-6R)[64]. Dieser sIL-6R kann, genau wie seine membranständige Variante (mIL-6R), mit IL-6 interagieren und als IL-6/sIL-6R

Komplex an gp130 auf der Zelloberfläche binden und die Signaltransduktion einleiten. Den Vorteil den IL-6 durch den Mechanismus des Trans-Signalings erhält, ist, dass eine IL-6 Signalübertragung auf jeder Zelle möglich ist, da gp130 ubiquitär exprimiert wird. Die dritte und erst kürzlich entdeckte Art der Signalübertragung ist das sogenannte Cluster-Signaling. In diesem Fall bindet IL-6 an den IL-6R auf DCs und dieser Komplex wird dann T-Zellen präsentiert. In diesen läuft dann die Signaltransduktion über gp130 nach Bindung des IL-6/IL-6R Komplexes, der von den DCs präsentiert wird. Die bisherigen experimentellen Daten über diesen potentiellen neuen, von IL-6 benutzten Signalweg implizieren die Induktion eines stark entzündlichen T-Zell Phänotyps. Dieses wurde im experimentellen Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) demonstriert, bei dem durch eine spezifische Entfernung des IL-6R auf DCs die Induktion der pro-inflammatorischen Th17 Antwort signifikant vermindert wurde. In der Folge resultierte eine Abmilderung der Krankheitssymptome der EAE[72]. Ob sich diese Daten von anderen Gruppen unabhängig bestätigen lassen und inwieweit das Cluster-Signaling im humanen System relevant ist, müssen zukünftige Studien zeigen.

Auf Grund der wichtigen Rolle von IL-6 für die Regulation des Immunsystems ist eine Dysregulation dieses Zytokins an Gewebeschäden bei vielen immunologisch vermittelten Erkrankungen beteiligt[57, 68, 73, 74]. Um hier einzugreifen gibt es inzwischen eine Vielzahl an verschiedenen Antikörpern, die an unterschiedlichen Stellen des IL-6 Signalwegs mehr oder weniger spezifisch dazwischentreten. Das wahrscheinlich bekannteste Therapeutikum ist Tocilizumab. Dieser anti-IL-6R Antikörper bindet an den Membran-gebundenen, genau wie den löslichen IL-6R und inhibiert damit alle Arten der IL-6 Signalwege[75]. Erfolgreich verwendet wird Tocilizumab bei der Behandlung der lymphoproliferativen Erkrankung Castelman Disease und bei Rheumatoider Arthritis[61, 75]. Bei dieser generellen Blockade der IL-6 abhängigen Signalübertragung werden natürlich auch die physiologischen Funktionen unterdrückt, wie die Abwehr von Krankheitserregern und Regeneration von Geweben. Eine erhöhte Infektions-anfälligkeit ist daher eine verbreitete Nebenwirkung. Mit Olamkicept, einer löslichen Variante von gp130 (sgp130Fc) wurde daher ein selektiver Blocker für den IL-6 Trans-Signalweg entwickelt, der im experimentellen Einsatz bei verschiedenen chronischen Erkrankungen zur Verbesserung der Krankheitslast führt. In klinischen Studien wird die Blockade des IL-6 Trans-Signalwegs bei der Behandlung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen momentan erprobt[64].

Im Bereich der Nephrologie zeigte die IL-6 Blockade bisher jedoch sehr unterschiedliche Effekte. Für die Lupusnephritis ist in verschieden Mausmodellen eine Verbesserung des klinischen Verlaufes durch ein genetisches Ausschalten oder die

Blockade von IL-6 zu erkennen[74, 76]. Ergänzende Studien konnten beobachten, dass auch die alleinige und selektive Blockade des Trans-Signalweges eine Verbesserung der renalen Funktion und der Zellinfiltration von Leukozyten bei experimenteller Lupusnephritis bewirkt[77]. Die zu Grunde liegenden Mechanismen für die pathogene Funktion von IL-6 beim SLE, konnten jedoch bisher nicht geklärt werden und sind daher aktuell weiterhin Gegenstand laufender Untersuchungen. Während IL-6 bei der experimentellen Lupusnephritis also eine pathogene Rolle spielt, ist die Funktion im Modell der akuten GN bisher uneindeutig. Pionierstudien zeigten zunächst protektive Funktionen von IL-6[78-81]. Im Einklang mit diesen Arbeiten konnte eine Studie aus unserer Gruppe zeigen, dass IL-6 der Expansion von pro-inflammatorischen Makrophagen über Aktivierung des klassischen Signalweges entgegenwirkt und somit im Rahmen akuter Inflammationsreaktionen protektive Funktionen erfüllt[57]. Eine Manipulation des Trans-Signalweges änderte den Verlauf der NTN nicht. Eine spätere Arbeit von Braun et al. zeigte jedoch, anders als unsere Studie, eine milde Verbesserung der NTN durch Blockade des Trans-Signalwegs, sodass die Datenlage diesbezüglich derzeit unklar ist[81]. In Analogie zu den uneinheitlichen Ergebnissen der murinen Arbeiten zeigten auch humane Studien der IL-6 Blockade bei verschiedenen Formen der GN unbefriedigende und uneindeutige Ergebnisse[82-84]. Um künftige klinische Studien zur Therapie von GNs verbessern zu können, müssen die differenziellen IL-6 Funktionen auf unterschiedliche Zellpopulationen und der relative Beitrag der drei bisher postulierten Signalwege genauer aufgeklärt und verstanden werden. Unsere Arbeiten fokussierten sich dabei zunächst auf den klassischen IL-6 Signalweg, die Aufklärung seiner regulativen Fähigkeiten für die Th17/Treg Entwicklung und die resultierenden Effekte auf den Verlauf der akuten GN. Die dazu entstandene Publikation ist Teil dieser Dissertation.

1.4. Amphiregulin

Ein weiteres sehr vielseitiges Molekül mit einer großen Relevanz für diverse zelluläre Prozesse ist Amphiregulin (AREG). Analog zu IL-6 sind die multiplen Funktionen und die Wirkweise von AREG und seinem Rezeptor bisher wenig verstanden, speziell im Feld der Autoimmunerkrankungen.

AREG gehört zur Epidermal Growth Factor Familie und agiert als Ligand über den Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR). Die vom EGFR kontrollierte Signaltransduktion ist beteiligt an verschiedensten zellulären Prozessen, wie Zellzyklus, Wachstum und Differenzierung. Kürzlich wurde AREG zudem als wichtiger Mediator immunologischer Prozesse sowie für reparative Prozesse im Gewebe

identifiziert. Aktiviert wird der EGFR Signalweg durch die Bindung einer seiner sieben bekannten Liganden. Unterteilt werden diese Liganden nach ihrer Neigung am EGFR zu binden. Die Proteine Amphiregulin, Epigen und Epiregulin besitzen nur eine geringe Bindungsneigung, was als low affinity bezeichnet wird und eine andere Signalkaskade aktiviert als z.B. der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) oder der heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), die als high affinity Liganden über eine starke Bindung zum Rezeptor verfügen[85, 86]. Viele der Liganden liegen als inaktive Vorgänger membrangebunden vor und werden erst durch Spaltung der Ektodomäne mittels der Metalloprotease ADAM17 aktiviert und freigesetzt[87]. Die Signalübertragung läuft vereinfacht zusammengefasst nach folgendem Schema ab: Mit der Bindung eines Liganden an den Rezeptor kommt es zur Konformationsänderung, gefolgt von der Dimerisation des EGF-Rezeptors und zur intrazellulären Phosphorylierung an Tyrosinresten, was letztendlich den Start für die Signalkaskade darstellt. Die so aktivierte Signaltransduktion unterscheidet sich zwischen low und high affinity Liganden, was ein diverses Repertoire an biologischen Antworten über ein- und denselben Rezeptor ermöglicht.

Veränderungen des EGFR, wie beispielsweise Mutationen, sind im Zusammenhang mit verschiedenen humanen epithelialen Tumoren beschrieben worden, wie beispielsweise für das Lungengewebe, bei Brustkrebs und dem Glioblastom[88]. Deshalb ist es wenig überraschend, dass für diesen hochpotenten Rezeptor verschiedene Blocker zu therapeutischen Zwecken etabliert worden sind. Der Prototyp eines Antikörpers, der die Liganden-Rezeptor Bindung verhindert ist Cetuximab. Um zusätzlich die Möglichkeit der Selbstaktivierung intrazellulärer Signalkaskaden pharmakologisch zu unterbrechen, werden häufig auch Tyrosinkinaseinhibitoren wie Erlotinib oder Gefetinib verwendet.

Diese etablierten Blockademöglichkeiten für den EGFR schaffen eine potenzielle therapeutische Anwendung für weitere Krankheiten außerhalb der Krebstherapie. Neuere Studien weisen diesbezüglich darauf hin, dass mittels Erlotinib eine Verbesserung der experimentellen Arthritis bewirkt werden kann. Im Asthmamodell führte eine Behandlung mit Erlotinib zudem zur Reduktion der Expression von Fibrose-assoziierten Genen sowie zur Auflösung schädlicher Eosinophilie, was zusammengenommen den Lungenschaden signifikant reduzierte[89, 90]. Im Feld der Nierenerkrankungen hat der EGFR für die potentielle Therapie von interstitieller Fibrose und GNs an Bedeutung gewonnen. Es ist gezeigt, dass der EGFR von verschiedenen Zelltypen in der humanen Niere exprimiert wird, wie interstitiellen Fibroblasten, Podozyten, renalen Epithel- und Mesangiumzellen[91]. Ein Fehlen des EGFR Liganden HB-EGF wirkt sich beispielsweise protektiv auf den Gewebeschaden

bei der akuten experimentellen GN aus und auch ein selektives Fehlen des EGF-Rezeptors in Podozyten resultiert in einer signifikanten Reduktion des renalen Schadens. Weiterhin zeigten die Autoren dieser Studie, dass auch eine pharmakologische Blockade des EGFR den Verlauf der akuten GN verbessert[92]. Eine vergleichbare Verbesserung des Nierenschadens nach Inhibition des EGFR beschreiben diverse andere Autoren ebenfalls für verschiedene renale Fibrosemodelle[93-95] und darüber hinaus auch für die diabetische Nephropathie[96]. Außerdem wurde im Fcgr2b-/- Mausmodell der Lupusnephritis ermittelt, dass die pharmakologische Blockade des EGFR vor immunologisch vermittelten renalen Schäden schützt. Zusätzlich fanden die Autoren, dass in Patienten mit Lupusnephritis der Ligand HB-EGF verstärkt exprimiert wird und möglicherweise ursächlich für den EGFR vermittelten Nierenschaden mitverantwortlich ist[97]. Welche von den bekannten sieben Liganden des EGF-Rezeptors neben HB-EGF jedoch noch relevant an der individuellen Krankheitspathogenese dieser Modelle und humanen Erkrankungen beteiligt sind, ist derzeit weitgehend unklar.

Amphiregulin könnte diesbezüglich eine wichtige Funktion einnehmen, da sich AREG in verschiedenen aktuelleren Studien als einzigartig in seiner Funktion unter den Liganden des EGFR dargestellt hat.

Zunächst wurde eine pro-inflammatorische Funktion von AREG in Keratinozyten entdeckt. Eine abnorme AREG-Expression führte zu dem einer Psoriasis vergleichbaren Hautphänotyp[98]. Passend hierzu wurde später gezeigt, dass AREG wichtige Zytokine zur Proliferationskontrolle von Keratinozyten supprimiert und auch die Zellintegrität der Zell-Zellverbindung einschränkt[99]. Darüber hinaus wurde eine entzündliche Funktion von AREG bei weiteren Autoimmunerkrankungen beschrieben, wie der rheumatoiden Arthritis, dem Sjögren Syndrom und auch dem allergischen Asthma. Gemeinsam ist diesen Publikationen, dass AREG im betroffenen Gewebe die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine verstärkt und damit die Pathogenese fördert[90, 100, 101]. Andere Gruppen zeigten, dass AREG ein starker Initiator für Leberfibrose ist, indem AREG mit Fibrose assoziierte Mediatoren und Wachstumsfaktoren reguliert[102]. Passend dazu wurde gezeigt, dass AREG kontinuierlich aus renalen Tubuluszellen bei verschiedenen renalen Erkrankungen sekretiert wird, und diese vermehrte AREG Expression mit der Fibrose bei akutem oder chronischem Nierenschaden korreliert[87]. In einer zweiten Studie konnten die Autoren zusätzlich nachweisen, dass AREG aus proximalen murinen Tubuluszellen (mPTC) in der Tat einer der Hauptinitiatoren für die renale Fibrose-Entstehung ist. Ein spezifischer Knockout von AREG in mPTCs schützte die Mäuse in Modellen der

unilateralen Ureterobstruktion (UUO) und Ischämie-Reperfusion (IRI) vor einer Fibrose bei gleichzeitiger Reduktion von infiltrierenden Makrophagen[103].

Im starken Kontrast zu den fibrotischen und entzündlichen Eigenschaften von AREG bei den oben erwähnten Erkrankungen stehen Beispiele, in denen AREG anti-inflammatorische und geweberegenerative Funktionen aufzeigt. Von besonderer Bedeutung ist diesbezüglich die Entdeckung, dass Tregs nach Aktivierung große Mengen von AREG sezernieren können. Interessanterweise hat jedoch die AREG Sekretion von Tregs keinen Einfluss auf deren regulatorischen Eigenschaften, sondern steuert Wundheilung und Geweberegeneration in verschiedenen Organen. So können gewebespezifische Tregs AREG produzieren, das direkt auf Satellitenzellen der Skelettmuskulatur wirkt und Einfluss auf die Reparationsfähigkeit des Muskels nach einer Verletzung hat[104]. Passend dazu führt ein Treg spezifischer Knockout des EGFR zu einer verschlechterten Wundheilung, kombiniert mit der verstärkten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und vermehrten Infiltration pro-inflammatorischer Zellen wie Makrophagen[105].

Innate lymphoid cells vom Typ 2 (ILC2) stellen eine weitere Zellpopulation da, die durch die Sekretion von AREG an der Reparation von Gewebe und der Aufrechterhaltung von Barrierefunktionen beteiligt ist. In zwei unterschiedlichen Modellen und Studien konnten die jeweiligen Autoren zeigen, dass die AREG Produktion aus ILC2s entscheidend ist für die Limitierung des Gewebeschadens. Dies wurde zum einem in der Lunge nach Infektion mit Influenza und zum anderen in einem Colitis Modell gezeigt[106, 107]. Cao et al. fanden zudem heraus, dass ILC2 wichtig beim Schutz vor Ischämie-induziertem Nierenschaden sind und konnten weiterhin beobachten, dass das genetische Ausschalten von AREG in ILC2 die Ischämie-induzierte Fibrose verstärkte[108]. Dieser Effekt verdeutlicht die protektive Rolle von AREG sekretiert aus ILC2s für den organübergreifenden Schutz vor Gewebeverletzungen.

Andere Autoren konnten darüber hinaus in ihren Studien eine protektive Rolle von AREG aus Makrophagen bei experimentellem Herzschaden[109], im Modell der autoimmunen Uveitis[110] und bei Lungenschädigung[111] beschreiben. Einen weiteren interessanten protektiven Effekt beschreibt Minutti in seiner Arbeit von 2017. Hier konnte eine zentrale Rolle von AREG in der Abwehr gegen parasitäre Helminth-Infektionen durch die Sensibilisierung von Th2-Zellen auf IL-33 gezeigt werden[112]. Diese Funktion ist insoweit von besonderem Interesse im Feld der Nieren-erkrankungen, weil die Th2 Immunität protektiv bei verschiedenen Formen der GN ist.

Zudem haben einige weitere Studien eine klassisch immunsuppressive Funktion von AREG in diversen Modellen der Gewebeentzündung aufgezeigt. Wichtig scheint

diesbezüglich eine Verstärkung der Funktion von Tregs über eine AREG/EGFR Wechselwirkung zu sein. Dabei wurde eine AREG Sekretion aus unterschiedlichen Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, Mastzellen und Basophilen als entscheidende Quelle von AREG für die Verstärkung der immunsuppressiven Funktion von Tregs beschrieben[110, 113, 114]. Die zuletzt erschienene Publikation von Ko et al. impliziert, dass eine durch AREG verstärkte Funktion regulatorischer T-Zellen einen direkten Einfluss auf die Suppression der pathogenen Th1 Effektorantwort hat. Jedoch bleiben die zugrundliegenden Mechanismen, wie die suppressive Kapazität der regulatorischen T-Zellen durch AREG verstärkt wird, aktuell unklar. Ein potenzieller Mechanismus könnte die durch AREG induzierte Expression von long noncoding RNA für den EGFR (Lnc-EGFR) sein. Diese stabilisiert den EGFR auf Tregs, verstärkt seine Aktivität und die Signaltranslokation wird positiv beeinflusst, was in der Summe die Suppressions-fähigkeit von Tregs erhöht[115]. Eine andere beschriebene Hypothese ist, dass AREG die Freisetzung von Exosomen aus Tregs verstärkt, über welche die Effektor-T-Zellantwort unterdrückt werden kann[116]. Die Möglichkeiten über die AREG/EGFR Achse die suppressive Kapazität von Tregs zu verbessern, ist speziell für die GN von herausragender Bedeutung, weil Tregs, wie oben beschrieben, als zentrale Gegenregulatoren des Nierenschadens identifiziert werden konnten[39, 45, 117, 118].

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass passend zu seinem Namen die Funktionen von AREG sehr unterschiedlich und zum Teil sogar gegensätzlich sind. Im nachfolgenden Schema (Abbildung 3) sind die pro-entzündlichen und gewebeschädigenden Eigenschaften, wie Fibrose und Inflammation, sowie die positiven Eigenschaften, wie Wundheilung und Inflammationshemmung dargestellt.

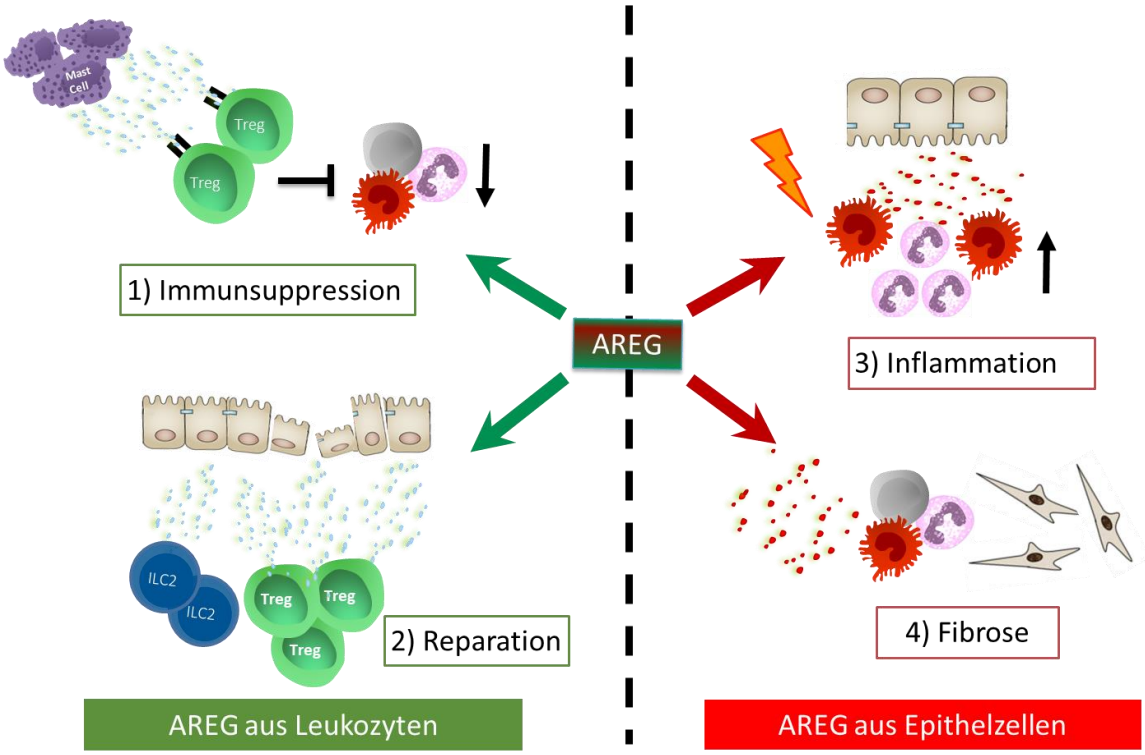


Abbildung 3: Übersicht pro- und anti-inflammatorischer Eigenschaften von AREG. 1) AREG (blau) sekretiert von Mastzellen und Makrophagen wirkt auf Tregs und verstärkt deren suppressive Kapazität. 2) Sekretion von AREG (blau) von aktivierten Tregs und ILC2s vermittelt die Regeneration und Reparation von Gewebe. 3) Epitheliale Zellen sekretieren AREG (rot) was pro-inflammatorische myeloide Zellen anlockt und aktiviert. 4) AREG (rot) aus epithelialen Zellen vermittelt fibrotische Prozesse.

Abgeleitet von der aktuellen Datenlage, und wie im obigen Schema zusammengefasst, kann vermutet werden, dass die Funktion von AREG möglicherweise von der zellulären Quelle, die AREG sezerniert, abhängig ist. So scheint AREG aus epithelialen Zellen eine prädominant entzündliche Funktion und AREG aus Leukozyten vorzugsweise eine regenerative und anti-inflammatorische Funktion zuzukommen. Was diese Hypothese für die *in vivo* Funktion von AREG bei der GN bedeutet und welche Rückschlüsse daraus für AREG als neues spezifisches Therapietarget gezogen werden können, ist komplett unbekannt und die weitere Aufklärung war Teil dieser Doktorarbeit.

2. Material und Methoden

Die folgenden zwei Publikationen bilden die Grundlage dieser kumulativen Dissertationsschrift und enthalten die verwendeten Materialien und Methoden, sowie die Ergebnisse zu den zuvor genannten Fragestellungen. Im Anhang sind die vollständigen Originalarbeiten enthalten.

A novel role for IL-6 receptor classic signaling: induction of RORγt+Foxp3+ Tregs with enhanced suppressive capacity

Hagenstein J, Melderis S, Nosko A, Warkotsch MT, Richter JV, Ramcke T, Herrnstadt GR, Scheller J, Yan I, Hans-Willi Mittrücker, Kluger MA, Steinmetz OM

J Am Soc Nephrol, *2019, 30 (8): 1439-1453*

Amphiregulin Aggravates Glomerulonephritis via Recruitment and Activation of Myeloid Cells

Melderis S* and Hagenstein J*, Warkotsch MT, Dang J, Herrnstadt GR, Niehus CB, Neumann K, Panzer U, Berasain C, Avila MA, Tharaux PL, Tiegs G, Steinmetz OM

J Am Soc Nephrol, 2020, 31 (9): 1996-2012

*(*contributed equally)*

3. Diskussion

3.1. Neue Rolle des klassischen IL-6R Signalwegs bei der GN

Gegen IL-6 gerichtete Therapien sind in den letzten Jahren zunehmend in der klinischen Anwendung zum Einsatz gekommen. Gerade im Rahmen der Behandlung von Autoimmunerkrankungen erscheint die Blockade von IL-6 und seinen Signalwegen als ein vielversprechender Ansatz durch die potentielle Unterdrückung der hoch pathogenen Th17 Antwort. Die Signalweiterleitung über den IL-6 Rezeptor ist jedoch komplex und wahrscheinlich auch mit ein Grund, warum IL-6 viele verschiedene Funktionen bei unterschiedlichen zellulären Prozessen besitzt. Unser Ziel war deshalb eine bessere Charakterisierung der diversen Funktionen des klassischen IL-6 Rezeptorsignalweges und seiner Rolle bei der GN.

Aufgrund der Tatsache, dass Th17-Zellen sowie Tregs als deren regulatorische Gegenspieler wichtige Effektorzellen für die Entwicklung und Progression des Nierenschadens bei GNs sind, haben wir uns darauf fokussiert herauszufinden, ob und wie CD4+ T-Zellen durch die Signalübertragung des mIL-6R beeinflusst werden. Für diese Untersuchungen haben wir eine quadrupel transgene Mauslinie generiert, der spezifisch der IL-6R auf allen CD4+ T-Zellen fehlt und die zusätzlich zwei Fluorochrome unter dem FoxP3 bzw. IL-10 Promotor exprimiert ($CD4^{cre}$ x $IL\text{-}6R^{flox}$ x FIR x Tiger Mäuse). In einem ersten Versuch mit diesen T-Zell selektiv IL-6R defizienten Mäusen wollten wir überprüfen, inwieweit die T-Zellantwort nach einer Antigen-Immunisierung verändert ist. Wir fanden als einen Hauptbefund, sowohl im Blut, als auch in der Milz eine deutliche Reduktion der Th17 Immunität. Dies äußerte sich in einer verminderten Aktivierung des Master-TFs RORγt, als auch in der reduzierten Expression der Effektorzytokine IL-17A und IL-17F aus CD4+ T-Zellen. Dieser Befund bestätigt zum einen die wichtige Funktion von IL-6 auf CD4+ T-Zellen für die Differenzierung in Th17-Zellen und zum anderen, dass der klassische IL-6R Signalweg über den mIL-6R und nicht das potentielle und bisher nicht durch unabhängige Arbeiten bestätigte Cluster-Signaling dafür essentiell und hauptverantwortlich ist. Als nächstes wollten wir untersuchen, inwieweit die Funktion des mIL-6R Signalweges in CD4+ T-Zellen wichtig ist für den Verlauf der GN. In Anbetracht der Tatsache, dass die Expression der Cre-Rekombinase unter dem CD4 Promotor auch diverse, nicht CD4+ T-Zellen beeinflusst, wie z.B. alle CD8+ T-Zellen, haben wir uns entschieden aus der Milz hochrein isolierte CD4+ T-Zellen der knockout

Linie bzw. den entsprechenden Kontrollen in T-Zell defiziente Rag1 Knockout-Mäuse (Rag1$^{-/-}$-Mäuse) zu transferieren und in diesen GN Studien durchzuführen. In einem ersten Experiment haben wir gesamt CD4+ T-Zellen mit oder ohne den mIL-6R in Rag1$^{-/-}$-Mäuse transferiert und nach 7 Tagen die Veränderung der klinischen und immunologischen Parameter analysiert. Passend zu den Ergebnissen aus den Immunisierungs-Experimenten beobachteten wir auch im NTN-Modell eine signifikante Reduktion der Th17 Immunantwort, die sich durch reduzierte RORγt Aktivierung und verminderte Produktion von IL-17A aus CD4+ T-Zellen in der Niere als auch in der Milz auszeichnete. Weiterhin war die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Niere, welche den Effektor-Arm der Th17 Antwort darstellen, in der Abwesenheit des mIL-6R auf CD4+ T-Zellen ebenfalls deutlich vermindert. Dieses bestätigte die Wichtigkeit des klassischen IL-6 Signalweges für die Induktion und Funktionalität der Th17 Antwort. Entgegen der Erwartungen führte diese klare Reduktion der pathogenen Th17 Antwort jedoch nicht zu einer Besserung des Gewebeschadens und der klinischen Parameter. Dieses Resultat lässt vermuten, dass der IL-6 Signalweg auf CD4+ T-Zellen neben der Induktion der pathogenen Th17-Zellen eine weitere, bisher unbekannte anti-inflammatorische Rolle besitzt. Da wir vermuteten, dass der klassische IL-6 Signalweg möglicherweise auch die Treg Antwort modifizieren könnte, haben wir in einem nächsten Schritt analysiert, wie sich die NTN verhält, wenn wir komplett Treg depletierte CD4+ T-Effektorzellen (Teff) mit bzw. ohne mIL-6R transferierten. In diesem Fall konnten wir zeigen, dass sich der renale Schaden in Abwesenheit des mIL-6R auf Teff gegenüber den Kontrollen mit intaktem mIL-6R auf Teff verbesserte. Erneut zeigte sich auch die Wichtigkeit des mIL-6R für die Generierung der pathogenen Th17 Antwort. Durch das Ergebnis diese Experimente verstärkte sich unsere Vermutung, dass die klassische IL-6R Signalübertragung neben den pro-inflammatorischen Eigenschaften über die Induktion von Th17-Zellen auch eine verstärkende anti-inflammatorische Funktion über die Modulation von Tregs besitzt. Um zu klären, ob und wie der IL-6R die Funktion von Tregs unterstützt, haben wir zunächst geprüft, ob IL-6, wie in der Literatur postuliert, die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 aus FoxP3+ Zellen oder aus Teff generell verstärken kann. Mittels Analysen unserer Doppelreporter-Mäuse für IL-10 und FoxP3 konnten wir nach Immunisierung jedoch keine Änderung in der IL-10 Produktion von Tregs oder Teff in Abwesenheit des mIL-6R auf CD4+ T-Zellen beobachten. Da IL-6 wichtig ist für die Induktion von RORγt in Teff, wir aber auch kürzlich zeigen konnten, dass eine spezielle Treg Subklasse RORγt aktiviert, haben wir untersucht, ob IL-6 vielleicht ebenfalls wichtig ist für die Induktion dieser RORγt+ Treg Population. In der Tat fanden wir, dass renale und systemische RORγt+FoxP3+ biTregs im NTN-Modell

deutlich reduziert waren nach Transfer von mIL-6R defizienten gesamt CD4+ T-Zellen. Passend hierzu zeigten sich auch im naiven Zustand und nach Immunisierung weniger biTregs in unseren $CD4^{cre}$ x $IL\text{-}6R^{flox}$ x FIR x Tiger Mäusen. Ebenso fanden wir ein fast völliges Fehlen der biTregs in IL-6 pan knockout Mäusen. Anhand dieses konsistenten Ergebnisses, dass sowohl Mausstamm- als auch Modell-übergreifend ist, führten wir eine tiefgreifende Analyse der funktionellen Relevanz des klassischen IL-6R Signalwegs auf die Funktion von Tregs durch.

Wir beobachteten, dass regulatorische T-Zellen weniger in die Niere einwanderten sowohl nach Transfer von mIL-6R defizienten T-Zellen als auch in kompletten IL-6 knockout Mäusen. Im Vergleich dazu gab es jedoch keinen prozentualen Unterschied der systemischen Tregs, was darauf hindeutete, dass der mIL-6R entscheidend für die Steuerung der Migration der Tregs in die Niere ist. Wir überprüften daher, ob möglicherweise der für RORγt+ Th17-Zellen charakteristische Traffickingrezeptor CCR6 in Abhängigkeit vom mIL-6R Signalweg auch auf Tregs exprimiert wird. Unsere Analysen in der $CD4^{cre}$ x $IL\text{-}6R^{flox}$ x FIR x Tiger Reporterlinie bestätigten diese Vermutung und zeigten, dass mIL-6R defiziente Tregs weniger CCR6 im naiven wie im immunisierten Zustand exprimierten. Aus vorausgegangenen eigenen Studien wussten wir, dass der CCR6 wichtig ist für die Migration von zwei unterschiedlichen Treg Populationen. Zum einen für die von biTregs, zum anderen auch für die Wanderung von Th17 spezifischen Treg17 Zellen. Deshalb war das Ziel, in einem nächsten Schritt zu ermitteln, ob das Fehlen des mIL-6R auf Tregs in beiden Populationen die CCR6 Expression signifikant reduziert, oder es eine spezifische Abschwächung der Rezeptorexpression nur auf einer der beiden Populationen gibt. Dafür haben wir die Expression des CCR6 auf biTregs (CCR6+RORγt+ Tregs) und Treg17 Zellen (RORγt-CCR6+ Tregs) in An- und Abwesenheit des mIL-6R verglichen. Interessanterweise fanden wir, sowohl für die Immunisierung der Reporterlinie, als auch im adoptiven Zelltransfer mit nachfolgender NTN ausschließlich eine Abnahme von CCR6+RORγt+ biTregs und nicht von CCR6+RORγt- Treg17 Zellen in Abwesenheit des mIL-6R auf Tregs. Dieses spezifische Ergebnis bestätigte noch einmal die Unabhängigkeit der biTreg und Treg17 Populationen. Nachdem wir nun zeigen konnten, dass der klassische IL-6R Signalweg eine potentiell anti-inflammatorische Funktion auf Tregs besitzt, die besonders wichtig für die Induktion von biTregs und deren Traffickingrezeptor CCR6 ist, wollten wir mittels verschiedener *in vitro* Versuche unsere *in vivo* Ergebnisse ergänzen und überprüfen inwieweit die Stimulation mit IL-6 die Funktionalität von Tregs beeinflussen kann. Passend zu den vorhergegangenen Ergebnissen sahen wir in isolierten und kultivierten Tregs eine Hochregulierung von RORγt nach IL-6 Stimulation. Außerdem waren durch IL-6 die

biTreg charakteristischen Oberflächen-Moleküle CTLA-4, ICOS und CD130 verstärkt exprimiert, die zudem assoziiert sind mit einer verstärkten Treg Funktion[38, 119]. Die zweite Beobachtung, die wir machen konnten, war, dass Tregs ohne mIL-6R im *in vitro* Suppressionsassay zum einen weniger anti-inflammatorisches IL-10 bilden und zum anderen schlechter die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-17 unterdrücken. Passend zu diesen *in vitro* Daten war auch die suppressive Kapazität auf die Proliferation von Teff *in vivo* gemindert, wenn den Tregs der mIL-6R fehlte.

Darauf aufbauend sollte in einem weiteren Versuch die funktionelle Relevanz des Treg intrinsischen IL-6R Signalweges für die GN ermittelt werden. Dafür wurden mIL-6R defiziente bzw. intakte Tregs isoliert, zusammen mit wildtyp Teff in $Rag1^{-/-}$-Mäuse transferiert und im Modell der NTN studiert. Im Einklang mit unserem Konzept zeigte sich eine spezifische Reduktion von biTregs in der Niere und der Milz in Abwesenheit des mIL-6 Rezeptors auf Tregs. Die pathogene Th17 Antwort blieb durch selektives Fehlen des mIL-6R auf Tregs unbeeinflusst. Von besonderer Bedeutung ist zudem, dass sich eine Verschlechterung der GN in den Tieren zeigte, die mIL-6R defiziente Tregs erhalten hatten. Dies belegt eine funktionelle Relevanz des klassischen IL-6R Signalweges für die Induktion von biTregs und offenbart eine bisher unbekannte protektive Funktion von IL-6. Zusammengefasst zeigt unsere Studie somit, dass der klassische IL-6R Signalweg auf CD4+ T-Zellen zwei wichtige, aber konträre Funktionen hat (Abbildung 4). Erstens die Induktion von nephritogenen RORγt+ Th17-Zellen und zweitens die Expansion von protektiven biTregs mit verstärkter suppressiver Kapazität und Expression des Traffickingrezeptors CCR6.

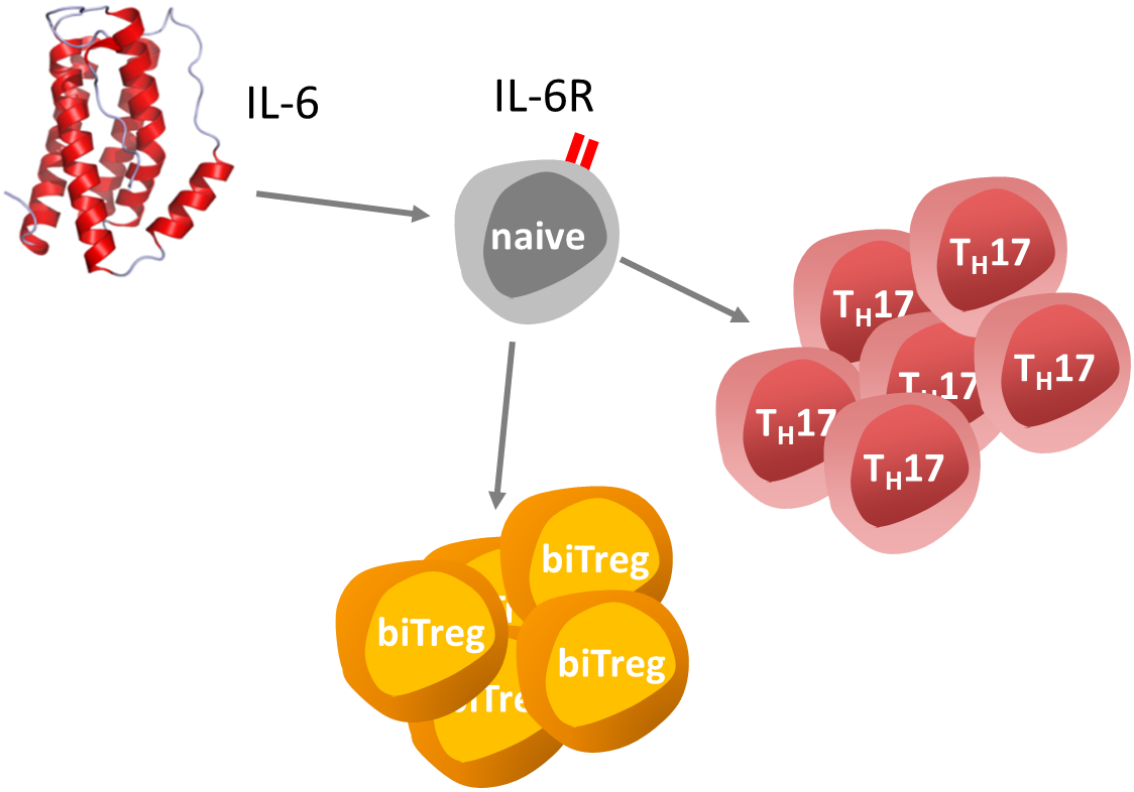


Abbildung 4: Der klassische IL-6R Signalweg hat in naiven CD4+ T-Zellen pro-inflammatorische Effekte durch die Induktion einer pathogenen Th17 Antwort, jedoch gleichzeitig anti-inflammatorische Eigenschaften via Induktion von protektiven CCR6+ biTregs mit verstärkter immunsuppressiver Funktion.

Mit diesen Ergebnissen widersprechen wir der verbreiteten Annahme, dass IL-6 ausschließlich als pro-inflammatorischer Mediator die Differenzierung von Th17 unterstützt und die protektive Treg Funktion supprimiert. Diese von uns entdeckte gleichermaßen pro- und anti-inflammatorische Wirkung beeinflusst wesentlich die Anwendung der IL-6 gerichteten Therapien bei entzündlichen Nierenerkrankungen. Aufgrund dieser neuen Erkenntnissen erscheint eine unselektive Blockade von IL-6 oder des IL-6R nicht als die beste Methode und liefert gleichzeitig eine potenzielle Erklärung, warum klinische Studien zur GN Behandlung mit IL-6-Blockern bisher nur negative Ergebnisse lieferten.

Abhilfe könnte die Entwicklung spezifischerer Strategien und Targets schaffen, wie zum Beispiel ein selektives Blocken des Trans-Signalweges des IL-6 Rezeptors, der für GNs und andere Autoimmunerkrankungen als prädominant pathogen vermutet wird[81, 120, 121]. Sicher ist es zudem perspektivisch interessant zu klären, wie sich die Unterschiede zwischen trans- und klassischem Signalweg begründen. Vermutet wird, dass der zeitliche Verlauf der Aktivierung der unterschiedlichen Signaltransduktionen wichtig ist. Der klassische Weg ist zu einem frühen Zeitpunkt aktiv und die trans-

Variante ist im späteren Verlauf von inflammatorischen Erkrankungen dominant.
Alternativ könnte der Auslöser für eine pro- oder anti-inflammatorische IL-6R Signalübertragung auch von der zellulären Quelle des IL-6 abhängen. In einer erst kürzlich erschiene Studie wird IL-6 sekretiert von Mastzellen als essentiell für die Entstehung von biTregs postuliert[122]. Über welchen Weg und mit welchen Cofaktoren das IL-6 aus Mastzellen die Entwicklung der RORγt+ Tregs induziert, wurde von den Autoren jedoch nicht weiter untersucht. Ausgehend von unseren Daten ist es möglich, dass IL-6 sekretiert von Mastzellen die klassische IL-6R Signaltransduktion in T-Zellen aktiviert und dass in der Konsequenz RORγt+ Treg vermehrt gebildet werden. Für eine sichere Aussage über die differentielle Steuerung und Aktivierung der verschiedenen IL-6R Signalwege in Abhängigkeit der zellulären Quelle von IL-6 müssten zukünftig weitere und spezifischere Untersuchungen folgen. Im Kontext einer spezifischen Blockade der IL-6 Signalwege ist das jüngst entdeckte Cluster-Signaling ebenfalls hoch spannend. In ihrem Modell der EAE beschreiben die Autoren, dass durch die Signalweiterleitung von IL-6 über Trans-Präsentation, gebunden an den IL-6R auf DCs, an T-Zellen, spezifisch pathogene Th17-Zellen induziert werden[72]. Die Untersuchung des Cluster-Signaling im Vergleich zum klassischen IL-6R Signalweg wäre daher ein interessantes Anschlussprojekt. Möglicherweise könnte eine DC abhängige IL-6R Aktivierung auf CD4+ T-Zellen selektiv pathogene Th17-Zellen, aber nur gering die biTreg Induktion beeinflussen. Diese relevante Frage könnte beispielsweise in unserem NTN-Modell mittels eines spezifischen Knockouts des IL-6R auf CD11c positiven DCs analysiert werden.

Als weitere Therapiemöglichkeit, wäre es natürlich sehr elegant, sowohl die Th17 Differenzierung zu verhindern aber gleichzeitig die Aktivierung anti-inflammatorischer biTregs zu fördern. Diesbezüglich gibt es Ansätze aus der „cell directed therapy“, bei der überlegt wird, wie eine zellspezifische Expansion erreicht werden kann oder alternativ das gewünschte Target (in diesem Fall der mIL-6R) selektiv nur auf den entsprechenden Zielzellen beeinflusst werden kann. Eine praktische Umsetzung einer solchen Therapie wäre beispielsweise, dass Tregs aus dem Blut von Patienten isoliert und *ex vivo* spezifisch über den IL-6R stimuliert, expandiert und im Anschluss reinfundiert werden. Diese Methodik ist vielversprechend und wird aktuell in Pionierstudien bereits bei unterschiedlichen immunologisch vermittelten Erkrankungen angewendet.

Zusammengefasst sind selektive Blocker für die unterschiedlichen Signal-transduktionswege von IL-6, Zelltyp-spezifische Interventionen am IL-6R oder eine selektive *ex vivo* Expansion relevanter anti-inflammatorischer Zellen potenzielle neue

Möglichkeiten, wie Patienten mit inflammatorischen Nierenschäden geholfen werden könnte. Selbstkritisch muss an dieser Stelle aber auch angemerkt werden, dass unsere gewonnenen neuen Erkenntnisse allein aus Experimenten im murinen Modell stammen. Eine Validierung der Resultate mit Analysen der Effekte des IL-6R Signalweges auf humane Th17-Zellen und Tregs wäre daher zukünftig anzustreben und könnte die Aussagekraft und Relevanz unserer Daten unterstreichen.

3.2. Die Rolle von Amphiregulin bei der akuten GN

Die zweite Studie aus dieser Dissertationsarbeit hatte zum Ziel, die Rolle des EGFR-Liganden und Wachstumsfaktors AREG bei der akuten GN zu untersuchen. Das übergeordnete Ziel hierbei war, neue und spezifischere Targets für die klinische Behandlung von Patienten mit GNs zu identifizieren, da die aktuell verfügbaren Therapieansätze mit vielen Nebenwirkungen verbunden sind. Der Rezeptor EGFR wurde in den letzten Jahren aufgrund seiner elementaren Rolle in der Krebs- und Tumorbehandlung eingehend charakterisiert und es sind bereits verschiedene Blocker, sowohl für die Bindungsstelle der Liganden als auch für die intrazellulären Tyrosinkinasen des Rezeptors im klinischen Einsatz. Diese Ansätze blocken jedoch unselektiv die Effekte aller bisher charakterisierten sieben Liganden des EGFR. Daten aus der Literatur lassen jedoch stark unterschiedliche und zum Teil gegensätzliche Effekte der verschiedenen Liganden vermuten[92-95]. Es wäre somit wünschenswert, die differentiellen Effekte besser zu verstehen und selektive Blockadestrategien zu entwickeln. Für das Feld der immunvermittelten Erkrankungen ist der EGFR Ligand AREG von besonderer Bedeutung, da in diversen aktuellen Studien eine neue und zuvor unbekannte Rolle von AREG für die Regulation verschiedener Autoimmun-erkrankungen beschrieben wurde[101, 110, 123, 124]. Die AREG/EGFR Achse könnte somit ein vielversprechendes Therapietarget sein.
Da bisher jedoch keinerlei Daten über AREG und seine Funktion in der akuten GN vorhanden sind, haben wir mit unserer aktuellen Studie analysiert, welchen Einfluss AREG auf den experimentellen Nierenschaden hat und in welcher Weise AREG die pathogene Immunantwort moduliert. Für diese Untersuchungen wählten wir, genau wie für unsere IL-6R Studie, das Modell der NTN, was dem humanen Krankheitsbild der RPGN, wie z.B. der ANCA assoziierten Vaskulitis, entspricht. In einem ersten Schritt interessierte uns die Expression von AREG, sowie der anderen sechs EGFR Liganden im zeitlichen Verlauf der NTN. Es zeigte sich spezifisch für AREG eine deutliche Hochregulation in der akuten Phase der GN. Die anderen sechs Liganden

fanden sich zum Teil konstitutiv exprimiert, jedoch nie hochreguliert bzw. der Ligand EGF war sogar deutlich herunterreguliert. Das bestätigte eine mutmaßlich individuelle Funktion von AREG als Liganden des EGFRs. Als Produktionsort für AREG konnten wir sowohl murine Mesangiumzellen (mMC) als auch mPTCs mittels *in vitro* Analysen identifizieren. Interessanterweise fanden wir, dass AREG in einem feed forward loop seine eigene Expression selber induzieren kann, was in Kombination mit dem multifunktionalen Zytokin TNFα noch verstärkt wurde. Im Vergleich dazu hatte eine Stimulation von mMCs und mPTCs mit verschiedenen gut bekannten Mediatoren der GN wie IL-17, IL-6 und IFNy keinen Effekt auf die Expression von AREG.

Im nächsten Schritt interessierte uns dann die funktionelle Relevanz der starken Hochregulation von AREG im NTN-Modell. Abgeleitet von der verstärkten Induktion von AREG an den Tagen 7 und 10 nach Induktion des NTN-Modells, wählten wir diese Tage als Endpunkte unserer Analysen. Für beide Zeitpunkte waren in Abwesenheit von AREG eine deutliche Reduktion des Gewebeschadens und eine verbesserte Nierenfunktion zu beobachten. Diese Daten offenbarten eine pro-inflammatorische Rolle von AREG im Rahmen der NTN. Diese Beobachtung war unerwartet, da kürzlich eine wichtige Funktion von AREG für die Suppressivität von Tregs beschrieben wurde[113, 115, 125] und AREG zudem in verschiedenen Studien als ein positiver Regulator für Wundheilung und Regeneration identifiziert wurde[104-107].

Unsere nächste Fragestellung bestand somit darin, Mechanismen zu identifizieren, die eine pro-inflammatorische Funktion von AREG bei der NTN erklären können. Diesbezüglich beobachteten wir selektiv für myeloiden Zellen eine signifikante Reduzierung der Aktivierung und Infiltration in die Niere in AREG$^{-/-}$ Mäusen. Bezüglich der Zahl der infiltrierenden T-Zellen hingegen konnten wir zu beiden Zeitpunkten in der Niere keine relevante Änderung detektieren. Das implizierte eine prädominante Relevanz der myeloiden Zellen für die beobachteten Resultate. Die detaillierte Betrachtung der infiltrierten Monozyten/Makrophagen (M/M) Population zeigte passend hierzu eine Reduktion von pro-inflammatorischen M1-Zellen sowie eine Verschiebung der Makrophagen Differenzierung in Richtung anti-inflammatorischer M2-Makrophagen. Diese Beobachtung könnte eine Erklärung für die dokumentierte Abmilderung des Nierenschadens der AREG$^{-/-}$ Mäuse sein. Die Verschiebung des M/M Phänotyps in Richtung M2 war nicht in der Milz, sondern selektiv nur in der Niere erkennbar und wies damit auf eine lokale Regulierung der M/M im Milieu der entzündeten Niere hin. Als potentiell zugrundeliegende Mechanismen fanden wir eine deutliche Reduktion der Expression typischer Chemokine für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und M1 Makrophagen, wie CCL2, CXCL1 und CXCL5 im renalen Gewebe. Diese für das Anlocken der M/M wichtigen Chemokine wurden

hierzu passend nach *in vitro* Stimulation von mMC und mPTC mit einer AREG/TNFα Kombination deutlich verstärkt sezerniert. Damit kann festgehalten werden, dass AREG die Infiltration von pro-inflammatorischen myeloiden Zellen in die Niere über einen indirekten Mechanismus steuert. Weitere Studien zeigten, dass dies jedoch keine einzigartige Funktion von AREG ist. Der *in vitro* Vergleich mit HB-EGF und EGF Stimulation zeigte eine ähnliche Induktion der Chemokin-Expression aus mMCs und mPTCs, welche jedoch insgesamt schwächer ausgeprägt war. Als einzigartig für AREG zeigte sich allerdings die Induktion einer erhöhten Transkription des Koloniestimulierenden Faktors 2 (CSF-2 oder auch als GM-CSF bekannt) aus mMCs und mPTCs, das bekannt für seine Unterstützung bei der M/M Proliferation sowie der Differenzierung von M/M in einen M1 Phänotyp ist. Eine weitere Wirkung von AREG auf myeloide Zellen, die wir in dieser Studie identifizieren konnten, war neben den indirekten Effekten auch die direkte Beeinflussung der M/M Proliferation und Induktion des M1 Makrophagen Phänotyps. Eine direkte *ex vivo* AREG Stimulation von Makrophagen bewirkte eine verbesserte Proliferation gegenüber nicht stimulierten oder mit HB-EGF bzw. EGF stimulierten Makrophagen. Das gleiche eindeutige Muster im Vergleich der EGFR Liganden ergab sich für die Induktion der Produktion des pro-inflammatorischen und für M1 Makrophagen charakteristischen Zytokins IL-1ß. Damit scheint AREG selektiv die Proliferation von Makrophagen als auch eine Aktivierung und Differenzierung Richtung M1-Phänotyp zu modulieren. Ergänzt wird dieses Bild durch eine Reduktion der M2 charakteristischen Phagozytoseleistung von M/M nach AREG Stimulation. Eine spannende Frage, die sich aus diesen beobachteten Resultaten ergab, war die nach der Quelle der AREG Sekretion, die für die Effekte auf die M/M Antwort verantwortlich ist. Eine kürzlich erschienene Studie, welche eine starke pro-fibrotische Rolle von AREG in einem anderen Modell der Nierenerkrankung beschrieb, identifizierte passend zu unseren *in vitro* Daten mPTCs als wichtige Produzenten von AREG[103]. Um in unserem Modell die funktionell entscheidende zelluläre Quelle des pro-inflammatorischen AREG zu identifizieren, entschieden wir uns, Knochenmarktransplantations-Experimente durchzuführen. Es zeigte sich, dass der Transfer von wildtyp Knochenmark in bestrahlte AREG defiziente Mäuse ähnliche Effekte beim Nierenschaden und der Regulation der M/M zeigt, wie die Experimente in der AREG$^{-/-}$ Maus. Im Gegensatz dazu waren bestrahlte wildtyp Empfänger von AREG knockout Knochenmark nicht geschützt vor der Nephritis. Damit konnten wir indirekt beweisen, dass das pro-inflammatorische AREG in unserem Modell der NTN aus residenten Nierenzellen stammt und weniger aus infiltrierenden Leukozyten. Zusammenfassend deckten unsere bisherigen Daten somit zwei Wege auf, wie AREG pathogene myeloide Zellen in ihrer Wirkung verstärken kann (Abbildung 5). Das erste

ist die indirekte Art durch die Induktion einer vermehrten Sekretion von Chemokinen aus residenten renalen Zellen, die ein vermehrtes Einwandern von M/M und Granulozyten in die Niere unterstützen. Der zweite Mechanismus ist die direkte Einflussnahme von AREG auf die Polarisierung und Expansion von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen.

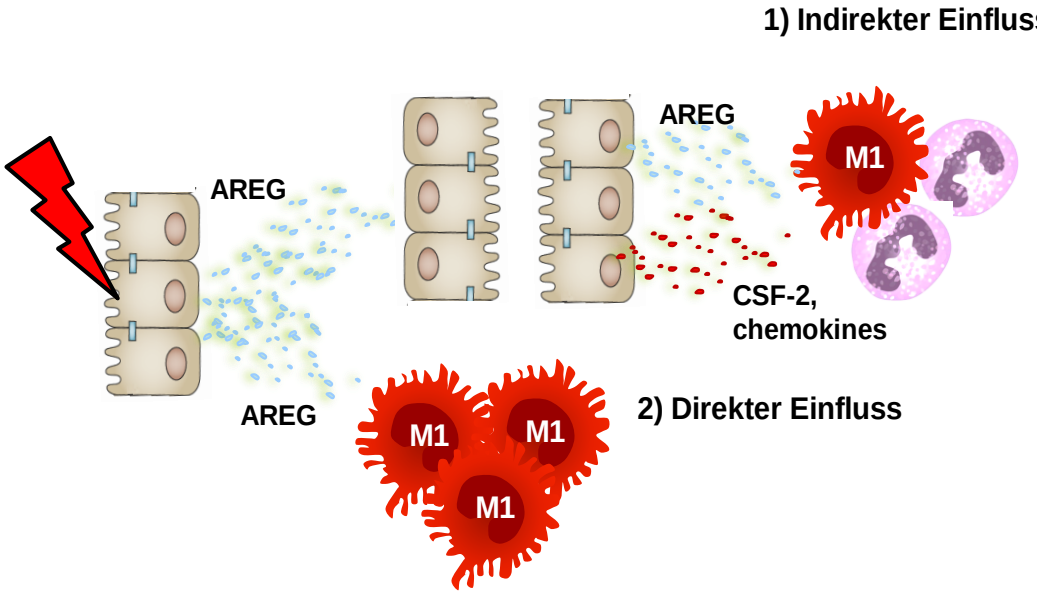


Abbildung 5: Durch Inflammation induzierte AREG Sekretion aus residenten renalen Zellen verstärkt den Nierenschaden 1) indirekt durch Induktion der Chemokin-Sekretion mit folgender Rekrutierung von pro-inflammatorischen myeloiden Zellen und 2) durch direkte Verstärkung der Aktivierung, Polarisierung und Proliferation von M1 Makrophagen.

Unsere Ergebnisse unterstützen somit ein neues Konzept, welches davon ausgeht, dass von Leukozyten sezerniertes AREG protektiv und anti-inflammatorisch wirkt[104-106, 108, 109, 111, 125] während AREG aus epithelialen Zellen pro-fibrotisch[103] und pro-inflammatorisch ist. Um eine potenzielle klinische Anwendbarkeit AREGs in der akuten GN zu untersuchen, haben wir im Modell der akzelerierten NTN[57] spezifisch AREG mittels Antikörpergabe geblockt. Dieses Modell besteht aus einer vorgeschalteten Immunisierung mit anschließender Induktion der Nephritis und der therapeutischen Verabreichung des anti-AREG Antikörpers. Dieses Setup ermöglicht die unbeeinflusste Entwicklung einer T-Zellantwort in der Immunisierungsphase, sodass in der Effektorphase der Nephritis die Neutralisierung von AREG primär auf renale Makrophagen wirken kann und nur einen minimalen Effekt auf die T-Zellen hat. Als wichtige Beobachtung konnte in Abhängigkeit der verabreichten Antikörper Dosis eine Verbesserung des Nierenschadens beobachtet werden. Hierdurch ergibt sich eine potenzielle Anwendbarkeit eines AREG Blockers in der Klinik für die Therapie des akuten Makrophagen vermittelten Nierenschadens, wie beispielsweise im Rahmen

von renalen Vaskulitiden. Auf Grundlage dieses Ergebnisses wäre es sicherlich interessant herauszufinden, ob eine vergleichbare Verbesserung auch durch die Blockade anderer EGFR Liganden zu erzielen wäre. Aus der Literatur gibt es diesbezüglich jedoch durchaus Vermutungen, dass die Liganden des EGFR unterschiedliche bis entgegengesetzte Funktion haben können. Dieses könnte durch unterschiedliche Bindungsaffinität und differentielle intrazelluläre Rezeptoraktivierung durch Phosphorilierung an unterschiedlichen Tyrosinresten bedingt sein[112, 126]. Ein Vergleich der Blockade verschiedener Liganden, im Speziellen von AREG versus HB-EGF und EGF ist daher für eine weitere Aufschlüsselung der differenzielle Bedeutung von AREG und seinen Einflüssen in der akuten GN hoch spannend und sollte in weiteren Studien berücksichtigt werden.

In weiteren Versuchen überprüften wir dann, ob ein selektives Fehlen des EGFR auf M/M ausreichend ist für eine Verbesserung des Nierenschadens bei der NTN. Wir generierten dafür einen Mausstamm in welchem spezifisch der EGFR auf myeloiden Zellen fehlte. Mit diesem Setup kann vermieden werden, dass T-Zellen oder andere, bisher unbekannte von AREG beeinflusste Zellen beeinträchtigt sind. Auch in diesen Mäusen fanden wir eine signifikante Reduktion des Nierenschadens, vermittelt durch das Fehlen des EGFRs alleinig auf myeloiden Zellen. Im Einklang mit anderen Studien zur experimentellen Colitis[127] oder Infektion[128], war die Unterdrückung der EGFR Signalkaskade in myeloiden Zellen begleitet von einer eingeschränkten renalen Infiltration von M/M und einer Verschiebung der Makrophagenpolarisierung in Richtung M2-Phenotyp. Weiterhin war die mRNA Expression von M1 charakteristischen Molekülen wie TNFα und iNOS in der Niere signifikant reduziert in den Mäusen mit selektiver EGFR Defizienz auf Makrophagen. Im Einklang mit unseren Daten aus den AREG pan-knockout Mäusen zeigte sich der EGFR ebenfalls wichtig für den Schutz der M/M vor Apoptose.

Abschließend wollten wir die potentielle klinische Relevanz unserer Beobachtungen für humane Formen der GN überprüfen. Diesbezüglich waren wir in der Lage die Expression von AREG in Nierenbiopsien von Patienten mit zwei verschiedenen Formen der RPGN nachzuweisen. Unterstützend zu unseren murinen Ergebnissen, war eine starke Hochregulierung von AREG in verschieden residenten Nierenzellen der GN Patienten im Vergleich zu Kontrollen erkennbar. Besonders starke Expression fand sich in parietalen Epithelzellen, Podozyten und Tubuluszellen. Zusätzlich zeigten sich jedoch auch AREG positive Zellen im periglomerulären Infiltrat, was höchstwahrscheinlich einer Expression in infiltrierenden Immunzellen entspricht. Insgesamt fanden wir somit eine starke AREG Expression in vielen, sehr

unterschiedlichen Zellen der entzündeten Niere und des Immunsystems. Unsere und andere publizierte Daten lassen dabei vermuten, dass die zelluläre Quelle von AREG entscheidend für die pro- oder anti-inflammatorische AREG Wirkung ist. In Folgestudien sollten daher die exakten Quellen von AREG besser definiert und charakterisiert sowie hinsichtlich ihrer individuellen Relevanz für die Regulation der GN untersucht werden.

Bezüglich unserer aktuellen Studie kann zunächst zusammengefasst werden, dass wir mit AREG einen neuen Mediator der akuten GN identifiziert haben, welcher aus renalem Gewebe sezerniert wird und sowohl direkte als auch indirekte pro-inflammatorische Effekte auf myeloide Zellen besitzt. Im Detail umfasst das zum einen die Verstärkung der Infiltration myeloider Zellen in die Niere durch die Induktion von Chemokin-Sekretion aus residenten renalen Zellen. Zum anderen bewirkt AREG in M/M eine Polarisierung zum M1 Typ und verstärkt deren Proliferation und Zytokinproduktion. Darüber hinaus gibt unsere Studie den Hinweis, dass die Neutralisierung von AREG in der akuten Phase von GNs eine mögliche neue Therapieoption darstellt.
Nichtsdestotrotz muss an dieser Stelle auch festgehalten werden, dass unsere Studie nur einen Teil der Funktionen von AREG bei der GN charakterisieren konnte. Zu den offenen Fragen zählt beispielsweise die Rolle von AREG bei der chronischen GN, wie insbesondere der Lupusnephritis. Dass AREG in diesem Rahmen eine Relevanz besitzen könnte, zeigte bereits die Studie von Ishii et al., die AREG als eins der am stärksten hochregulierten Gene in Leukozyten aus dem Blut von SLE Patienten identifizierte[129]. Erste Anhaltspunkte, dass AREG in der Tat auch in dieser komplexen chronischen Erkrankung eine wichtige Rolle spielt, konnten wir in unserem induzierbaren Modell für die Lupusnephritis gewinnen. Nach peritonealer Pristaneöl-Injektion entwickelte sich in diesem Modell eine chronische Inflammation, welche im Verlauf zur Entwicklung von Autoimmunität führt. $AREG^{-/-}$ Mäuse zeigten in diesem Modell eine signifikante Verstärkung der für die Lupusnephritis charakteristischen glomerulären Immunkomplex Ablagerungen sowie des renalen Schadens. Diesen klinischen Phänotyp konnten wir in einem zweiten, genetischen Modell mit sich spontan entwickelnder Lupusnephritis (MRL/lpr Mäuse) bestätigen. Diese Beobachtungen stehen im kompletten Gegensatz zu der von uns publizierten pro-inflammatorischen Rolle von AREG bei der akuten GN.

Die resultierende Frage ist daher, welche Mechanismen dieser anti-inflammatorischen Funktion von AREG bei der Lupusnephritis zugrunde liegen. Im Rahmen unserer Studie zu AREG im akuten NTN-Modell machten wir bereits die Beobachtung, dass es

ohne AREG zur Dysregulation der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion von Teff kam. Es finden sich somit zwei gegensätzliche durch AREG vermittelte Effekte. Zum einen die Aktivierung von M1 Typ Makrophagen und zum anderen die Herunterregulation von pathogenen T-Zell Antworten. Im Rahmen von akuten Inflammationsprozessen überwiegt unserer Ansicht nach die Bedeutung der pro-inflammatorischen Wirkung auf Makrophagen. Im Langzeit Modell mit chronischer autoimmunologisch vermittelter renalen Schädigung nehmen T-Zellen eine zentralere Rolle ein und es scheinen die AREG Effekte auf T-Zellen funktionell wichtiger zu sein. Unabhängig von unseren Beobachtungen gibt es einige Studien, die nahelegen, dass die AREG Sekretion einen Einfluss auf die suppressive Kapazität von Tregs besitzt[113]. In einer der aktuellsten Studien wurde explizit auch eine Rolle von AREG aus Makrophagen für die Suppression von IFNy produzierenden Th1-Zellen beschrieben[110]. Inwieweit es sich bei diesen und unseren Beobachtungen um einen direkten Effekt von AREG auf Teff handelt oder ob die überschießende T-Effektorfunktion eine indirekte Folge von AREG Effekten auf die suppressive Kapazität von Tregs ist, bleibt aktuell unklar. Mit Hilfe von *in vitro* Assays könnte dieser Punkt weiter aufgeklärt werden. Eine mögliche Option um die Einflussnahme von AREG auf die suppressive Kapazität von Tregs zu analysieren, wären Co-Kultur Experimente von Tregs mit Teff unter Stimulation mit AREG, oder umgekehrt einem AREG inhibierenden Antikörper. Zudem könnte man zur Überprüfung der Hypothese, dass AREG direkt die Zytokinproduktion von Teff beeinflusst diese in Abwesenheit von Tregs mit AREG stimulieren oder AREG mittels Antikörper neutralisieren. Damit auch *in vivo* die Rolle der AREG Signaltransduktion auf T-Zell Populationen untersucht werden kann, könnte man den EGF-Rezeptor selektiv auf weiteren Leukozyten Populationen genetisch entfernen, wie es in unserer Publikation für Makrophagen gemacht wurde. Von besonderem Interesse wäre dabei die selektive Abwesenheit des EGF-Rezeptors auf FoxP3+ Tregs bzw. auf Teff, da es aus der publizierten Literatur Hinweise auf relevante Wirkungen von AREG auf die Treg Funktion gibt und weil unsere veröffentlichten und unveröffentlichten Daten eine deutliche Dysregulation von pro-inflammatorischen Zytokinen aus CD4+ T-Effektorzellen aufzeigen. Natürlich muss dabei immer bewusst sein, dass mit dem Fehlen des EGFR Rezeptors gleichzeitig auch die Signalweiterleitung aller sechs weiteren Liganden gestört ist. Dieses unterstreicht auch noch einmal die Wichtigkeit von *in vitro* Experimenten, die den Einfluss von AREG mit denen der anderen EGFR Liganden vergleichen.

Unabhängig von den pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften von AREG interessiert uns auch die beschriebene Rolle bei der Wundheilung und Geweberegeneration. Dieser Prozess lässt sich in einem chronischen Modell wie der

Lupusnephrits wesentlich besser untersuchen als in akuten Modellen wie der NTN, in denen die Reparationsphase fehlt. Dabei interessiert uns im Speziellen, inwieweit die Regulation der Apoptose durch Fehlen von AREG beeinflusst wird. Diesbezüglich konnten wir kürzlich eine Caspase-3 Färbung von renalem Gewebe etablieren. Hier zeigte sich eine deutlich verstärkte Apoptose von renalen Zellen in den AREG$^{-/-}$ Mäusen bei der Lupusnephritis. Der zweite interessante Mechanismus ist der der Wundheilung. Es ist bekannt, dass der EGFR wichtig ist für die Reparation von Muskelzellen[104]. Aber welche direkte Relevanz AREG oder auch einer der anderen Liganden auf beispielsweise Mesangium- oder proximale Tubuluszellen der Niere hat ist unbekannt. Eine Möglichkeit der Analyse könnte die Methode des Scratch Assays sein, bei dem *in vitro* die Fähigkeit der Reparation eines durch Kratzen verursachten Zellschadens innerhalb einer definierten Zeit beurteilt wird. Für *in vivo* Untersuchungen der Beeinflussung von Wundheilung und Geweberegeneration durch AREG sekretierende Leukozyten, wie insbesondere Tregs, planen wir Studien in Mäusen mit einer selektiven Defizienz der AREG Produktion aus FoxP3+ Tregs. Durch Kombination einer Mauslinie, bei der das AREG Gen loxP flankiert ist, mit weiteren Mauslinien, welche Zelltyp-spezifisch die Cre-Rekombinase exprimieren, haben wir die Möglichkeit, auch die spezifische Rolle von AREG aus anderen relevanten Zellpopulationen, wie Makrophagen oder CD4+ T-Zellen, im Hinblick auf reparative Funktionen sowie Regulation des Immunsystems zu untersuchen. Insgesamt können diese Untersuchungen perspektivisch helfen, die Zelltyp-spezifischen Rollen von AREG auch bei den klinisch hochrelevanten chronischen Formen der GN zu charakterisieren.

3.3. Fazit

Die Bedeutung spezialisierter T-Zellen, insbesondere des Th17 und Th1 Typs, für die Pathogenese der GN konnte in den letzten Jahren durch zahlreiche Arbeiten inklusive Studien unserer eigenen Abteilung, identifiziert und charakterisiert werden[25, 28, 32, 39]. Weniger gut verstanden und aufgeklärt sind ihre Regulation und damit einhergehend Möglichkeiten zur spezifischen Intervention und Gegenregulation der GN Pathogenese. Deshalb ist es zum einen wichtig, neue Mediatoren zu identifizieren, aber auch bekannte Zytokine oder andere Botenstoffe genauer zu erforschen, um ihren potenziellen Einfluss auf das Immunsystem bei Nierenerkrankungen besser zu verstehen.

Die zwei zu dieser kumulativen Dissertationsschrift zusammengefassten Arbeiten beschäftigen sich genau mit solchen Molekülen, deren Funktion und Relevanz bisher

ungenau oder gar nicht für die GN Pathogenese geklärt war. Durch die Anfertigung dieser beiden Studien konnten wir wichtige Rollen von AREG sowie des IL-6 Rezeptor Signalweges für die Regulierung des Immunsystems bei der akuten GN identifizieren. Mit den gefundenen Resultaten bezüglich AREG und IL-6 zeigten sich auch einige generelle Gemeinsamkeiten, die gerade für eine klinische Anwendbarkeit hoch interessant sind. Beide Moleküle sind extrem pleiotrop in ihrer Funktion. Für IL-6 und seine Signaltransduktion war ein vielseitiger Einfluss bereits bekannt. Die von uns neu beschrieben Rolle für die Induktion eines potenten anti-inflammatorischen Treg Subtyps war jedoch überraschend. Hierdurch konnten wir das bisherige Konzept über die Wirkung der klassischen IL-6 Signalkaskade revidieren und aktualisieren. Demnach wirkt IL-6 auf naive T-Zellen parallel pro-inflammatorisch mittels Induktion einer hochpathogenen Th17 Antwort, sowie anti-inflammatorisch mittels Generierung von immunsuppressiven biTregs. Ähnlich wie für IL-6 ist auch für AREG eine Vielzahl an sehr verschiedenen Eigenschaften beschrieben und gerade seine Funktion bei Autoimmunerkrankungen zeigt sich sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch. In unserem Modell der akuten GN zeigte AREG sich in der Summe als pro-inflammatorischer Mediator mit einem starken Einfluss auf die Generierung und Aktivierung pathogener M1 Makrophagen. Allerdings gibt es Anhaltspunkte, dass AREG gleichzeitig beteiligt ist bei der Herunterregulierung pro-inflammatorischer Zytokine von T-Effektorzellen. Damit präsentieren sich beide Moleküle nicht nur pleiotrop im Rahmen verschiedener experimenteller Erkrankungen, sondern können innerhalb desselben Krankheitsbildes extrem heterogen wirken durch Vermittlung zum Teil gegensätzlicher Funktionen in unterschiedlichen Zellen. Die unterschiedlichen Wirkungen von AREG und IL-6 stehen wesentlich im Zusammenhang mit der zellulären Quelle bzw. der Art der Aktivierung des nachgeschalteten Signalweges. Weitergedacht bedeutet es, dass das räumliche und zeitliche Umfeld einen wichtigen Beitrag zur differentiellen Funktionen von Entzündungsmediatoren am Ort der Entzündung beisteuert. Hierdurch wird offensichtlich, dass eine klinische Anwendung mittels Manipulation solch pleiotroper Moleküle eines sehr guten und detaillierten Verständnisses über den Krankheitsverlauf und die involvierten Immunzellen bedarf. Zudem wird klar, dass der Einsatz von Zelltyp- bzw. Signaltyp-spezifischen Behandlungsmethoden gegenüber der unselektiven Blockade ganzer Rezeptor-Signalwege zu bevorzugen ist.

Mit AREG und dem IL-6R Signalweg haben wir zwei Paradebeispiele gefunden, die extrem wichtige Funktionen im Immunsystem und konsekutiv auf die Regulierung der Inflammationsprozesse bei entzündlichen Nierenerkrankungen besitzen. Eine therapeutische Intervention an jedem der beiden Signalwege erscheint

vielversprechend. Jedoch sind die aktuell verfügbaren Interventionsmöglichkeiten an den AREG bzw. IL-6 Kaskaden für die Behandlung von GNs derzeit noch nicht zufriedenstellend. Bezüglich IL-6 gerichteter Interventionen legen unsere Daten nahe, dass eine differenzielle Blockade der verschiedenen Signalwege maßgeschneidert an die individuell zu therapierende Erkrankung erfolgen sollte. Ebenso müssen Interventionen genau an den speziellen Zeitverlauf der IL-6 Expression und die Aktivierung der unterschiedlichen IL-6 Signalwege während der Inflammationsreaktionen angepasst werden.
Für Interventionen die sich gegen die pleiotrope AREG/EGFR Achse richten verhält es sich ähnlich. Insbesondere zeichnet sich diesbezüglich zusätzlich ab, dass Therapeutika entwickelt werden müssen, welche die AREG Sekretion und/oder die AREG/EGFR Signalkaskade aus bzw. in definierten Zellpopulationen beeinflussen. Nur auf diese Weise können selektiv die pro- bzw. anti-inflammatorischen sowie regenerativen Eigenschaften der AREG Achse nutzbar gemacht werden. Ein möglicher Ansatzpunkt wären z.B. bi-spezifische Antikörper oder selektivere Tyrosinkinaseblocker.

Zusammenfassend konnten die beiden meiner Dissertation zugrundeliegenden Arbeiten wichtige neue Aspekte regulativer Prozesse für die Entzündungsreaktion im Rahmen akuter GNs präsentieren. Aus diesen Arbeiten ergeben sich jedoch, wie oben dargestellt, eine Vielzahl an neuen Fragen und Ansatzpunkten für Folgestudien mit dem übergeordneten Ziel der Entwicklung neuartiger und spezifischerer Therapien, die perspektivisch eine wirksamere und nebenwirkungsärmere Behandlung von Patienten mit GN ermöglichen.

4. Zusammenfassung

Die GN ist eine der häufigsten Ursachen für eine terminale Niereninsuffizienz und geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Die aktuellen Therapien für diese heterogene Gruppe von Autoimmunerkrankungen der Niere sind unspezifisch und mit relativ starken Nebenwirkungen verbunden. In zahlreichen Arbeiten, auch aus unserer eigenen Abteilung, konnte die zentrale Bedeutung der spezialisierten Th17- und Th1-Zellen sowie verschiedener Zellen des angeborenen Immunsystems, wie insbesondere Makrophagen für die GN Pathogenese charakterisiert werden. Die Aspekte ihrer Regulierung sind weniger gut erforscht und damit ein Hauptgrund für überwiegend unspezifische Behandlungsstrategien. Die aktuelle nephrologische Forschung beschäftigt sich daher mit der Identifikation und therapeutischen Manipulation neuer spezifischerer Targets. Die zwei in dieser kumulativen Dissertation zusammengefassten Arbeiten analysieren das Vorkommen und die differentielle Funktion zweier potenter, potentiell als Therapieziele geeigneter Moleküle bei der immunvermittelten Nierenentzündung.

In der ersten Arbeit ging es um die komplexe Rolle von IL-6 und seiner Signaltransduktion für die T-Zell Regulation während der akuten GN. Für diese Studie generierten wir einen neuen Mausstamm, mit einer selektiven Deletion des IL-6 Rezeptors auf CD4+ T-Zellen. Zur Minimierung potenziell störender Effekte auf nicht-CD4+ T-Zellen durch diese genetische Manipulation nutzten wir einen adoptiven Transfer in $Rag1^{-/-}$-Mäuse, in denen konsekutiv das Modell der NTN induziert wurde. Im Vergleich zu Empfängern von wildtyp gesamt CD4+ Zellen zeigte sich eine signifikante und spezifische Reduktion der Th17 Antwort in den nephritischen Tieren nach Transfer von IL-6R defizienten CD4+ T-Zellen. Überaschenderweise fand sich trotz deuticher Reduktion der Th17 Antwort allerdings kein positiver Einfluss auf den Verlauf der Nephritis. Im Gegensatz dazu beobachteten wir jedoch eine deutliche Verbesserung des Nierenschadens durch einen alleinigen Transfer von IL-6R defizienten T-Effektorzellen ohne Beimengung von regulatorischen T-Zellen. Damit zeigten wir, dass der klassische IL-6R Signalweg zum einen eine zerstörerische Th17 Aktivität induziert, zum anderen jedoch auch wichtig ist für die Induktion der schützenden Funktion von Tregs. Mittels weiterer detaillierter *in vivo* und *in vitro* Experimente konnten wir erstmals zeigen, dass der klassische IL-6R Signalweg neben Th17-Zellen auch die stark immunsuppressiven RORγt+FoxP3+ Tregs induziert. Diese von uns als biTregs bezeichneten Zellen tragen den Migrationsrezeptor CCR6 und besitzen sehr potente anti-inflammatorische Potenz. Somit widerlegten wir die

etablierte Ansicht, dass IL-6 die Th17 Antwort induziert und gleichzeitig die Treg Funktion supprimiert. Vielmehr impliziert unsere Studie, dass der klassische IL-6R Signalweg in CD4+ T-Zellen zwar essentiell ist für die Generierung und Expansion von Th17-Zellen, aber gleichzeitig auch für die Induktion hoch suppressiver biTregs. Diese neue Erkenntnis über die Biologie von IL-6 besitzt große Relevanz für anti-IL-6 und anti-IL-6R gerichtete Therapien und verdeutlicht die Notwendigkeit einer Zelltyp- und Signalweg-spezifischeren Anwendung für die Behandlung der akuten GN.

Die zweite Arbeit untersuchte die Rolle des EGFR Liganden Amphiregulin. AREG ist bekannt für seine Rolle in der Gewebe-Entwicklung sowie -Homöostase und Tumorgenese. Kürzlich wurden jedoch zudem auch multiple pro- als auch anti-inflammatorischen Funktionen bei immunologisch vermittelten Erkrankungen beschrieben. Damit scheint AREG im Kontext des Immunsystems ein vergleichbar vielseitiges Molekül wie IL-6 zu sein, dessen genaue Rolle in der GN ebenfalls unzureichend bekannt ist. Wir analysierten welche Auswirkungen ein Fehlen von AREG ($AREG^{-/-}$ Maus) oder seiner Signalübertragung über den EGFR für die Nierenfunktion und den Gewebeschaden im Model der NTN besitzt. Da AREG genau wie IL-6 von vielen verschiedenen Zellen sekretiert werden kann, konnten *in vitro* sowie mittels eines Knochenmarktransplantations-Experimentes residente renale Zellen als funktionell wichtige Quelle von AREG in unserem Modell ausgemacht werden. Funktional zeigte sich in der $AREG^{-/-}$ Maus eine signifikante Verbesserung der Nephritis, was AREG als pathogen für die GN identifiziert. Als Mechanismus fanden wir, dass AREG in der Lage ist, durch die Induktion der Expression von Chemokinen sowie CSF-2 aus residenten Nierenzellen die myeloide Zellantwort zu verstärken und eine Polarisierung von M/M in den pro-inflammatorischen M1 Phänotyp zu unterstützen. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Neutralisierung von AREG mittels anti-AREG Antikörpern einen therapeutischen Effekt im NTN Model besitzt. Dass die beobachteten Effekte von AREG auf die M/M Antwort funktionell relevant für den Verlauf der Nephritis sind, bestätigten wir durch Studien der Nephritis in Mäusen mit selektiver Ausschaltung des EGFR Signalweges in myeloiden Zellen. Damit zeigten unsere Resultate, dass AREG ein pro-inflammatorischer Mediator der akuten GN ist, der sowohl die renale Infiltration pathogener myeloider Zellen verstärkt, sowie einen direkten Effekt auf die Polarisierung pro-inflammatorischer Makrophagen sowie deren Zytokinsekretion besitzt. Diese neuen Erkenntnisse identifizieren die AREG/EGFR Achse als ein potenzielles und innovatives Therapietarget für die akute GN.

5. Summary

GN is a leading cause of end-stage renal disease and causes high morbidity and mortality. Current GN therapies are non-specific and often cause severe adverse effects. The importance of specialized Th17 and Th1 cells, as well as various innate immune cells, as in particular macrophages, for the pathogenesis of GN was established by many studies, including our own. However, many aspects regarding their counter-regulation are not yet fully understood and are one of the main reasons for the often ineffective treatment of GN. Therefore nephrological research must focus on developing new and more specific therapies. The two publications contained in this cumulative dissertation deal with the function of two very potent mediators of immune mediated glomerular diseases, which might represent novel and innovative therapeutic targets.

The first paper deals with the complex role of IL-6 and its signalling for T cell regulation during acute GN. For this study, we generated a novel mouse strain with a selective deletion of the membrane bound IL-6 receptor in CD4+ T cells. To eliminate potential confounding effects of this genetic manipulation on non-CD4+ T cells, we performed adoptive transfer experiments into $Rag1^{-/-}$ mice, in which we induced NTN. As expected, Th17 responses were greatly reduced in recipients of IL-6R deficient whole CD4+ T cell populations compared to recipients of wild type CD4+ T cells. Surprisingly, however, this did not result in amelioration of kidney function and damage. In contrast, we observed reduced renal injury after transfer of purified IL-6R deficient T effector cells excluding regulatory T cells. This experiment revealed, that classic IL-6R signalling induces pro-inflammatory Th17 activity on the one hand but also has an important protective function via modulating Treg responses on the other hand. Interestingly, using *in vivo* and *in vitro* studies, we unravelled that classic IL-6R signalling induces RORγt+ biTregs, which carry the trafficking receptor CCR6 and have potent immunoregulatory properties in GN. Indeed, lack of IL-6R classic significantly reduced Treg *in vitro* suppressive capacity. This finding was confirmed *in vivo,* since adoptive transfer of wild type effector T cells together with IL-6R deficient Tregs into $Rag1^{-/-}$ mice resulted in aggravation of acute GN. Our data thus refine the established view, that IL-6 enhances Th17 responses and at the same time suppresses Treg function and development. Rather, our study provides evidence, that T cell-intrinsic IL-6R classic signaling is indeed important for the generation and expansion of Th17 cells but unexpectedly also for the generation of highly suppressive

biTregs. This new finding advocates caution regarding anti-IL-6 and -IL6R directed therapies and suggests a more cell type-specific application for the treatment of GN.

The second study addressed the role of the EGFR ligand AREG. AREG is known for its role in tissue development, homeostasis and tumorigenesis. Recently, however, AREG has also been identified as potent regulator of immunity with broad pro- and anti-inflammatory functions. Since the role of AREG in GN currently remains largely unknown, we studied the effects of AREG deficiency and its signaling via the EGFR using the NTN model of acute GN. Since AREG, just like IL-6, can be secreted by many different cell types, we analyzed this aspect and identified resident renal cells as the functionally most important source of AREG in our model by *in vitro* studies as well as bone marrow transfer experiments. Functionally, AREG knockout mice showed significant amelioration of nephritis, indicating that the net effect of AREG is pathogenic in GN. In terms of mechanisms, we found that AREG enhanced pathogenic myeloid cell responses via inducing chemokine and CSF-2 expression from renal resident cells and supported the polarization of M/M into the pro-inflammatory M1-type. Furthermore, therapeutic neutralization of AREG by anti-AREG antibodies showed improving effects on GN. Finally, using mice with selective deficiency of the EGFR on myeloid cells, we could confirm, that the observed effects on NTN are indeed mediated by AREG signaling in M/M. In summary, our results showed that AREG is a pro-inflammatory mediator of GN, which increases the recruitment and infiltration of pathogenic myeloid cells into the kidney and has a direct effect on M/M polarization and cytokine secretion. The AREG/EGFR axis thus represents a potential new therapeutic target for acute GN.

6. Literaturverzeichnis

1. Arastéh K: *Innere Medizin,* Stuttgard, Thieme, 2018.
2. Vinen CS, Oliveira DB: Acute glomerulonephritis. *Postgrad Med J,* 79**:** 206-213; quiz 212-203, 2003
3. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ: The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol,* 13**:** 738-753, 2013
4. Chadban SJ, Atkins RC: Glomerulonephritis. *Lancet,* 365**:** 1797-1806, 2005
5. Couser WG: Glomerulonephritis. *Lancet,* 353**:** 1509-1515, 1999
6. Kurts C, Heymann F, Lukacs-Kornek V, Boor P, Floege J: Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology. *Semin Immunopathol,* 29**:** 317-335, 2007
7. Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Panzer U: The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int,* 77**:** 1070-1075, 2010
8. Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol,* 7**:** 145-173, 1989
9. Bluestone JA, Mackay CR, O'Shea JJ, Stockinger B: The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol,* 9**:** 811-816, 2009
10. Abbas AK, Murphy KM, Sher A: Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature,* 383**:** 787-793, 1996
11. Zheng W, Flavell RA: The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell,* 89**:** 587-596, 1997
12. Couser WG: Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol,* 23**:** 381-399, 2012
13. Campbell DJ, Koch MA: Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol,* 11**:** 119-130, 2011
14. Steinmetz OM, Turner JE, Panzer U: Staying on top of things right from the start: the obsessive-compulsive disorder of regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol,* 21**:** 6-7, 2010
15. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al.: Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol,* 6**:** 1123-1132, 2005
16. Stockinger B, Veldhoen M: Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol,* 19**:** 281-286, 2007
17. Martinez GJ, Nurieva RI, Yang XO, Dong C: Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Ann N Y Acad Sci,* 1143**:** 188-211, 2008
18. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA: Th17 cells in human disease. *Immunol Rev,* 223**:** 87-113, 2008
19. Zhou L, Littman DR: Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr Opin Immunol,* 21**:** 146-152, 2009
20. Awasthi A, Kuchroo VK: Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol,* 21**:** 489-498, 2009
21. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al.: Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med,* 204**:** 1849-1861, 2007
22. Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, et al.: Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med,* 204**:** 2803-2812, 2007
23. Wang C, Kang SG, Lee J, Sun Z, Kim CH: The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal immunology,* 2**:** 173-183, 2009
24. Bedoya SK, Lam B, Lau K, Larkin J, 3rd: Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clin Dev Immunol,* 2013**:** 986789, 2013

25. Paust HJ, Turner JE, Steinmetz OM, Peters A, Heymann F, Holscher C, et al.: The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol,* 20**:** 969-979, 2009
26. Schmidt T, Paust HJ, Krebs CF, Turner JE, Kaffke A, Bennstein SB, et al.: Function of the Th17/interleukin-17A immune response in murine lupus nephritis. *Arthritis Rheumatol,* 67**:** 475-487, 2015
27. Sheibanie AF, Khayrullina T, Safadi FF, Ganea D: Prostaglandin E2 exacerbates collagen-induced arthritis in mice through the inflammatory interleukin-23/interleukin-17 axis. *Arthritis Rheum,* 56**:** 2608-2619, 2007
28. Steinmetz OM, Turner JE, Paust HJ, Lindner M, Peters A, Heiss K, et al.: CXCR3 mediates renal Th1 and Th17 immune response in murine lupus nephritis. *J Immunol,* 183**:** 4693-4704, 2009
29. Chen SY, Liu MF, Kuo PY, Wang CR: Upregulated expression of STAT3/IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol,* 38**:** 1361-1366, 2019
30. Matsumoto K, Kanmatsuse K: Interleukin-17 stimulates the release of pro-inflammatory cytokines by blood monocytes in patients with IgA nephropathy. *Scand J Urol Nephrol,* 37**:** 164-171, 2003
31. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Wong PT, Lam CW: Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol,* 127**:** 385-393, 2008
32. Krebs CF, Turner JE, Paust HJ, Kapffer S, Koyro T, Krohn S, et al.: Plasticity of Th17 Cells in Autoimmune Kidney Diseases. *J Immunol,* 197**:** 449-457, 2016
33. Steinmetz OM, Summers SA, Gan PY, Semple T, Holdsworth SR, Kitching AR: The Th17-defining transcription factor RORgammat promotes glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol,* 22**:** 472-483, 2011
34. Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Peters A, Riedel JH, Erhardt A, et al.: CCR6 recruits regulatory T cells and Th17 cells to the kidney in glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol,* 21**:** 974-985, 2010
35. Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ: The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol,* 10**:** 595-602, 2009
36. Sakaguchi S, Vignali DA, Rudensky AY, Niec RE, Waldmann H: The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol,* 13**:** 461-467, 2013
37. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, et al.: CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science,* 326**:** 986-991, 2009
38. Kluger MA, Meyer MC, Nosko A, Goerke B, Luig M, Wegscheid C, et al.: RORgammat(+)Foxp3(+) Cells are an Independent Bifunctional Regulatory T Cell Lineage and Mediate Crescentic GN. *J Am Soc Nephrol,* 27**:** 454-465, 2016
39. Nosko A, Kluger MA, Diefenhardt P, Melderis S, Wegscheid C, Tiegs G, et al.: T-Bet Enhances Regulatory T Cell Fitness and Directs Control of Th1 Responses in Crescentic GN. *J Am Soc Nephrol,* 28**:** 185-196, 2017
40. Kluger MA, Melderis S, Nosko A, Goerke B, Luig M, Meyer MC, et al.: Treg17 cells are programmed by Stat3 to suppress Th17 responses in systemic lupus. *Kidney Int,* 89**:** 158-166, 2016
41. Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I, Dousset C, Leveque L, Bioley G, et al.: Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 106**:** 8635-8640, 2009
42. Bovenschen HJ, van de Kerkhof PC, van Erp PE, Woestenenk R, Joosten I, Koenen HJ: Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *J Invest Dermatol,* 131**:** 1853-1860, 2011

43. Hovhannisyan Z, Treatman J, Littman DR, Mayer L: Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology,* 140**:** 957-965, 2011
44. Okui T, Aoki Y, Ito H, Honda T, Yamazaki K: The presence of IL-17+/FOXP3+ double-positive cells in periodontitis. *J Dent Res,* 91**:** 574-579, 2012
45. Kluger MA, Nosko A, Ramcke T, Goerke B, Meyer MC, Wegscheid C, et al.: RORgammat expression in Tregs promotes systemic lupus erythematosus via IL-17 secretion, alteration of Treg phenotype and suppression of Th2 responses. *Clin Exp Immunol,* 188**:** 63-78, 2017
46. Ohnmacht C, Park JH, Cording S, Wing JB, Atarashi K, Obata Y, et al.: MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through RORgammat(+) T cells. *Science,* 349**:** 989-993, 2015
47. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H: Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res,* 2**:** 1, 2014
48. Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ: CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med,* 192**:** 899-905, 2000
49. Zigmond E, Varol C, Farache J, Elmaliah E, Satpathy AT, Friedlander G, et al.: Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity,* 37**:** 1076-1090, 2012
50. Gordon S, Taylor PR: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol,* 5**:** 953-964, 2005
51. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al.: Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol,* 233**:** 6425-6440, 2018
52. Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM: Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology,* 154**:** 186-195, 2018
53. Nelson PJ, Rees AJ, Griffin MD, Hughes J, Kurts C, Duffield J: The renal mononuclear phagocytic system. *J Am Soc Nephrol,* 23**:** 194-203, 2012
54. Wang N, Liang H, Zen K: Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol,* 5**:** 614, 2014
55. Holdsworth SR, Tipping PG: Leukocytes in glomerular injury. *Semin Immunopathol,* 29**:** 355-374, 2007
56. Kluger MA, Zahner G, Paust HJ, Schaper M, Magnus T, Panzer U, et al.: Leukocyte-derived MMP9 is crucial for the recruitment of proinflammatory macrophages in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int,* 83**:** 865-877, 2013
57. Luig M, Kluger MA, Goerke B, Meyer M, Nosko A, Yan I, et al.: Inflammation-Induced IL-6 Functions as a Natural Brake on Macrophages and Limits GN. *J Am Soc Nephrol,* 26**:** 1597-1607, 2015
58. Lv LL, Feng Y, Wen Y, Wu WJ, Ni HF, Li ZL, et al.: Exosomal CCL2 from Tubular Epithelial Cells Is Critical for Albumin-Induced Tubulointerstitial Inflammation. *J Am Soc Nephrol,* 29**:** 919-935, 2018
59. Sun PP, Zhou XJ, Su JQ, Wang C, Yu XJ, Su T, et al.: Urine macrophages reflect kidney macrophage content during acute tubular interstitial and glomerular injury. *Clin Immunol,* 205**:** 65-74, 2019
60. Yang N, Isbel NM, Nikolic-Paterson DJ, Li Y, Ye R, Atkins RC, et al.: Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis. *Kidney Int,* 54**:** 143-151, 1998
61. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T: IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol,* 6**:** a016295, 2014
62. Hunter CA, Jones SA: IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol,* 16**:** 448-457, 2015
63. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al.: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature,* 441**:** 235-238, 2006

64. Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S: Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat Rev Drug Discov,* 17**:** 395-412, 2018
65. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al.: TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol,* 8**:** 1390-1397, 2007
66. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, et al.: Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol,* 8**:** 1363-1371, 2007
67. Jin JO, Han X, Yu Q: Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation. *J Autoimmun,* 40**:** 28-44, 2013
68. Ye M, Joosse ME, Liu L, Sun Y, Dong Y, Cai C, et al.: Deletion of IL-6 Exacerbates Colitis and Induces Systemic Inflammation in IL-10-Deficient Mice. *J Crohns Colitis,* 14**:** 831-840, 2020
69. Fujimoto M, Nakano M, Terabe F, Kawahata H, Ohkawara T, Han Y, et al.: The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol,* 186**:** 32-40, 2011
70. Nish SA, Schenten D, Wunderlich FT, Pope SD, Gao Y, Hoshi N, et al.: T cell-intrinsic role of IL-6 signaling in primary and memory responses. *Elife,* 3**:** e01949, 2014
71. Krebs CF, Steinmetz OM: CD4(+) T Cell Fate in Glomerulonephritis: A Tale of Th1, Th17, and Novel Treg Subtypes. *Mediators Inflamm,* 2016**:** 5393894, 2016
72. Heink S, Yogev N, Garbers C, Herwerth M, Aly L, Gasperi C, et al.: Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol,* 18**:** 74-85, 2017
73. Narazaki M, Tanaka T, Kishimoto T: The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol,* 13**:** 535-551, 2017
74. Tsantikos E, Oracki SA, Quilici C, Anderson GP, Tarlinton DM, Hibbs ML: Autoimmune disease in Lyn-deficient mice is dependent on an inflammatory environment established by IL-6. *J Immunol,* 184**:** 1348-1360, 2010
75. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T: Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol,* 52**:** 199-219, 2012
76. Cash H, Relle M, Menke J, Brochhausen C, Jones SA, Topley N, et al.: Interleukin 6 (IL-6) deficiency delays lupus nephritis in MRL-Faslpr mice: the IL-6 pathway as a new therapeutic target in treatment of autoimmune kidney disease in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol,* 37**:** 60-70, 2010
77. Tsantikos E, Maxwell MJ, Putoczki T, Ernst M, Rose-John S, Tarlinton DM, et al.: Interleukin-6 trans-signaling exacerbates inflammation and renal pathology in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum,* 65**:** 2691-2702, 2013
78. Karkar AM, Smith J, Tam FW, Pusey CD, Rees AJ: Abrogation of glomerular injury in nephrotoxic nephritis by continuous infusion of interleukin-6. *Kidney Int,* 52**:** 1313-1320, 1997
79. Matsuo Y, Mizoguchi F, Kohsaka H, Ito E, Eishi Y, Miyasaka N: Tocilizumab-induced immune complex glomerulonephritis in a patient with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford),* 52**:** 1341-1343, 2013
80. Nechemia-Arbely Y, Barkan D, Pizov G, Shriki A, Rose-John S, Galun E, et al.: IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol,* 19**:** 1106-1115, 2008
81. Braun GS, Nagayama Y, Maruta Y, Heymann F, van Roeyen CR, Klinkhammer BM, et al.: IL-6 Trans-Signaling Drives Murine Crescentic GN. *J Am Soc Nephrol,* 27**:** 132-142, 2016
82. Holdsworth SR, Gan PY, Kitching AR: Biologics for the treatment of autoimmune renal diseases. *Nat Rev Nephrol,* 12**:** 217-231, 2016
83. Illei GG, Shirota Y, Yarboro CH, Daruwalla J, Tackey E, Takada K, et al.: Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum,* 62**:** 542-552, 2010

84. Sakai R, Kondo T, Kurasawa T, Nishi E, Okuyama A, Chino K, et al.: Current clinical evidence of tocilizumab for the treatment of ANCA-associated vasculitis: a prospective case series for microscopic polyangiitis in a combination with corticosteroids and literature review. *Clin Rheumatol,* 36**:** 2383-2392, 2017
85. Krall JA, Beyer EM, MacBeath G: High- and low-affinity epidermal growth factor receptor-ligand interactions activate distinct signaling pathways. *PLoS One,* 6**:** e15945, 2011
86. Zaiss DM, Minutti CM, Knipper JA: Immune- and non-immune-mediated roles of regulatory T-cells during wound healing. *Immunology,* 157**:** 190-197, 2019
87. Kefaloyianni E, Muthu ML, Kaeppler J, Sun X, Sabbisetti V, Chalaris A, et al.: ADAM17 substrate release in proximal tubule drives kidney fibrosis. *JCI Insight,* 1, 2016
88. Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez R, Morgado-Pascual JL, Valentijn F, Valdivielso JM, Goldschmeding R, et al.: Role of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Its Ligands in Kidney Inflammation and Damage. *Mediators Inflamm,* 2018**:** 8739473, 2018
89. Swanson CD, Akama-Garren EH, Stein EA, Petralia JD, Ruiz PJ, Edalati A, et al.: Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase ameliorates collagen-induced arthritis. *J Immunol,* 188**:** 3513-3521, 2012
90. Morimoto Y, Hirahara K, Kiuchi M, Wada T, Ichikawa T, Kanno T, et al.: Amphiregulin-Producing Pathogenic Memory T Helper 2 Cells Instruct Eosinophils to Secrete Osteopontin and Facilitate Airway Fibrosis. *Immunity,* 49**:** 134-150 e136, 2018
91. Zhuang S, Liu N: EGFR signaling in renal fibrosis. *Kidney Int Suppl (2011),* 4**:** 70-74, 2014
92. Bollee G, Flamant M, Schordan S, Fligny C, Rumpel E, Milon M, et al.: Epidermal growth factor receptor promotes glomerular injury and renal failure in rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Nat Med,* 17**:** 1242-1250, 2011
93. Chen J, Chen JK, Nagai K, Plieth D, Tan M, Lee TC, et al.: EGFR signaling promotes TGFbeta-dependent renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol,* 23**:** 215-224, 2012
94. Francois H, Placier S, Flamant M, Tharaux PL, Chansel D, Dussaule JC, et al.: Prevention of renal vascular and glomerular fibrosis by epidermal growth factor receptor inhibition. *FASEB J,* 18**:** 926-928, 2004
95. Terzi F, Burtin M, Hekmati M, Federici P, Grimber G, Briand P, et al.: Targeted expression of a dominant-negative EGF-R in the kidney reduces tubulo-interstitial lesions after renal injury. *J Clin Invest,* 106**:** 225-234, 2000
96. Lee HW, Khan SQ, Khaliqdina S, Altintas MM, Grahammer F, Zhao JL, et al.: Absence of miR-146a in Podocytes Increases Risk of Diabetic Glomerulopathy via Up-regulation of ErbB4 and Notch-1. *J Biol Chem,* 292**:** 732-747, 2017
97. Qing X, Chinenov Y, Redecha P, Madaio M, Roelofs JJ, Farber G, et al.: iRhom2 promotes lupus nephritis through TNF-alpha and EGFR signaling. *J Clin Invest,* 128**:** 1397-1412, 2018
98. Cook PW, Piepkorn M, Clegg CH, Plowman GD, DeMay JM, Brown JR, et al.: Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. *J Clin Invest,* 100**:** 2286-2294, 1997
99. Yoshida A, Kanno H, Watabe D, Akasaka T, Sawai T: The role of heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in the epidermal proliferation of psoriasis in cooperation with TNFalpha. *Arch Dermatol Res,* 300**:** 37-45, 2008
100. Lisi S, Sisto M, Lofrumento DD, Cucci L, Frassanito MA, Mitolo V, et al.: Pro-inflammatory role of Anti-Ro/SSA autoantibodies through the activation of Furin-TACE-amphiregulin axis. *J Autoimmun,* 35**:** 160-170, 2010
101. Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Masuda R, Tanaka K, et al.: Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients. *J Inflamm (Lond),* 5**:** 5, 2008
102. Perugorria MJ, Latasa MU, Nicou A, Cartagena-Lirola H, Castillo J, Goni S, et al.: The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis. *Hepatology,* 48**:** 1251-1261, 2008

103. Kefaloyianni E, Keerthi Raja MR, Schumacher J, Muthu ML, Krishnadoss V, Waikar SS, et al.: Proximal Tubule–Derived Amphiregulin Amplifies and Integrates Profibrotic EGF Receptor Signals in Kidney Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology***:** ASN.2019030321, 2019
104. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, et al.: A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell,* 155**:** 1282-1295, 2013
105. Nosbaum A, Prevel N, Truong HA, Mehta P, Ettinger M, Scharschmidt TC, et al.: Cutting Edge: Regulatory T Cells Facilitate Cutaneous Wound Healing. *J Immunol,* 196**:** 2010-2014, 2016
106. Monticelli LA, Osborne LC, Noti M, Tran SV, Zaiss DM, Artis D: IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 112**:** 10762-10767, 2015
107. Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CG, Doering TA, et al.: Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol,* 12**:** 1045-1054, 2011
108. Cao Q, Wang Y, Niu Z, Wang C, Wang R, Zhang Z, et al.: Potentiating Tissue-Resident Type 2 Innate Lymphoid Cells by IL-33 to Prevent Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol,* 29**:** 961-976, 2018
109. Fujiu K, Shibata M, Nakayama Y, Ogata F, Matsumoto S, Noshita K, et al.: A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation. *Nat Med,* 23**:** 611-622, 2017
110. Ko JH, Kim HJ, Jeong HJ, Lee HJ, Oh JY: Mesenchymal Stem and Stromal Cells Harness Macrophage-Derived Amphiregulin to Maintain Tissue Homeostasis. *Cell Rep,* 30**:** 3806-3820 e3806, 2020
111. Minutti CM, Modak RV, Macdonald F, Li F, Smyth DJ, Dorward DA, et al.: A Macrophage-Pericyte Axis Directs Tissue Restoration via Amphiregulin-Induced Transforming Growth Factor Beta Activation. *Immunity,* 50**:** 645-654 e646, 2019
112. Minutti CM, Drube S, Blair N, Schwartz C, McCrae JC, McKenzie AN, et al.: Epidermal Growth Factor Receptor Expression Licenses Type-2 Helper T Cells to Function in a T Cell Receptor-Independent Fashion. *Immunity,* 47**:** 710-722 e716, 2017
113. Zaiss DM, van Loosdregt J, Gorlani A, Bekker CP, Grone A, Sibilia M, et al.: Amphiregulin enhances regulatory T cell-suppressive function via the epidermal growth factor receptor. *Immunity,* 38**:** 275-284, 2013
114. Qi Y, Operario DJ, Oberholzer CM, Kobie JJ, Looney RJ, Georas SN, et al.: Human basophils express amphiregulin in response to T cell-derived IL-3. *J Allergy Clin Immunol,* 126**:** 1260-1266 e1264, 2010
115. Jiang R, Tang J, Chen Y, Deng L, Ji J, Xie Y, et al.: The long noncoding RNA lnc-EGFR stimulates T-regulatory cells differentiation thus promoting hepatocellular carcinoma immune evasion. *Nat Commun,* 8**:** 15129, 2017
116. Okoye IS, Coomes SM, Pelly VS, Czieso S, Papayannopoulos V, Tolmachova T, et al.: MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity,* 41**:** 89-103, 2014
117. Ooi JD, Petersen J, Tan YH, Huynh M, Willett ZJ, Ramarathinam SH, et al.: Dominant protection from HLA-linked autoimmunity by antigen-specific regulatory T cells. *Nature,* 545**:** 243-247, 2017
118. Ostmann A, Paust HJ, Panzer U, Wegscheid C, Kapffer S, Huber S, et al.: Regulatory T cell-derived IL-10 ameliorates crescentic GN. *J Am Soc Nephrol,* 24**:** 930-942, 2013
119. Kim BS, Lu H, Ichiyama K, Chen X, Zhang YB, Mistry NA, et al.: Generation of RORgammat(+) Antigen-Specific T Regulatory 17 Cells from Foxp3(+) Precursors in Autoimmunity. *Cell Rep,* 21**:** 195-207, 2017
120. Jevnikar Z, Ostling J, Ax E, Calven J, Thorn K, Israelsson E, et al.: Epithelial IL-6 trans-signaling defines a new asthma phenotype with increased airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol,* 143**:** 577-590, 2019

121. Nowell MA, Richards PJ, Fielding CA, Ognjanovic S, Topley N, Williams AS, et al.: Regulation of pre-B cell colony-enhancing factor by STAT-3-dependent interleukin-6 trans-signaling: implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum,* 54**:** 2084-2095, 2006
122. Andreas N, Weber F, Meininger I, Templin N, Gaestel M, Kamradt T, et al.: IL-33-activated murine mast cells control the dichotomy between RORgammat(+) and Helios(+) Tregs via the MK2/3-mediated IL-6 production in vitro. *Eur J Immunol,* 49**:** 2159-2171, 2019
123. Chung E, Cook PW, Parkos CA, Park YK, Pittelkow MR, Coffey RJ: Amphiregulin causes functional downregulation of adherens junctions in psoriasis. *J Invest Dermatol,* 124**:** 1134-1140, 2005
124. Krishnan S, Prise IE, Wemyss K, Schenck LP, Bridgeman HM, McClure FA, et al.: Amphiregulin-producing gammadelta T cells are vital for safeguarding oral barrier immune homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 115**:** 10738-10743, 2018
125. Dai K, Huang L, Chen J, Yang L, Gong Z: Amphiregulin promotes the immunosuppressive activity of intrahepatic CD4(+) regulatory T cells to impair CD8(+) T-cell immunity against hepatitis B virus infection. *Immunology,* 144**:** 506-517, 2015
126. Gilmore JL, Scott JA, Bouizar Z, Robling A, Pitfield SE, Riese DJ, 2nd, et al.: Amphiregulin-EGFR signaling regulates PTHrP gene expression in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat,* 110**:** 493-505, 2008
127. Lu N, Wang L, Cao H, Liu L, Van Kaer L, Washington MK, et al.: Activation of the epidermal growth factor receptor in macrophages regulates cytokine production and experimental colitis. *J Immunol,* 192**:** 1013-1023, 2014
128. Hardbower DM, Singh K, Asim M, Verriere TG, Olivares-Villagomez D, Barry DP, et al.: EGFR regulates macrophage activation and function in bacterial infection. *J Clin Invest,* 126**:** 3296-3312, 2016
129. Ishii T, Onda H, Tanigawa A, Ohshima S, Fujiwara H, Mima T, et al.: Isolation and expression profiling of genes upregulated in the peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *DNA Res,* 12**:** 429-439, 2005

7. Angaben zum individuellen Anteil

Alle im Rahmen dieser Dissertationsschrift beschriebenen Arbeiten sind das Resultat von Kollaborationen mit anderen Wissenschaftlern, deren Namen der jeweiligen Autorenliste zu entnehmen sind. Die Gewichtung der individuellen Leistungen wurde mit allen jeweiligen Koautoren abgesprochen und ist einvernehmlich geschehen. Zu den vorgestellten Arbeiten habe ich einen maßgeblichen Anteil beigetragen, den ich im Folgenden kurz erläutern möchte.

A novel role for IL-6 receptor classic signaling: induction of RORγt+Foxp3+ Tregs with enhanced suppressive capacity

Für diese Arbeit wurden die Experimente hauptsächlich von Prof. Dr. Oliver M. Steinmetz und mir geplant, im frühen Studienverlauf war Dr. Anna Nosko an der Durchführung und Planung einzelner Experimente beteiligt. Den konkreteren Ablauf der Experimente habe ich selbstständig geplant und durchgeführt. Bei den aufwendigeren Experimenten wurde ich von Dr. Georg Herrnstadt oder cand. med. Matthias Warkotsch unterstützt. Die erhaltenen Daten habe ich selbstständig ausgewertet und anschließend gemeinsam mit Prof. Dr. Oliver M. Steinmetz kritisch bewertet und interpretiert. Das Manuskript wurde gemeinsam mit Prof. Dr. Oliver M. Steinmetz verfasst.

Amphiregulin Aggravates Glomerulonephritis via Recruitment and Activation of Myeloid Cells

Die Experimente zu dieser Publikation wurden von Dr. Simon Melderis und mir gemeinsam mit Prof. Dr. Oliver M. Steinmetz geplant. Den konkreteren Ablauf der Experimente haben Dr. Simon Melderis und ich gemeinsam geplant und uns die Durchführung aufgeteilt. Bei den aufwendigeren Experimenten wurden wir von cand. med. Matthias Warkotsch unterstützt. Die erhaltenen Daten habe ich selbstständig ausgewertet und anschließend gemeinsam mit Dr. Simon Melderis und Prof. Dr. Oliver M. Steinmetz kritisch bewertet und interpretiert. Das Manuskript wurde gemeinsam mit Dr. Simon Melderis verfasst, dabei wurden wir von Prof. Dr. Oliver M. Steinmetz unterstützt.

_____

Prof. Dr. Oliver M. Steinmetz

8. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Tobias B. Huber für die Möglichkeit bedanken, meine Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Prof. Dr. Ulf Panzer danke ich neben seinen großen Verdiensten um den Sonderforschungsbereich, die das Umfeld für unsere wissenschaftliche Arbeit erst bereitstellte, insbesondere für die nette Zusammenarbeit und die tolle Unterstützung seiner gesamten Arbeitsgruppe.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Oliver Steinmetz, zunächst für die Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Seine intensive Betreuung und vorausschauende Projektplanung, sein wissenschaftliches Gespür und seine guten Ideen waren mir eine große Hilfe. Ohne seine Förderung und sein persönliches Engagement wären diese Arbeiten nicht entstanden.

Ich danke meinen Kolleginnen und Kollegen aus der gesamten AG Steinmetz für die Unterstützung, den direkten konstruktiv-kritischen Gedankenaustausch, die gute Zusammenarbeit und auch für das wunderbare Arbeitsklima. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Simon Melderis sowie unser BTA Inken Holtze, die mich optimal im Labor eingearbeitet haben. Die Zusammenarbeit mit ihnen war immer äußert effektiv und ihr Humor machten diese auch sehr unterhaltsam und lange Experimente meist kurzweilig. Außerdem besonders hervorzuheben sind Dr. Georg Herrnstadt, Matthias Warkotsch, Christoph Niehus und Priv.-Doz. Dr. Malte Kluger.

Meinen Freunden danke ich für ihre mentale Unterstützung und den Ausgleich und die Ablenkung in der Freizeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken für ihre liebevolle und bedingungslose Unterstützung. Ohne sie wäre ich nicht so weit gekommen.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, Januar 2021

_____

Julia Hagenstein

10. Anhang

A Novel Role for IL-6 Receptor Classic Signaling: Induction of RORγt$^+$Foxp3$^+$ Tregs with Enhanced Suppressive Capacity

Julia Hagenstein,[1] Simon Melderis,[1] Anna Nosko,[1] Matthias T. Warkotsch,[1] Johannes V. Richter,[1] Torben Ramcke,[1] Georg R. Herrnstadt,[1] Jürgen Scheller,[2] Isabell Yan,[3] Hans-Willi Mittrücker,[3] Malte A. Kluger,[1] and Oliver M. Steinmetz[1]

[1]III. Department of Medicine and [3]Institute for Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; and [2]Medical Faculty, Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, Heinrich-Heine University, Dusseldorf, Germany

ABSTRACT

Background New therapies blocking the IL-6 receptor (IL-6R) have recently become available and are successfully being used to treat inflammatory diseases like arthritis. Whether IL-6 blockers may help patients with kidney inflammation currently remains unknown.

Methods To learn more about the complex role of CD4$^+$ T cell-intrinsic IL-6R signaling, we induced nephrotoxic nephritis, a mouse model for crescentic GN, in mice lacking T cell–specific IL-6Ra. We used adoptive transfer experiments and studies in reporter mice to analyze immune responses and Treg subpopulations.

Results Lack of IL-6Ra signaling in mouse CD4$^+$ T cells impaired the generation of proinflammatory Th17 cells, but surprisingly did not ameliorate the course of GN. In contrast, renal damage was significantly reduced by restricting IL-6Ra deficiency to T effector cells and excluding Tregs. Detailed studies of Tregs revealed unaltered IL-10 production despite IL-6Ra deficiency. However, *in vivo* and *in vitro*, IL-6Ra classic signaling induced RORγt$^+$Foxp3$^+$ double-positive Tregs (biTregs), which carry the trafficking receptor CCR6 and have potent immunoregulatory properties. Indeed, lack of IL-6Ra significantly reduced Treg *in vitro* suppressive capacity. Finally, adoptive transfer of T cells containing IL-6Ra$^{-/-}$ Tregs resulted in severe aggravation of GN in mice.

Conclusions Our data refine the old paradigm, that IL-6 enhances Th17 responses and suppresses Tregs. We here provide evidence that T cell–intrinsic IL-6Ra classic signaling indeed induces the generation of Th17 cells but at the same time highly immunosuppressive RORγt$^+$ biTregs. These results advocate caution and indicate that IL-6–directed therapies for GN need to be cell-type specific.

JASN 30: 1439–1453, 2019. doi: https://doi.org/10.1681/ASN.2019020118

CD4$^+$ T cells are central mediators of many inflammatory diseases, including GN.[1] In particular, the T helper 17 cell (Th17) lineage is highly pathogenic and contributes significantly to renal tissue injury.[2–4] An opposing role was ascribed to regulatory T cells (Tregs), which are crucial counter-regulators of overshooting immune reactions that protect us from lethal autoimmunity.[5–7] Multiple studies, including our own, showed their key anti-inflammatory role in GN.[8–16] Factors influencing Th17s and Tregs are thus rewarding subjects to study, because they might represent potent therapeutic targets.[17–19] The pleiotropic cytokine IL-6 has previously been identified as one such key molecule, generally thought to be responsible for regulating the Th17/Treg balance.[20]

Received February 7, 2019. Accepted May 2, 2019.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Oliver M. Steinmetz, III. Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany. Email: o.steinmetz@uke.de

Copyright © 2019 by the American Society of Nephrology

IL-6 was found to potently support development of highly pathogenic Th17s, while also suppressing Treg generation.[21–23] However, this seemingly clear picture was somewhat challenged by later reports, which paradoxically described Treg-enhancing effects of IL-6 in mice and humans.[24–27] Furthermore, research has shown that IL-6 is required for the induction of the highly anti-inflammatory cytokine IL-10 by T regulatory type 1 cells and other T cell populations.[28–30] Similarly, genetic overexpression of IL-6 did not impair the function of Tregs and surprisingly even increased their numbers.[31] A recent landmark study by Medzhitov's group took a closer look and helped to explain these puzzling observations.[32] The authors found that IL-6 does not generally inhibit development or function of Tregs, as previously thought. Rather, as was also shown in human cells by another independent group, IL-6 enhances T effector cell (Teff) activation and renders them resistant to Treg-mediated suppression.[32,33] In other words, IL-6 seems to favor Teff over Treg responses, but does not *per se* inhibit Treg development or activation. Previous reports speculated that IL-6 exposure leads to instability of the Treg phenotype and initiates transdifferentiation into Th17s. These conclusions were mainly based on the observation that, during *in vitro* incubation with IL-6, Tregs activate the Th17 master transcription factor, RORγt, and some start to produce IL-17.[21,34–37] However, contrary to the previous belief, it has recently become clear that Tregs coexpressing Foxp3 together with RORγt do not display an instable phenotype or represent Th17/Treg intermediates. Rather, these RORγt$^+$Foxp3$^+$ double-positive Tregs (biTregs) constitute an independent and highly active effector Treg lineage.[38–43] It is notable, however, that the *in vivo* relevance of Treg modulation by IL-6 remains unclear. This could be because IL-6 signaling is quite complex and includes at least three different modes.[44,45] Initially, the so-called classic signaling was described. In this process, IL-6 binds to its receptor, which is a heterodimer consisting of the promiscuous membrane glycoprotein gp130 and the specific IL-6 receptor α (IL-6Ra) subunit. In addition, a broader mode of signaling was identified, termed alternative or trans-signaling. A soluble form of the IL-6Ra subunit can capture circulating IL-6 and then hetero-dimerize with gp130, which is expressed on almost every cell of the body. Recently, a third mode of IL-6 signaling, named cluster signaling, was described in which dendritic cells trans-present an IL-6/IL-6Ra complex to gp130 expressed on CD4$^+$ T cells.[46] The relative contribution of each of these signaling modalities to the different IL-6–mediated functions remains largely unclear. However, a detailed understanding of IL-6 biology is of great clinical significance given that IL-6Ra antibody blockade has become an established treatment for a number of immune-mediated diseases,[47] and further agents are currently under development.[48] Regarding renal inflammatory disease, IL-6–directed interventions in experimental models of lupus were particularly promising.[49] For the nephrotoxic nephritis (NTN) model of acute GN, however, differing outcomes were reported, depending on the exact modalities of interference with the IL-6 pathway.[50–53] Finally, studies of IL-6R blockade in human GN are scarce and remain largely inconclusive.[54–57] To facilitate further clinical studies targeting GN, we need to elucidate the differential IL-6 functions and the relative contribution of each of the three known signaling pathways. We thus aimed to clarify the effects of IL-6R classic signaling for modulation of T cell responses, with special focus on Th17 and Treg development and the resulting effect on the course of crescentic GN.

Significance Statement

The pleiotropic cytokine IL-6 has commonly been regarded as the master switch of inflammation because it augments proinflammatory T helper 17 cell (Th17) responses and suppresses anti-inflammatory regulatory T cells (Tregs). This study challenges this paradigm. Studies in mice show that IL-6 receptor classic signaling effectively induces Th17 responses but also, in contrast to the previous concept, increases Treg activation. Engagement of the IL-6 receptor results in the generation of a unique RORγt-expressing Treg subtype with enhanced suppressive capacity. Expansion of this highly activated, IL-6–dependent effector Treg population is associated with a significantly improved outcome of experimental acute GN. These results shed new light on IL-6 biology and help to establish IL-6 directed therapies for GN.

METHODS

Animals

LoxP site–flanked IL-6Ra$^{fl/fl}$ mice (B6;SJL-Il6ra$^{tm1.1Drew/J}$) were initially obtained from J. Scheller, Duesseldorf. T cell–specific deletion of the IL-6Ra chain was achieved by cross-breeding with mice expressing CD4-driven Cre recombinase (B6.Cg-Tg[Cd4-cre]1Cwi/BfluJ), commercially available from The Jackson Laboratory. To analyze IL-10 production by regulatory T cell subtypes, these mice were further intercrossed with Foxp3 red fluorescent protein (RFP) (FIR)[58] and IL-10 enhanced green fluorescent protein (eGFP) (Tiger)[59] reporter mice. Both strains of mice were a kind gift donated by Richard A. Flavell, Yale. IL-6$^{-/-}$ mice (B6.129S2-*Il6*^{tm1Kopf}/J) were kindly provided by Gisa Tiegs, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg. Rag1$^{-/-}$ and CD45.1 wild-type mice were initially derived from The Jackson Laboratory. All mice are on a C57BL/6 background and were bred in our facility under specific pathogen-free conditions.

Animal Experiments and Functional Studies

For immunization studies, 8- to 10-week-old IL-6$^{-/-}$ or CD4^{Cre}xIL-6Ra$^{fl/fl}$×FIR×Tiger mice and their respective controls were intraperitoneally immunized with 0.5 mg sheep IgG in CFA. NTN was induced in the indicated strains of mice by single intraperitoneal injection of nephrotoxic sheep serum. For leukocyte transfer studies, whole CD4$^+$ T cells, Treg-depleted CD4$^+$Foxp3 (RFP)$^-$ Teffs, and Foxp3 (RFP)$^+$ Tregs were FACS sorted from naive spleen cells as explained below. We intravenously injected 3×10^6 whole CD4$^+$ T cells, 2×10^6 Treg-depleted Teffs of either genotype, or 2×10^6 Treg-depleted wild-type Teffs, mixed with 4×10^5 wild-type or IL-6Ra–deficient Tregs into Rag1$^{-/-}$ mice 1 day before

induction of NTN. Renal and splenic leukocytes were isolated at the indicated time points, as described below, and analyzed by FACS. Urine samples were collected after housing the mice in metabolic cages. Albuminuria was determined by standard ELISA (Bethyl Laboratories). BUN and urinary creatinine were quantified using standard laboratory methods. Animal experiments were performed according to national and institutional animal care and ethical guidelines and were approved by local committees (approval codes 73/14, 07/15, 20/16, 65/18).

Morphologic Studies

Crescent formation and glomerular necrosis were determined in a minimum of 50 glomeruli per mouse in 2-μm-thick PAS-stained kidney sections in a blinded manner. Semiquantitative analysis of tubulointerstitial damage using a score from 0 to 4 was performed in ten randomly selected cortical areas ($\times$200) as published previously.[3] Paraffin-embedded sections were stained with antibodies directed against CD3 (A0452; Dako, Hamburg, Germany), F4/80 (BM8; BMA Biomedicals, Hiddenhausen, Germany), MAC2 (M3/38; Cedarlane-Laboratories, Burlington, Canada), Foxp3 (FJK-16s; eBioscience, San Diego, CA), or GR-1 (NIMP-R14; Hycult Biotech, Uden, The Netherlands) and developed with a polymer-based secondary antibody alkaline phosphatase kit (POLAP; Zytomed, Berlin, Germany). In a blinded fashion, we counted 50 glomerular cross-sections and 30 tubulointerstitial high power fields (magnification $\times$400) per kidney section.

Isolation of Leukocytes from Various Tissues

Spleens were harvested in HBSS and passed through 70-μm nylon meshes. After lysis of erythrocytes with ammonium chloride, cells were washed and passed through 40-μm meshes. Kidneys were minced and incubated in digestion medium (RPMI 1640 medium containing 10% FCS, 1% HEPES, 1% penicillin/streptomycin, 8 μg/ml Collagenase D, and 0.4 μg/ml DNase) at 37°C for 45 minutes. Tissues were then dissociated using the gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) to get a single cell suspension and then centrifuged at 300 *g* at 4°C for 8 minutes. To further purify the cells, Percoll gradient (37% Percoll; GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) centrifugation was performed at 500 *g* at room temperature for 20 minutes. Peripheral blood was drawn into EDTA-coated tubes and red blood cell lysis was performed. After all isolation procedures, cells were washed, counted, and prepared for FACS staining.

Flow Cytometry

Cells were surface stained for 30 minutes at 4°C with fluorochrome-labeled antibodies against CD45, CD45.1, CD45.2, CD4, CD44, CD11c, and NK1.1 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ); CD3, CD8, CD19, CD25, CD62L, CCR6, CXCR3, ICOS, CD103, CTLA-4, IL-6Ra, Ly6C, and CD11b (BioLegend, San Diego, CA); MHCII (eBioscience); and Gr1 (Hycult Biotech, The Netherlands). For intracellular and intranuclear staining, samples were processed using a commercial intranuclear staining kit (Foxp3 staining kit; eBioscience). We used fluorochrome-labeled antibodies against IL-17A, IL-17F, IFNγ, T-Bet, Gata3 (BioLegend), Foxp3, KI67, and RORγt (BD Biosciences). For intracellular cytokine staining, cells were activated with PMA (50 ng/ml; Sigma-Aldrich), Ionomycin (1 μg/ml; Calbiochem-Merck), and Brefeldin A (10 μg/ml; Sigma-Aldrich) for 2.5 hours. LIVE/DEAD staining (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR) was used to exclude dead cells. FACS sorting was performed from single cell suspensions enriched for $CD4^+$ T cells by MACS sorting (T Cell Isolation Kit II; Miltenyi Biotech) from spleens of the indicated strains by the institutional FACS Sorting Core facility.

T Cell *In Vitro* Studies and Treg Suppression Assay

Tregs and Teffs were isolated by FACS sorting, as described above, using surface markers and their autofluorescence. For IL-6 *in vitro* treatment, 4×10^5 sorted Tregs were cultured for 3.5 days in anti-CD3 mAb (5 μg/ml; BD Biosciences) on precoated 96-well plates, with the addition of 2 μg/ml anti-CD28, 10 ng/ml rIL-2, and with or without the addition of 20 ng/ml rIL-6 (catalogue no. 216–16; Peprotech). For *in vitro* suppression assays, 1×10^5 Teffs from $CD45.1^+$ congenic wild-type mice were cultured for 72 hours in anti-CD3 mAb (5 μg/ml) on precoated 96-well plates either alone or in coculture with Tregs from $CD4^{Cre}$xIL-$6Ra^{fl/fl}\times$FIR$\times$Tiger or $CD4^{Cre}\times$FIR$\times$Tiger mice at the indicated ratios. Suppression of Teff proliferation was quantified by FACS analysis of KI67 expression by $CD45.1^+$ Teff. ELISAs were performed on the coculture supernatants to determine cytokine production.

Statistical Analyzes

Results are expressed as mean$\pm$SEM. Groups were compared with *t* tests and a *P* value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Generation and Characterization of T Cell–Specific IL-6Ra–Deficient Mice

In the analysis, naive splenic leukocytes demonstrated high IL-6Ra expression on $CD4^+$ T cells (Supplemental Figure 1, A and B). We thus intercrossed mice expressing Cre recombinase under control of the CD4 promotor ($CD4^{Cre}$) with IL-6Ra floxed mice ($IL\text{-}6Ra^{fl/fl}$) to generate T cell–specific IL-6Ra deficiency. Because IL-6 has been reported to affect Treg generation as well as IL-10 secretion by T cells, we also introduced Foxp3 (FIR) and IL-10 (Tiger) fluorescence reporter constructs. Next, we analyzed effectiveness and specificity of IL-6Ra deletion on splenic leukocytes, which confirmed almost complete excision on $CD4^+$ T cells. However, because CD4 is expressed in the thymus, already at the T cell double-positive stage, $CD8^+$ T cells also showed the expected high Cre activation (Supplemental Figure 2, A and B). In addition, IL-6Ra expression on $CD4^+$ and $CD8^+$ dendritic cell subpopulations was also moderately reduced (Supplemental Figure 2, C–E). In contrast, expression levels on B cells, inflammatory

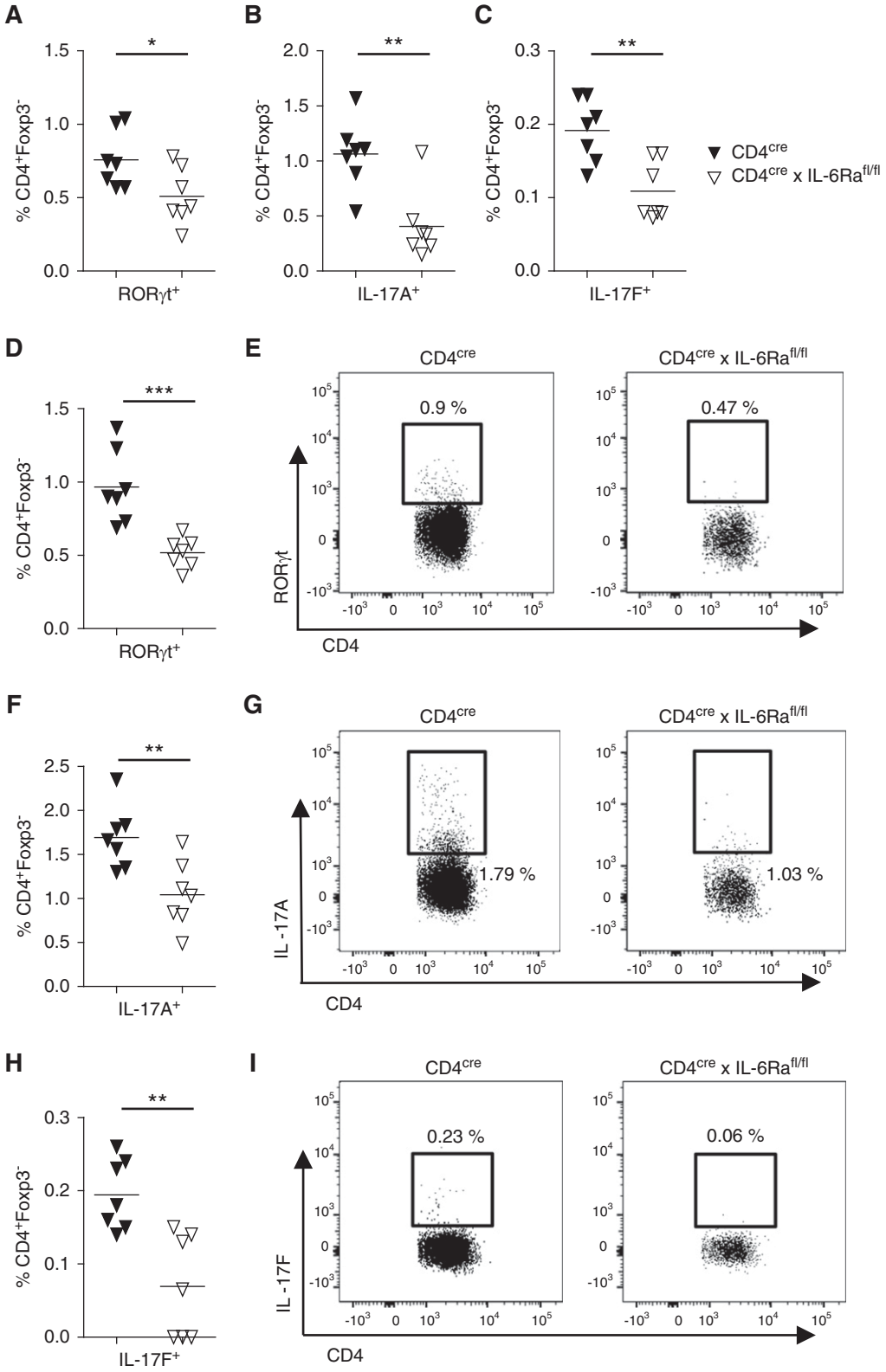


Figure 1. IL-6Ra classic signaling in T cells directs Th17 responses. FACS analysis of blood leukocytes showing activation of (A) RORγt, as well as secretion of (B) IL-17A, and (C) IL-17F in $CD4^+$ Teffs from indicated strains of mice after immunization. (D and E) FACS quantification and a representative plot of RORγt activation in splenic $CD4^+$ Teffs. FACS quantification and representative plots of (F and G) IL-17A and (H and I) IL-17F production in splenic $CD4^+$ Teffs. Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

macrophages, and neutrophils were not significantly affected (Supplemental Figure 2, F–H). Additional analyses of IL-6Ra expression on renal leukocyte populations showed essentially the same results (Supplemental Figure 3, A–F).

IL-6Ra Classic Signaling in T Cells Directs Th17 Responses

Next, we aimed to study the role of IL-6Ra classic signaling in T cells for generation of Th17 immunity. We thus immunized $CD4^{Cre}\times IL\text{-}6Ra^{fl/fl}\times FIR\times Tiger$ mice with our model antigen, sheep globulin, and studied blood and spleen leukocytes at day 6. Our results showed significantly reduced activation of the Th17 master transcription factor, RORγt, as well as impaired secretion of Th17 cytokines IL-17A and IL-17F in the blood of mice with IL-6Ra$^{-/-}$ T cells (Figure 1, A–C). Similarly, we found the same broad impairment of Th17 responses in splenic leukocytes (Figure 1, D–I).

IL-6Ra Classic Signaling in CD4$^+$ T Cells Mediates Nephritogenic Th17 Responses

Because our $CD4^{Cre}\times IL\text{-}6Ra^{fl/fl}\times FIR\times Tiger$ mice lacked IL-6Ra expression in CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells as well as in

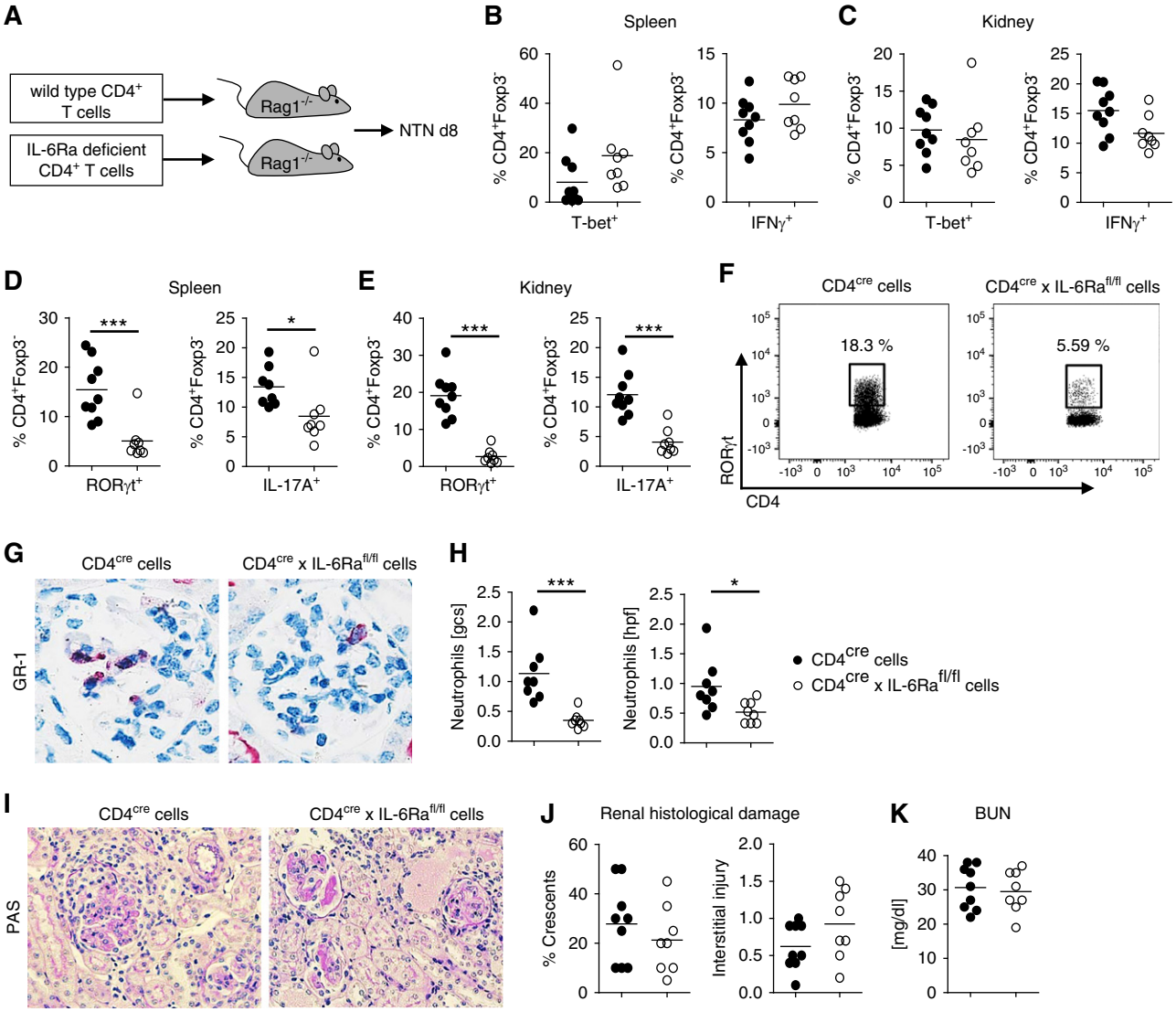


Figure 2. IL-6Ra classic signaling in CD4$^+$ T cells mediates nephritogenic Th17 responses. (A) Experimental setup of the cell transfer experiment. (B and C) FACS quantification of Th1 key molecules T-bet and IFNγ by (B) splenic and (C) renal CD4$^+$ Teffs. (D and E) FACS quantification of Th17 key molecules RORγt and IL-17A by (D) spleen and (E) renal CD4$^+$ Teffs. (F) Representative FACS plots of RORγt activation by renal CD4$^+$ Teffs. (G) Immunohistochemical staining of GR-1–positive neutrophils (red) in nephritic kidneys. (H) Quantification of glomerular and interstitial (hpf, high power field) renal GR-1–positive neutrophils. (I) Representative PAS-stained histologies from nephritic kidneys of the indicated mouse strains. (J) Quantification of glomerular and renal interstitial histologic injury. (K) Quantification of BUN levels. Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. Original magnification, ×400 in G; ×200 in I. *$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$. gcs, glomerular cross-section; hpf, high power field.

some $CD4^+$ and $CD8^+$ dendritic cells, we next performed cell transfer studies. We injected highly purified wild-type or IL-$6Ra^{-/-}$ $CD4^+$ T cells into T cell–deficient $Rag1^{-/-}$ mice and induced NTN (Figure 2A). Analyses of immune responses at day 8 showed similar percentages of splenic and renal Th1s (Figure 2, B and C, Supplemental Figure 4, A and B) in recipients of both cell populations. However, Th17s, as identified by expression of RORγt and IL-17A, were substantially reduced in spleens (Figure 2D) and kidneys (Figure 2, E and F, Supplemental Figure 4C) from recipients of IL-$6Ra^{-/-}$ $CD4^+$ T cells. Similarly, renal infiltration of neutrophils (which are the main Th17 effectors) was significantly diminished (Figure 2, G and H). Because Th17 responses are potent proinflammatory mediators of crescentic GN, we expected the course of NTN to be ameliorated. Surprisingly, however, we did not find relevant differences between the groups regarding histologic injury (Figure 2, I and J), BUN levels (Figure 2K), and albuminuria (not shown). Furthermore, total numbers of infiltrating renal T cells and macrophages were unaltered (Supplemental Figure 4, D–I). These observations pointed toward additional, currently unknown, anti-inflammatory effects of $CD4^+$ T cell–intrinsic IL-6Ra signaling.

NTN is Ameliorated after Transfer of Treg-Depleted IL-$6Ra^{-/-}$ $CD4^+$ T Cells

Because we suspected that IL-6 affects Treg functions, we next performed transfer experiments using purified $CD4^+$ Teffs, which were depleted of Tregs (Figure 3A). Analyses of immune responses 7 days after induction of NTN showed unchanged splenic and renal Th1 and Th2 immunity (Figure 3, B and C). However, similar to our previous transfer experiment, we again found greatly reduced Th17 responses in spleens and nephritic kidneys from recipients of Treg-depleted $CD4^+$ IL-$6Ra^{-/-}$ T cells (Figure 3, D–F). Importantly, in the absence of Tregs, transfer of IL-$6Ra^{-/-}$ $CD4^+$ Teffs resulted in significant

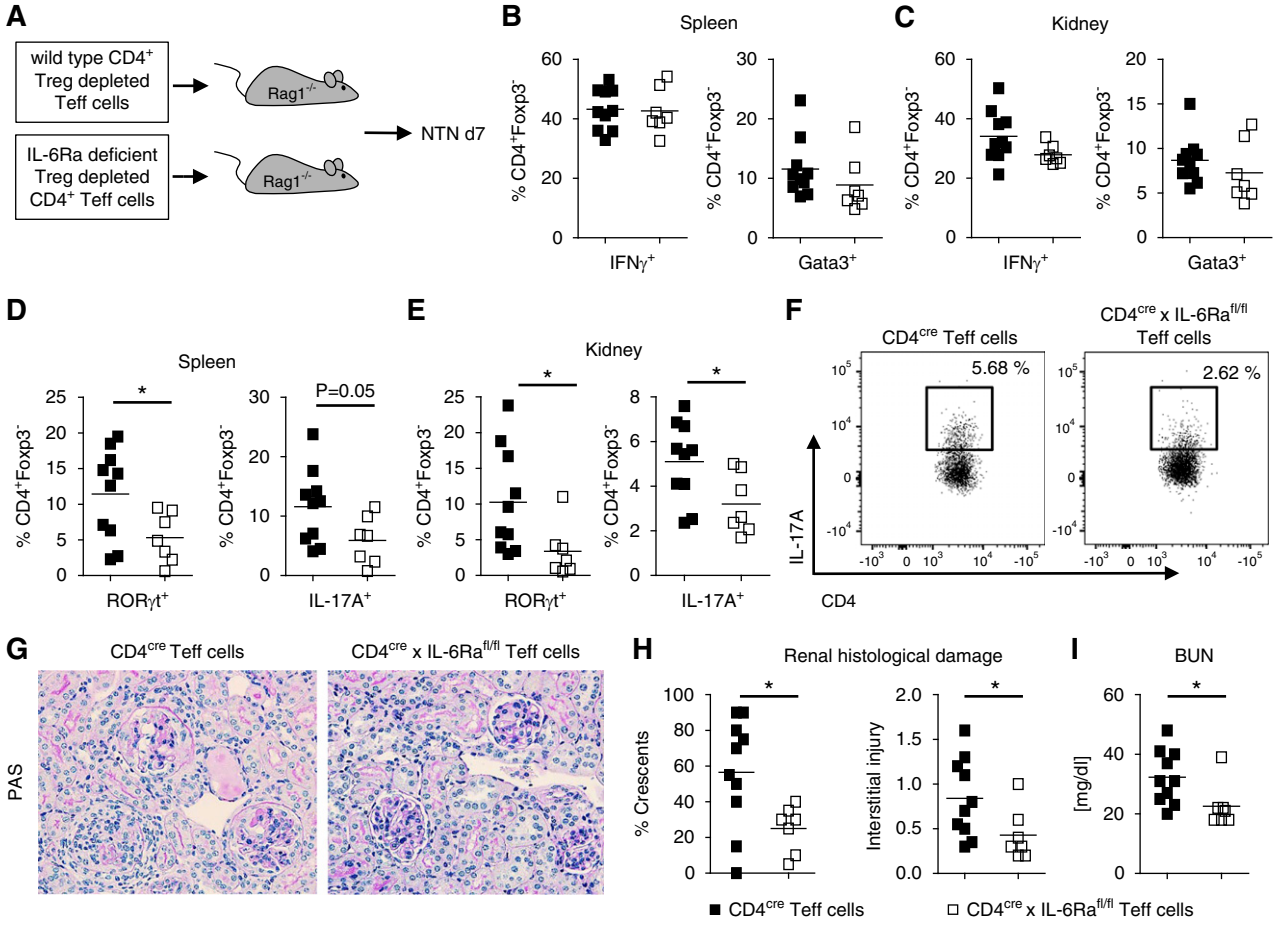


Figure 3. NTN is ameliorated after transfer of Treg-depleted IL-$6Ra^{-/-}$ $CD4^+$ T cells. (A) Experimental setup of the cell transfer experiment. (B and C) FACS quantification of IFNγ secretion and Gata3 activation by (B) splenic and (C) renal $CD4^+$ Teffs. (D and E) FACS quantification of RORγt activation and IL-17A secretion by (D) splenic and (E) renal $CD4^+$ Teffs. (F) Representative FACS plots of IL-17A secretion by renal $CD4^+$ Teffs. (G) Representative PAS-stained sections of nephritic kidneys. (H) Quantification of glomerular crescents (left) and interstitial damage (right). (I) Quantification of BUN. Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. Original magnification, ×200 in G. *$P<0.05$.

amelioration of NTN in terms of histologic damage and BUN levels (Figure 3, G–I). Albuminuria was not different between the groups (not shown). Thus, the findings from our two transfer studies indicated that IL-6 signaling directs Th17 responses and in addition anti-inflammatory Treg-mediated functions, which are currently undefined.

IL-10 Expression by Tregs and Teffs is not Affected by Deficiency of IL-6Ra

It has been speculated that IL-6 enhances IL-10 secretion by Tregs and T regulatory type 1 cells. Because it is technically challenging to analyze cell subtype–specific IL-10 expression *in vivo*, we used the fluorescent signals under control of the Foxp3 and IL-10 promoters in our $CD4^{Cre}$xIL-$6Ra^{fl/fl}$xFIRx-Tiger mice. Analyses at day 10 of NTN, however, showed that IL-10 expression by both Tregs and $Foxp3^-$ Teffs from spleens and nephritic kidneys remained unaffected by the lack of IL-6Ra signaling (Figure 4, A–C).

IL-6Ra Signaling in $CD4^+$ T Cells Directs Development of $ROR\gamma t^+Foxp3^+$ biTregs

We and others have recently identified $ROR\gamma t^+Foxp3^+$ biTregs with enhanced suppressive capacity. Because IL-6 is a known inducer of RORγt activation in Th17 cells, we sought to evaluate whether this might also be the case in Tregs. Indeed, analyses of spleens and kidneys from our $Rag1^{-/-}$ recipients of wild-type $CD4^+$ T cells revealed expansion of the $ROR\gamma t^+$ biTreg population during NTN. In contrast, however, biTregs were almost completely absent in spleens (Figure 5A) and kidneys (Figure 5, B and C) from recipients of IL-$6Ra^{-/-}$ $CD4^+$ T cells. To analyze whether this would also be the case in the nontransfer setting, we also studied Tregs directly in

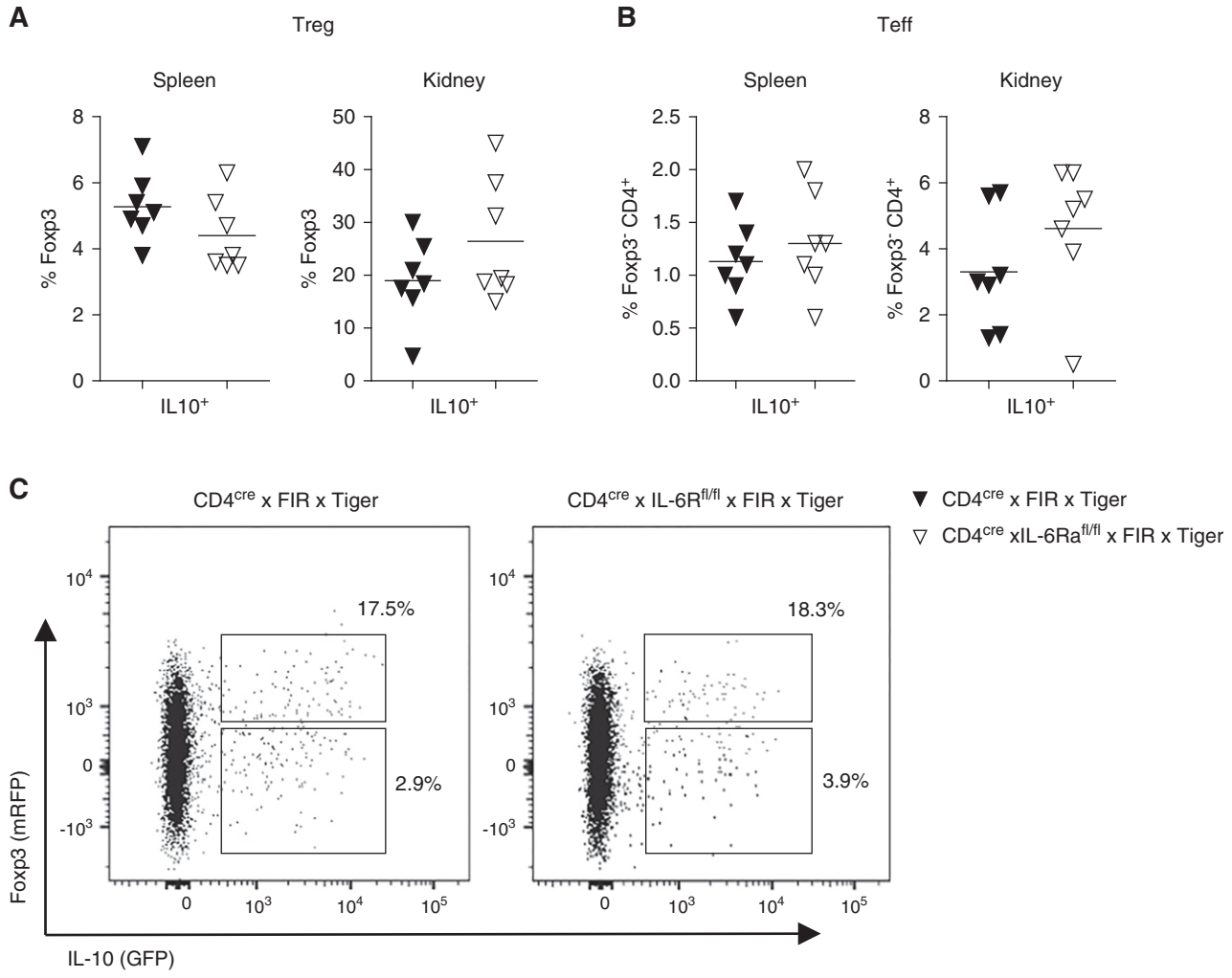


Figure 4. IL-10 expression by Tregs and Teffs is not affected by deficiency of IL-6Ra. (A) FACS analysis of IL-10 secretion by splenic and renal $Foxp3^+$ Tregs from nephritic mice of the indicated genotype. (B) FACS analysis of IL-10 secretion by splenic and renal $Foxp3^-$ $CD4^+$ Teffs. (C) Representative FACS plots showing fluorescent signals of Foxp3 (FIR-mRFP) and IL-10 (Tiger-GFP) in renal $CD4^+$ T cells. Top box shows $IL\text{-}10^+$ Tregs, bottom box shows $IL\text{-}10^+Foxp3^-$ Teffs. Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values.

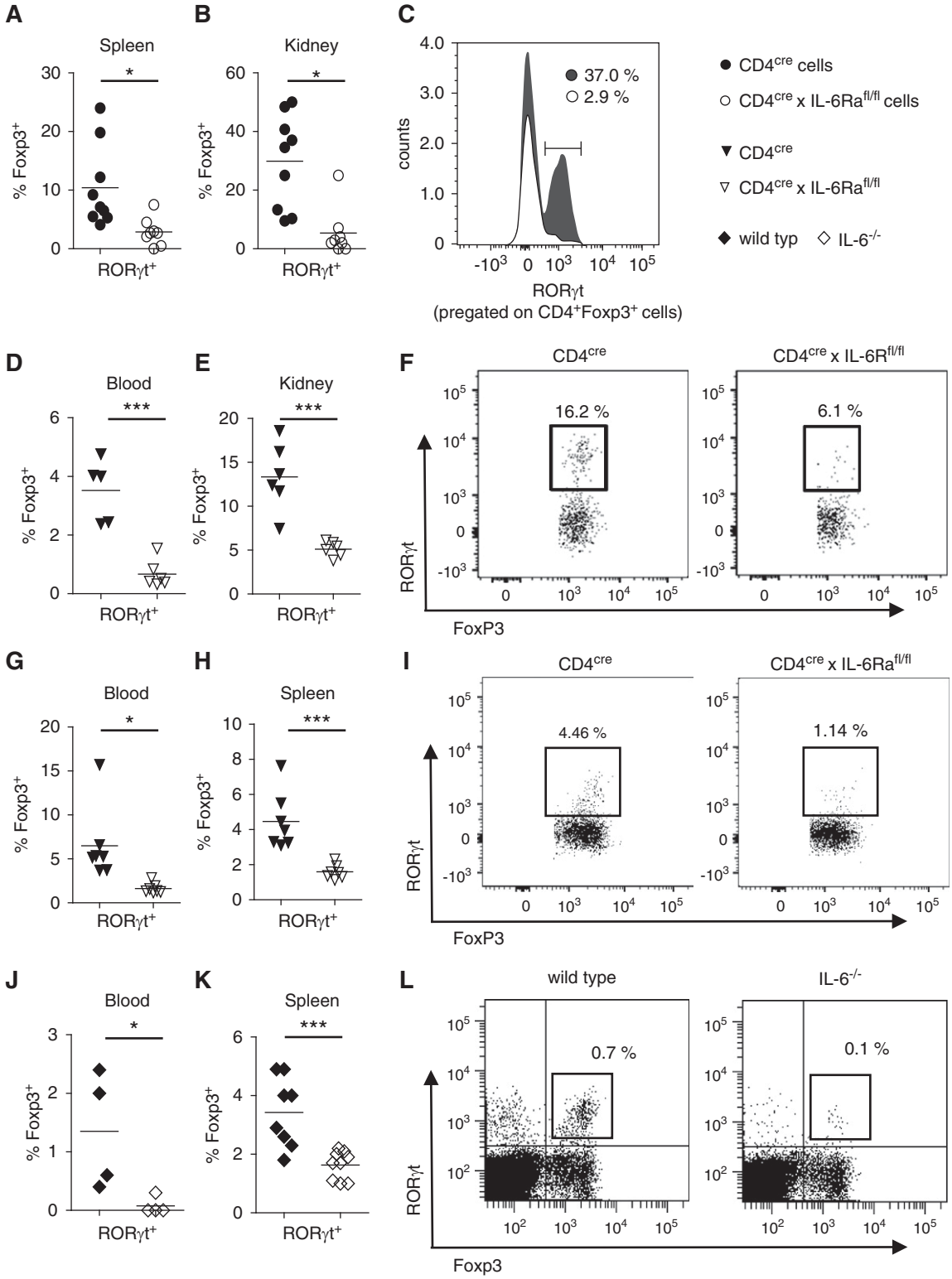


Figure 5. IL-6Ra signaling in CD4$^+$ T cells directs development of RORγt$^+$Foxp3$^+$ biTregs. FACS quantification of (A) splenic and (B) renal biTregs in nephritic Rag1$^{-/-}$ recipients of whole CD4$^+$ T cells. (C) Representative FACS histograms of RORγt expression in transferred renal CD4$^+$Foxp3$^+$ Tregs. Numbers indicate percentages among whole Foxp3$^+$ Tregs. (D and E) FACS analysis of biTregs in (D) blood and (E) kidneys from naive mice of the indicated genotypes. (F) Representative FACS plots of renal biTregs from naive mice of the indicated genotypes. Numbers indicate percentages among whole Foxp3$^+$ Tregs. (G and H) FACS quantification of biTregs among (G) blood and (H) splenic Tregs after sheep IgG immunization. (I) Representative FACS plots of splenic biTregs from immunized mice of

$CD4^{Cre}$×IL-$6Ra^{fl/fl}$×FIR×Tiger mice. Similarly, almost no RORγt$^+$ biTregs were detected in peripheral blood and kidneys of naive animals with IL-$6Ra^{-/-}$ T cells (Figure 5, D–F). We also analyzed blood (Figure 5G) and splenic (Figure 5, H and I) Tregs 6 days after antigen challenge and again found biTreg percentages to be substantially reduced in the absence of T cell–intrinsic IL-6Ra signaling. Finally, we wanted to know whether complete absence of IL-6 would yield the same result. Indeed, our analyses showed that biTregs were almost entirely absent in both blood and spleens of immunized IL-$6^{-/-}$ mice (Figure 5, J–L) at day 6.

Renal Treg Trafficking is Mediated by IL-6Ra Signaling in CD4$^+$ T Cells

We then aimed to evaluate if IL-6Ra signaling might also affect general Treg trafficking properties. Indeed, we found significantly reduced total Foxp3$^+$ Treg numbers and percentages in nephritic kidneys from our $Rag1^{-/-}$ recipients of IL-$6Ra^{-/-}$ CD4$^+$ T cells (Figure 6, A, B, and E). To ensure that this effect was not due to our transfer setting, we also studied IL-6 pan-knockout mice. Again, we found greatly diminished renal Treg numbers and percentages at day 10 of NTN (Figure 6, C and D). Splenic Treg percentages, in contrast, were not different between the groups in both settings and strains of mice (Supplemental Figure 5, A and B), which suggested impairment of renal Treg trafficking. To determine the potential mechanisms involved, we analyzed Treg chemokine receptor profiles. In line with the known dependency on RORγt, we found reduced CCR6 expression on Tregs from the blood of naive (Figure 6F) and spleens of antigen-challenged $CD4^{Cre}$×IL-$6Ra^{fl/fl}$×FIR×Tiger mice (Figure 6G). Because two different Treg populations, namely Stat3-dependent Treg17s and RORγt-dependent biTregs, are known to express CCR6, we wanted to differentiate between these functionally distinct populations. Interestingly, our analyses showed specific reduction of the RORγt$^+$CCR6$^+$ biTreg population, but not of the RORγt-negative CCR6$^+$ Treg17s (Figure 6, H–J). Finally, we studied renal Tregs in our nephritic $Rag1^{-/-}$ recipients and again found significantly reduced CCR6 expression on transferred IL-$6Ra^{-/-}$ Tregs (Figure 6K). Notably, only the renal RORγt$^+$CCR6$^+$ biTreg population was diminished (Figure 6L), whereas percentages of RORγt-negative CCR6$^+$ Treg17s remained unchanged (Figure 6M).

IL-6 Treatment Induces RORγt$^+$Foxp3$^+$ biTregs and Increases *In Vitro* Treg Suppressive Capacity

In light of the results from our *in vivo* studies, we next wanted to explore if IL-6 is capable of directly inducing RORγt expression in Tregs. Confirming our hypothesis, *in vitro* treatment of cultured Tregs with recombinant IL-6 resulted in significant expansion of RORγt$^+$ biTregs (Figure 7A). Expression of the Treg activation markers CTLA-4, ICOS, and CD103 (known characteristics of biTregs) was also enhanced by IL-6 treatment (Figure 7, B–D). Furthermore, *in vitro* suppression assays revealed reduced capacity of IL-$6Ra^{-/-}$ Tregs to downregulate Teff proliferation (Figure 7E). Likewise, suppression of IL-2 and IL-17 secretion, as well as production of anti-inflammatory IL-10, was impaired in cocultures of Teffs with IL-$6Ra^{-/-}$ Tregs (Figure 7, F–H). In line with these *in vitro* findings, mice with IL-$6Ra^{-/-}$ T cells showed much higher Teff proliferation in the blood (Figure 7I) as well as Teff activation in blood (Figure 7J) and spleens (Figure 7, K and L) after *in vivo* antigen immunization.

IL-6Ra Classic Signaling Enhances *In Vivo* Treg Function and Protects from GN

Finally, we wanted to assess whether the observed failure to generate RORγt$^+$Foxp3$^+$ biTregs from IL-$6Ra^{-/-}$ T cells is of functional importance for the course of GN. We thus isolated Tregs from $CD4^{Cre}$×IL-$6Ra^{fl/fl}$×FIR×Tiger or IL-6Ra sufficient wild-type controls and coinjected each population together with wild-type Teffs into $Rag1^{-/-}$ recipients (Figure 8A). At day 7 of NTN, systemic expansion of total Tregs was identical in both groups of mice (Figure 8B). However, we found significantly reduced percentages of splenic and renal biTregs in recipients of IL-$6Ra^{-/-}$ Tregs (Figure 8, C–E). Moreover, we counted fewer Tregs in kidneys of knockout recipients, indicating impaired trafficking properties (Figure 8, F and G). Th17 responses, in contrast, remained unchanged (Supplemental Figure 6, A and B). Finally, and most importantly, NTN was much worse in recipients of IL-$6Ra^{-/-}$ Tregs (Figure 8, H–K), indicating a protective role of IL-6Ra signaling for GN *via* induction of RORγt$^+$ biTregs.

DISCUSSION

Because IL-6–directed therapies are increasingly used in clinical practice,[48] we aimed to better characterize the complex function of IL-6R signaling and its consequences for GN. Given cumulating evidence that Th17s and Tregs are key players of renal inflammation,[1] we were particularly interested in whether and how CD4$^+$ T cell–intrinsic IL-6Ra signaling affects their development and function. We generated quadruple transgenic mice with IL-6Ra deficiency in CD4-expressing cells, which at the same time express fluorochromes under control of the Foxp3 and IL-10 promoters. Using these mice, we first wanted to address whether T cell–intrinsic IL-6Ra

the indicated genotypes. Numbers indicate percentages among whole Foxp3$^+$ Tregs. (J and K) FACS analysis of biTreg percentages among (J) blood and (K) splenic Tregs of immunized wild-type and IL-$6^{-/-}$ mice. (L) Representative FACS plots of biTregs in spleens from immunized mice of the indicated genotype. Numbers indicate percentages of whole CD4$^+$ T cells. Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. *$P<0.05$, ***$P<0.001$.

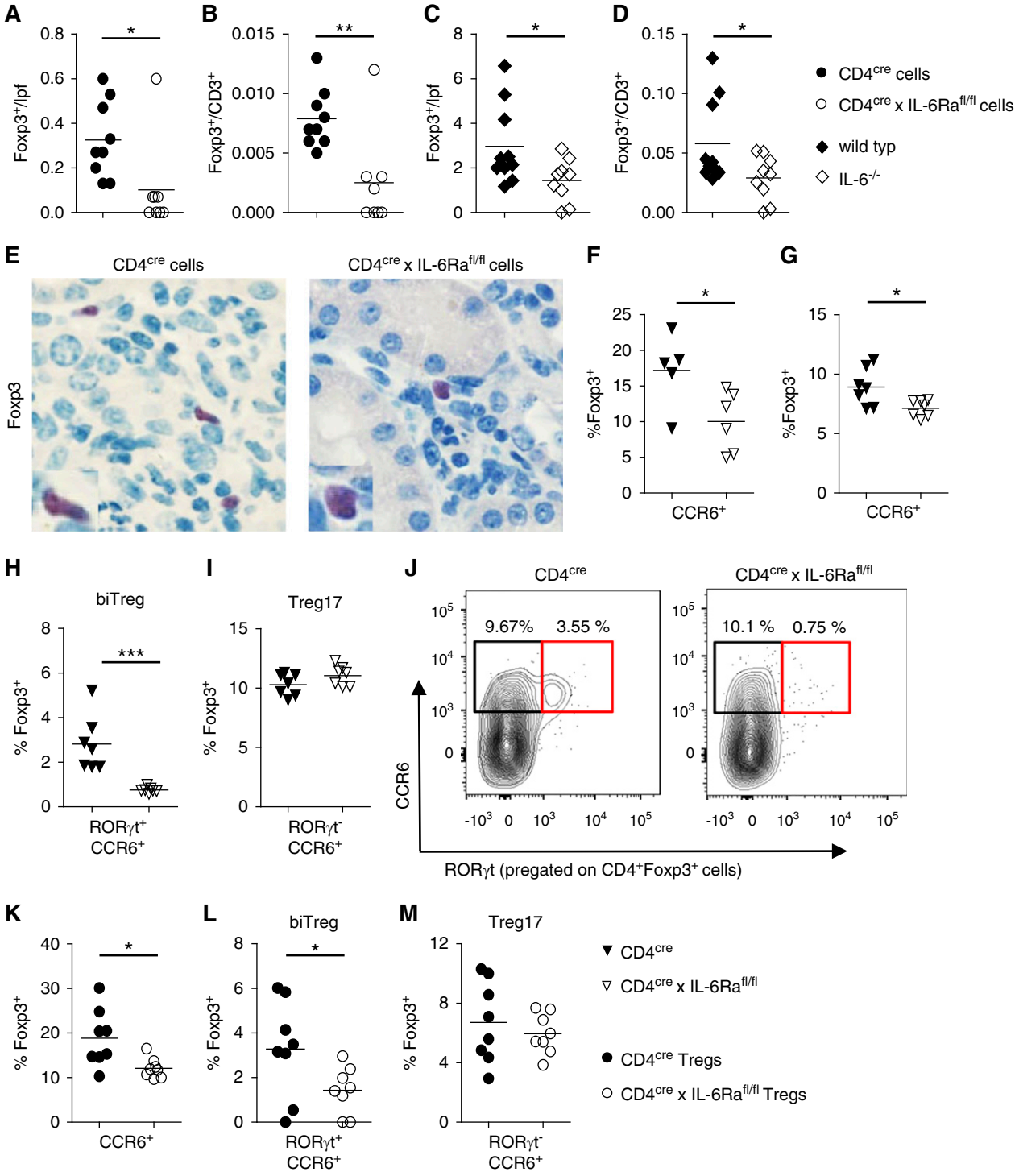


Figure 6. Renal Treg trafficking is mediated by IL-6Ra signaling in $CD4^+$ T cells. (A–E) Immunohistochemical analysis of renal Tregs. (A) Numbers and (B) percentages of renal $Foxp3^+$ Tregs in nephritic $Rag1^{-/-}$ recipient mice of $CD4^+$ T cells of the indicated genotypes. (C) Numbers and (D) percentages of renal $Foxp3^+$ Tregs in nephritic wild-type and IL-$6^{-/-}$ mice. (E) Representative renal immunohistochemical stainings of Foxp3. (F–G) FACS analysis of CCR6 expression on Tregs from (F) naive blood and (G) spleens after immunization of mice with the indicated genotypes. FACS analysis of (H) $ROR\gamma t^+CCR6^+$ biTregs and (I) $ROR\gamma t^-CCR6^+$ Treg17s in spleens of immunized mice. (J) Representative FACS plots of $ROR\gamma t^+CCR6^+$ biTregs (red box) and $ROR\gamma t^-CCR6^+$ Treg17s (black box) in splenic Tregs of mice of the indicated genotypes. Numbers in plots indicate percentages among whole $Foxp3^+$ Tregs. (K) FACS analysis of CCR6 expression on renal $Foxp3^+$ Tregs in nephritic $Rag1^{-/-}$ recipients of $CD4^+$ T cells of the indicated genotypes. (L and M) FACS analysis of (L) $ROR\gamma t^+CCR6^+$ biTregs and (M) $ROR\gamma t^-CCR6^+$ Treg17s in nephritic kidneys of $Rag1^{-/-}$ recipients of $CD4^+$ T cells. Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. Original magnification, ×400 in E. *$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$. lpf, low power field.

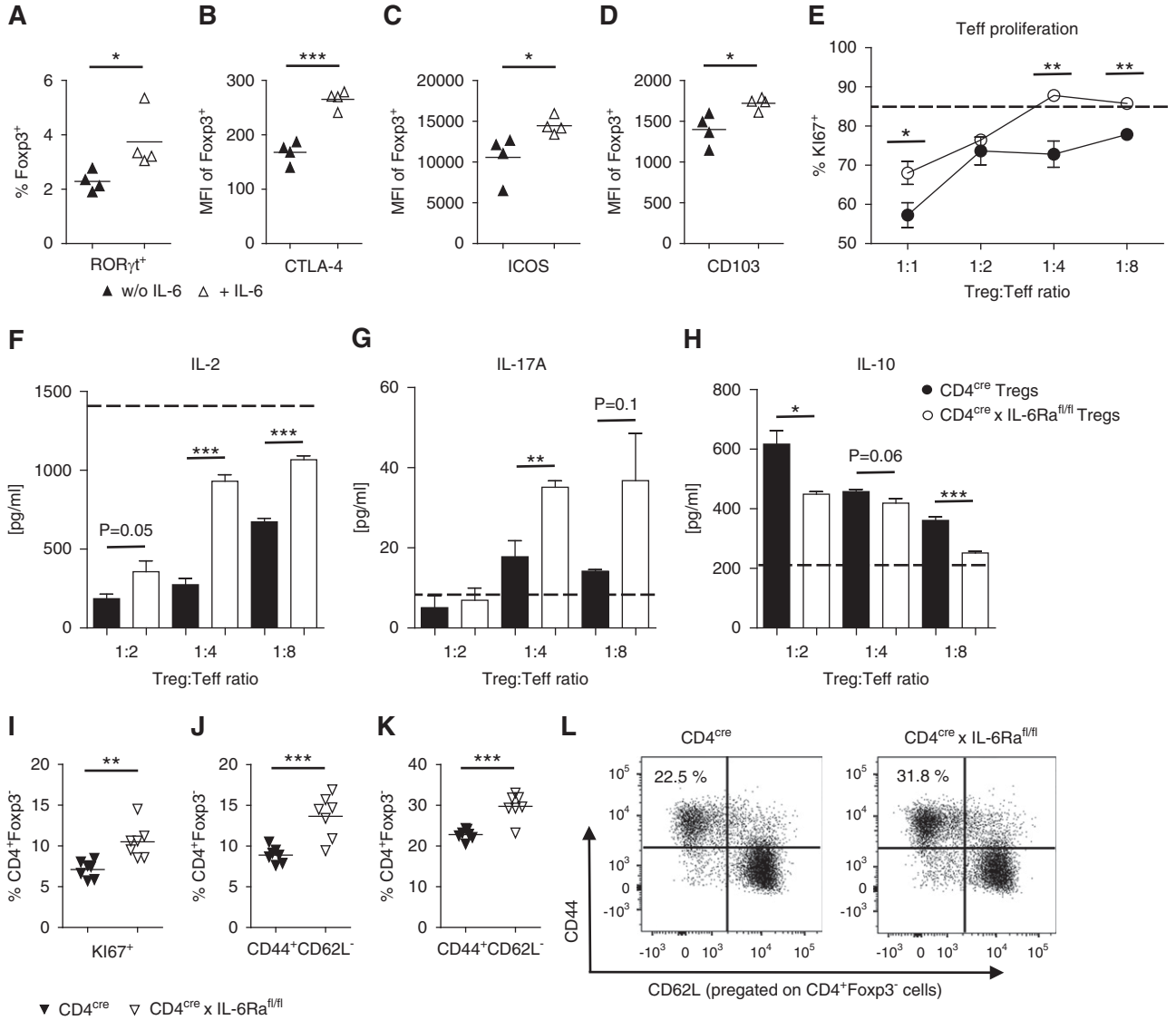


Figure 7. IL-6 signaling induces RORγt$^+$Foxp3$^+$ biTregs and increases *in vitro* Treg suppressive capacity. (A) FACS quantification of RORγt expression by sorted Tregs from spleens of naive mice with and without (w/o) IL-6 treatment. (B–D) Mean fluorescence intensity (MFI) of indicated molecules on Tregs with or without IL-6 treatment. (E) FACS analysis of proliferating KI67$^+$ Teffs in Treg/Teff co-cultures, mixed at the indicated ratios. (F and H) Concentration of the indicated cytokines in the supernatant of Treg/Teff cocultures, mixed at the indicated ratios, as measured by ELISA. (I) FACS analysis of Teff proliferation by quantification of KI67 expression in the blood of immunized mice. (J–L) FACS analysis of Teff activation by quantification of CD62L and CD44 expression in (J) blood and (K) spleens of immunized mice. (L) Representative FACS plots of CD62L and CD44 expression by splenic Teff of immunized mice. Bar graphs show means, error bars indicate SEM. Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

signaling mediates generation of Th17 responses. Indeed, after antigen immunization, mice with IL-6Ra$^{-/-}$ T cells showed broadly reduced Th17 immunity. Next, we aimed to study the functional role of IL-6R signaling in CD4$^+$ T cells for GN. Given the known Cre expression in some non-CD4$^+$ T cells of CD4^{Cre} transgenic mice and the lack of more CD4$^+$ T cell–specific alternatives, we decided to perform adoptive transfer studies. Purified wild-type or IL-6Ra$^{-/-}$ whole CD4$^+$ T cells were injected into Rag1$^{-/-}$ mice and the NTN model of acute crescentic GN was induced. Analyses revealed selectively and markedly reduced Th17 immunity in recipients of IL-6Ra$^{-/-}$ T helper cells. Similarly, we observed reduced renal infiltration of neutrophils, which constitute the main effector arm of Th17 responses. Surprisingly, however, despite almost complete absence of Th17s, nephritis was not ameliorated. This finding indicated that IL-6Ra signaling in T cells might not only induce pathogenic Th17 responses, but also some as-yet-unknown anti-inflammatory T cell functions or populations. Given some recent reports that IL-6 promotes anti-inflammatory Tregs,[24–27] we decided to repeat our transfer experiments using

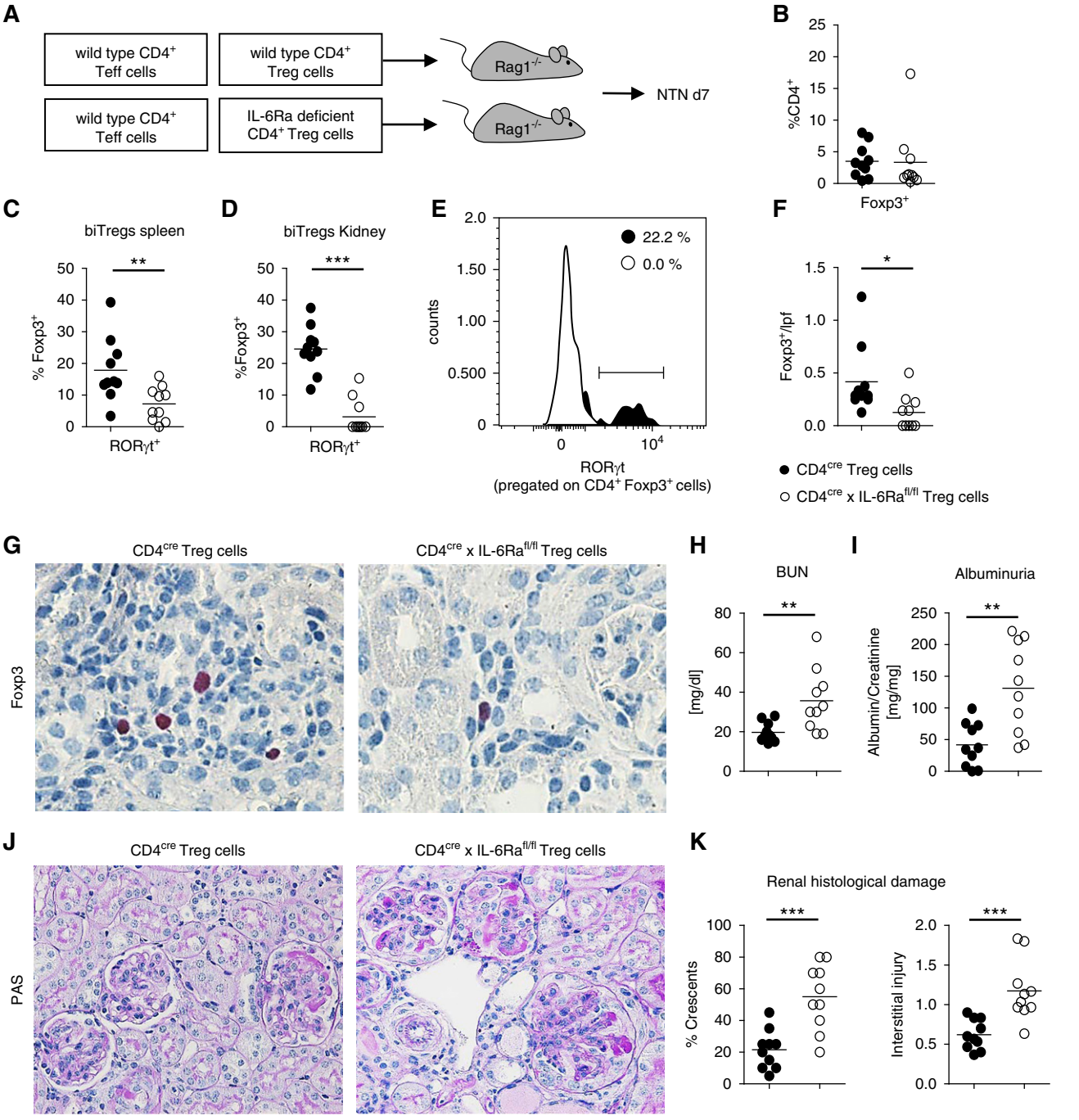


Figure 8. IL-6Ra classic signaling enhances *in vivo* Treg function and protects from GN. (A) Experimental setup of the cell transfer experiment. (B) FACS analysis of Treg percentages among splenic $CD4^+$ T cells. (C and D) FACS analyses of $ROR\gamma t^+$ biTreg percentages among (C) splenic and (D) renal Tregs. (E) Representative FACS histograms showing renal $ROR\gamma t^+$ biTregs. Numbers indicate percentages among whole Tregs. (F) Quantification of renal $Foxp3^+$ Tregs. (G) Representative renal immunohistochemical stainings of Foxp3. (H) Quantification of BUN levels. (I) Quantification of urinary albumin/creatinine ratios. (J) Representative PAS-stained sections of kidneys from recipients of the indicated cell populations. (K) Quantitative analysis of glomerular and renal interstitial damage. Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. Original magnification, ×400 in G; ×200 in J. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$. lpf, low power field.

Treg-depleted $CD4^+$ Teff populations. In the absence of Tregs, we again found strikingly reduced development of Th17 responses from IL-$6Ra^{-/-}$ Teffs. Importantly, and in contrast to our experiment using Treg-sufficient whole $CD4^+$ T cells, we now observed significantly ameliorated renal injury in recipients of knockout cells. This finding confirmed that

T cell–intrinsic classic IL-6R signaling results in generation of nephritogenic Th17s. However, somewhat surprisingly and contrary to the common belief, our data also indicated that IL-6Ra signaling seems to enhance anti-inflammatory Treg functions. Because it has been speculated that IL-6 supports secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by Tregs and $CD4^+$ Teffs,[28–30] we next evaluated this aspect. However, using our double reporter mice, we did not find relevant changes in IL-10 secretion by either T cell population in the absence of IL-6Ra signaling. In a next step, we wanted to evaluate whether IL-6 might not only be responsible for induction of RORγt activation in Th17 cells but also in Tregs. This aspect was of particular interest to us because $ROR\gamma t^+Foxp3^+$ biTregs have recently been characterized as an independent Treg population with enhanced suppressive capacity.[40,41] Indeed, we found substantially reduced percentages of $ROR\gamma t^+$ biTregs among transferred IL-$6Ra^{-/-}$ Tregs during NTN. The same occurred in the nontransfer setting when we studied naive and antigen-immunized $CD4^{Cre} \times$ IL-$6Ra^{fl/fl} \times$ FIR $\times$ Tiger mice. Finally, we also found greatly diminished biTreg frequencies in IL-6 pan-knockout mice. Given these consistent results from various different experimental setups and mouse strains, we wanted to study the functional importance of impaired biTreg generation in more detail. Interestingly, we observed reduced renal Tregs after both adoptive cell transfer of IL-6Ra deficient Tregs and in IL-6 pan-deficient mice. Systemic Treg percentages, in contrast, remained unaltered, which indicated IL-6Ra–mediated effects on renal Treg trafficking. Because RORγt is a strong inducer of the chemokine receptor CCR6 in Th17s,[60] we evaluated whether this would also be the case in Tregs. Indeed, expression of CCR6 was significantly decreased on IL-$6Ra^{-/-}$ Tregs. This is likely to impair their trafficking properties and could account for the reduced renal Treg accumulation. Notably, we and others recently found that the CCR6 is not only expressed by $ROR\gamma t^+$ biTregs.[40] CCR6 is also found on another highly specialized Treg population, namely Stat3-dependent Treg17s, which are specialized to downregulate Th17 responses.[11,12,61] Interestingly, however, only the $CCR6^+ROR\gamma t^+$ biTreg population was missing among IL-$6Ra^{-/-}$ Tregs, whereas percentages of $ROR\gamma t^-CCR6^+$ Treg17s remained unchanged highlighting the independent characters of Treg17s and biTregs. Next, we wanted to study whether *in vitro* treatment of Tregs with IL-6 might complement our *in vivo* findings and lead to generation of biTregs. Interestingly, addition of IL-6 to cultured Tregs induced expression of RORγt as well as three molecules associated with enhanced Treg function, CTLA-4, ICOS, and CD103, which are characteristic for biTregs.[38,40] Similarly, both *in vitro* and *in vivo* studies indicated significantly reduced suppressive capacity of IL-$6Ra^{-/-}$ Tregs. We thus aimed to analyze the functional importance of Treg-intrinsic IL-6Ra signaling for the clinical course of GN. To this end, we isolated IL-6Ra-deficient and intact Tregs and mixed both populations with wild-type Teffs. After adoptive transfer into $Rag1^{-/-}$ mice, we studied NTN. Confirming our concept, percentages of biTregs were substantially and selectively reduced in recipients of IL-$6Ra^{-/-}$ Tregs. We also found significantly fewer renal Tregs in knockout recipients, again indicating impaired trafficking properties. Finally, and most importantly, absence of IL-6Ra selectively on Tregs resulted in far more renal tissue damage.

In summary, our findings thus show that IL-6Ra T cell–intrinsic classic signaling indeed has Janus-faced functions[62] by (*1*) induction of nephritogenic $ROR\gamma t^+$ Th17 responses, and (*2*) expansion of protective $ROR\gamma t^+$ biTregs with enhanced trafficking and suppressive capacity. Our data therefore challenge the old paradigm that IL-6 acts as a proinflammatory switch, inducing Th17 responses and suppressing Tregs. Rather, we provide evidence that IL-6 classic signaling enhances both diametrically opposed T cell responses at the same time and to a similar extent. How could these data help to establish IL-6–directed therapies of renal inflammatory diseases? Our study suggests that nonselective blockade of IL-6 or the IL-6R, which interferes with all IL-6 signaling pathways on all responsive cells, might not be the right method. More specific strategies and agents should rather be developed. One approach might be selective interference with IL-6 alternative signaling, which has been reported to be pathogenic in GN.[53] Another strategy would be to develop cell type–specific IL-6R blockers. Finally, Treg-specific delivery of IL-6 or *ex vivo* Treg expansion and activation by IL-6 with subsequent reinfusion[63] might be future therapeutic directions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Schaper and I. Holtze for their excellent technical help.

Dr. Steinmetz designed the study and wrote the manuscript. Ms. Hagenstein, Dr. Nosko, Dr. Melderis, Mr. Warkotsch, Mr. Richter, Mr. Ramcke, Dr. Herrnstadt, Dr. Yan, Dr. Mittrücker, and Dr. Kluger carried out experiments. Dr. Scheller donated mice and critically evaluated the manuscript. Dr. Steinmetz analyzed the data.

DISCLOSURES

Mr. Warkotsch reports grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 1192), during the conduct of the study. Dr. Mittrücker reports grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft, during the conduct of the study. All of the remaining authors have nothing to disclose.

FUNDING

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KFO 228 STE 1822/3-1 to Dr. Steinmetz, SFB 1192 TPA03 to Dr. Steinmetz and Dr. Kluger, and SFB 1192 TPA04 to Dr. Mittrücker).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

This article contains the following supplemental material online at http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2019020118/-/DCSupplemental.

Supplemental Figure 1. IL-6Ra expression on naive lymphocytes.

Supplemental Figure 2. $CD4^{Cre}$ mediated excision of IL-6Ra on different splenic leukocyte subsets.

Supplemental Figure 3. $CD4^{Cre}$ mediated excision of IL-6Ra on different renal leukocyte subsets.

Supplemental Figure 4. Renal T cell responses in recipients of IL-$6Ra^{-/-}$ whole $CD4^+$ T cells after NTN induction.

Supplemental Figure 5. Systemic Treg percentages remain unaffected by IL-6Ra deficiency and in IL-$6^{-/-}$ mice.

Supplemental Figure 6. Th17 responses are unchanged in nephritic mice after transfer of IL-$6Ra^{-/-}$ Tregs.

REFERENCES

1. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ: The immune system and kidney disease: Basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol* 13: 738–753, 2013
2. Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Panzer U: The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int* 77: 1070–1075, 2010
3. Steinmetz OM, Summers SA, Gan PY, Semple T, Holdsworth SR, Kitching AR: The Th17-defining transcription factor RORγt promotes glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 22: 472–483, 2011
4. Kitching AR, Holdsworth SR: The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury. *J Am Soc Nephrol* 22: 235–238, 2011
5. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA: FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 490–500, 2010
6. Ramsdell F, Ziegler SF: FOXP3 and scurfy: How it all began. *Nat Rev Immunol* 14: 343–349, 2014
7. Dominguez-Villar M, Hafler DA: Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol* 19: 665–673, 2018
8. Wolf D, Hochegger K, Wolf AM, Rumpold HF, Gastl G, Tilg H, et al.: CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol* 16: 1360–1370, 2005
9. Steinmetz OM, Turner JE, Panzer U: Staying on top of things right from the start: The obsessive-compulsive disorder of regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 21: 6–7, 2010
10. Paust HJ, Ostmann A, Erhardt A, Turner JE, Velden J, Mittrücker HW, et al.: Regulatory T cells control the Th1 immune response in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 80: 154–164, 2011
11. Kluger MA, Luig M, Wegscheid C, Goerke B, Paust HJ, Brix SR, et al.: Stat3 programs Th17-specific regulatory T cells to control GN. *J Am Soc Nephrol* 25: 1291–1302, 2014
12. Kluger MA, Melderis S, Nosko A, Goerke B, Luig M, Meyer MC, et al.: Treg17 cells are programmed by Stat3 to suppress Th17 responses in systemic lupus. *Kidney Int* 89: 158–166, 2016
13. Nosko A, Kluger MA, Diefenhardt P, Melderis S, Wegscheid C, Tiegs G, et al.: T-bet enhances regulatory T cell fitness and directs control of Th1 responses in crescentic GN. *J Am Soc Nephrol* 28: 185–196, 2017
14. Diefenhardt P, Nosko A, Kluger MA, Richter JV, Wegscheid C, Kobayashi Y, et al.: IL-10 receptor signaling empowers regulatory T cells to control Th17 responses and protect from GN. *J Am Soc Nephrol* 29: 1825–1837, 2018
15. Ooi JD, Petersen J, Tan YH, Huynh M, Willett ZJ, Ramarathinam SH, et al.: Dominant protection from HLA-linked autoimmunity by antigen-specific regulatory T cells. *Nature* 545: 243–247, 2017
16. Alikhan MA, Huynh M, Kitching AR, Ooi JD: Regulatory T cells in renal disease. *Clin Transl Immunology* 7: e1004, 2018
17. Krebs CF, Schmidt T, Riedel JH, Panzer U: T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease. *Nat Rev Nephrol* 13: 647–659, 2017
18. Dolff S, Witzke O, Wilde B: Th17 cells in renal inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 18: 129–136, 2019
19. Bluestone JA, Tang Q: T_{reg} cells-the next frontier of cell therapy. *Science* 362: 154–155, 2018
20. Kimura A, Kishimoto T: IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 40: 1830–1835, 2010
21. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al.: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235–238, 2006
22. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B: TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24: 179–189, 2006
23. Kimura A, Naka T, Kishimoto T: IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12099–12104, 2007
24. Nakagawa T, Tsuruoka M, Ogura H, Okuyama Y, Arima Y, Hirano T, et al.: IL-6 positively regulates Foxp3+CD8+ T cells in vivo. *Int Immunol* 22: 129–139, 2010
25. Tormo AJ, Letellier MC, Sharma M, Elson G, Crabé S, Gauchat JF: IL-6 activates STAT5 in T cells. *Cytokine* 60: 575–582, 2012
26. Smith KA, Maizels RM: IL-6 controls susceptibility to helminth infection by impeding Th2 responsiveness and altering the Treg phenotype in vivo. *Eur J Immunol* 44: 150–161, 2014
27. Kampan NC, Madondo MT, McNally OM, Stephens AN, Quinn MA, Plebanski M: Interleukin 6 present in inflammatory ascites from advanced epithelial ovarian cancer patients promotes tumor necrosis factor receptor 2-expressing regulatory T cells. *Front Immunol* 8: 1482, 2017
28. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, et al.: Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 8: 1363–1371, 2007
29. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al.: TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8: 1390–1397, 2007
30. Jin JO, Han X, Yu Q: Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation. *J Autoimmun* 40: 28–44, 2013
31. Fujimoto M, Nakano M, Terabe F, Kawahata H, Ohkawara T, Han Y, et al.: The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 186: 32–40, 2011
32. Nish SA, Schenten D, Wunderlich FT, Pope SD, Gao Y, Hoshi N, et al.: T cell-intrinsic role of IL-6 signaling in primary and memory responses. *eLife* 3: e01949, 2014
33. Goodman WA, Levine AD, Massari JV, Sugiyama H, McCormick TS, Cooper KD: IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J Immunol* 183: 3170–3176, 2009
34. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W: Cutting edge: Regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 178: 6725–6729, 2007
35. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, et al.: Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29: 44–56, 2008
36. Lochner M, Peduto L, Cherrier M, Sawa S, Langa F, Varona R, et al.: *In vivo* equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *J Exp Med* 205: 1381–1393, 2008
37. Wang T, Sun X, Zhao J, Zhang J, Zhu H, Li C, et al.: Regulatory T cells in rheumatoid arthritis showed increased plasticity toward Th17 but retained suppressive function in peripheral blood. *Ann Rheum Dis* 74: 1293–1301, 2015
38. Ohnmacht C, Park JH, Cording S, Wing JB, Atarashi K, Obata Y, et al.: MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through RORγt$^+$ T cells. *Science* 349: 989–993, 2015

39. Sefik E, Geva-Zatorsky N, Oh S, Konnikova L, Zemmour D, McGuire AM, et al.: MUCOSAL IMMUNOLOGY. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of RORγ$^+$ regulatory T cells. *Science* 349: 993–997, 2015
40. Kluger MA, Meyer MC, Nosko A, Goerke B, Luig M, Wegscheid C, et al.: RORγt(+)Foxp3(+) cells are an independent bifunctional regulatory T cell lineage and mediate crescentic GN. *J Am Soc Nephrol* 27: 454–465, 2016
41. Yang BH, Hagemann S, Mamareli P, Lauer U, Hoffmann U, Beckstette M, et al.: Foxp3(+) T cells expressing RORγt represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 9: 444–457, 2016
42. Krebs CF, Steinmetz OM: CD4$^+$ T cell fate in glomerulonephritis: A tale of Th1, Th17, and novel Treg subtypes. *Mediators Inflamm* 2016: 5393894, 2016
43. Kluger MA, Nosko A, Ramcke T, Goerke B, Meyer MC, Wegscheid C, et al.: RORγt expression in T_{regs} promotes systemic lupus erythematosus via IL-17 secretion, alteration of T_{reg} phenotype and suppression of Th2 responses. *Clin Exp Immunol* 188: 63–78, 2017
44. Schaper F, Rose-John S: Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev* 26: 475–487, 2015
45. Hunter CA, Jones SA: IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 16: 448–457, 2015
46. Heink S, Yogev N, Garbers C, Herwerth M, Aly L, Gasperi C, et al.: Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic T_H17 cells. *Nat Immunol* 18: 74–85, 2017
47. Rubbert-Roth A, Furst DE, Nebesky JM, Jin A, Berber E: A review of recent advances using tocilizumab in the treatment of rheumatic diseases. *Rheumatol Ther* 5: 21–42, 2018
48. Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S: Interleukin-6: Designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat Rev Drug Discov* 17: 395–412, 2018
49. Su H, Lei CT, Zhang C: Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: An update. *Front Immunol* 8: 405, 2017
50. Karkar AM, Tam FW, Proudfoot AE, Meager A, Rees AJ: Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by interleukin-6. *Kidney Int* 44: 967–973, 1993
51. Karkar AM, Smith J, Tam FW, Pusey CD, Rees AJ: Abrogation of glomerular injury in nephrotoxic nephritis by continuous infusion of interleukin-6. *Kidney Int* 52: 1313–1320, 1997
52. Luig M, Kluger MA, Goerke B, Meyer M, Nosko A, Yan I, et al.: Inflammation-induced IL-6 functions as a natural brake on macrophages and limits GN. *J Am Soc Nephrol* 26: 1597–1607, 2015
53. Braun GS, Nagayama Y, Maruta Y, Heymann F, van Roeyen CR, Klinkhammer BM, et al.: IL-6 trans-signaling drives murine crescentic GN. *J Am Soc Nephrol* 27: 132–142, 2016
54. Illei GG, Shirota Y, Yarboro CH, Daruwalla J, Tackey E, Takada K, et al.: Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: Data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum* 62: 542–552, 2010
55. Rovin BH, van Vollenhoven RF, Aranow C, Wagner C, Gordon R, Zhuang Y, et al.: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of treatment with sirukumab (CNTO 136) in patients with active lupus nephritis. *Arthritis Rheumatol* 68: 2174–2183, 2016
56. Holdsworth SR, Gan PY, Kitching AR: Biologics for the treatment of autoimmune renal diseases. *Nat Rev Nephrol* 12: 217–231, 2016
57. Sakai R, Kondo T, Kurasawa T, Nishi E, Okuyama A, Chino K, et al.: Current clinical evidence of tocilizumab for the treatment of ANCA-associated vasculitis: A prospective case series for microscopic polyangiitis in a combination with corticosteroids and literature review. *Clin Rheumatol* 36: 2383–2392, 2017
58. Wan YY, Flavell RA: Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5126–5131, 2005
59. Kamanaka M, Kim ST, Wan YY, Sutterwala FS, Lara-Tejero M, Galán JE, et al.: Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* 25: 941–952, 2006
60. Ranasinghe R, Eri R: Pleiotropic immune functions of chemokine receptor 6 in health and disease. *Medicines (Basel)* 5: 69, 2018
61. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, et al.: CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326: 986–991, 2009
62. Salama AD, Little MA: The Janus faces of IL-6 in GN. *J Am Soc Nephrol* 26: 1480–1482, 2015
63. Chandran S, Tang Q, Sarwal M, Laszik ZG, Putnam AL, Lee K, et al.: Polyclonal regulatory T cell therapy for control of inflammation in kidney transplants. *Am J Transplant* 17: 2945–2954, 2017

See related editorial, "The Complex Role of Interleukin 6 in Regulating T-cell Responses during Acute Glomerulonephritis," on pages 1341–1344.

Supplemental Information

A novel role for IL-6 receptor classic signaling: induction of RORγt^{+}Foxp3^{+} Tregs with enhanced suppressive capacity

Julia Hagenstein, Simon Melderis, Anna Nosko, Matthias T. Warkotsch, Johannes V. Richter, Torben Ramcke, Georg R. Herrnstadt, Jürgen Scheller, Isabell Yan, Hans-Willi Mittrücker, Malte A. Kluger, Oliver M. Steinmetz

Contents

Supplementary Figure S1. IL-6Ra expression on naive lymphocytes

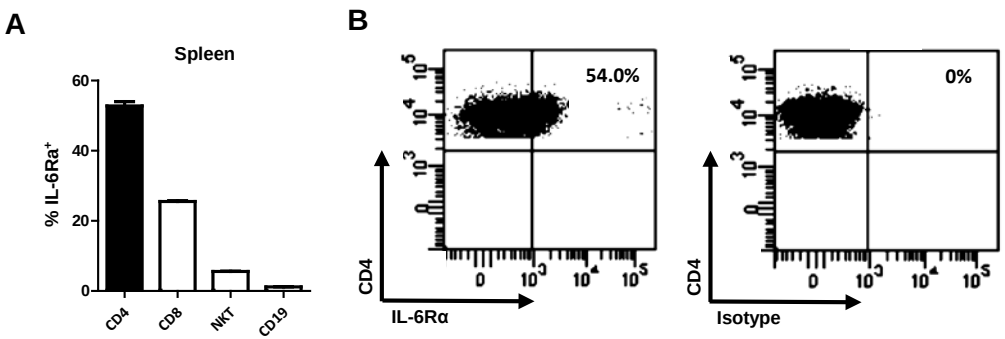
Supplementary Figure S2. CD4^{Cre} mediated excision of IL-6Ra on different splenic leukocyte subsets

Supplementary Figure S3. CD4^{Cre} mediated excision of IL-6Ra on different renal leukocyte subsets

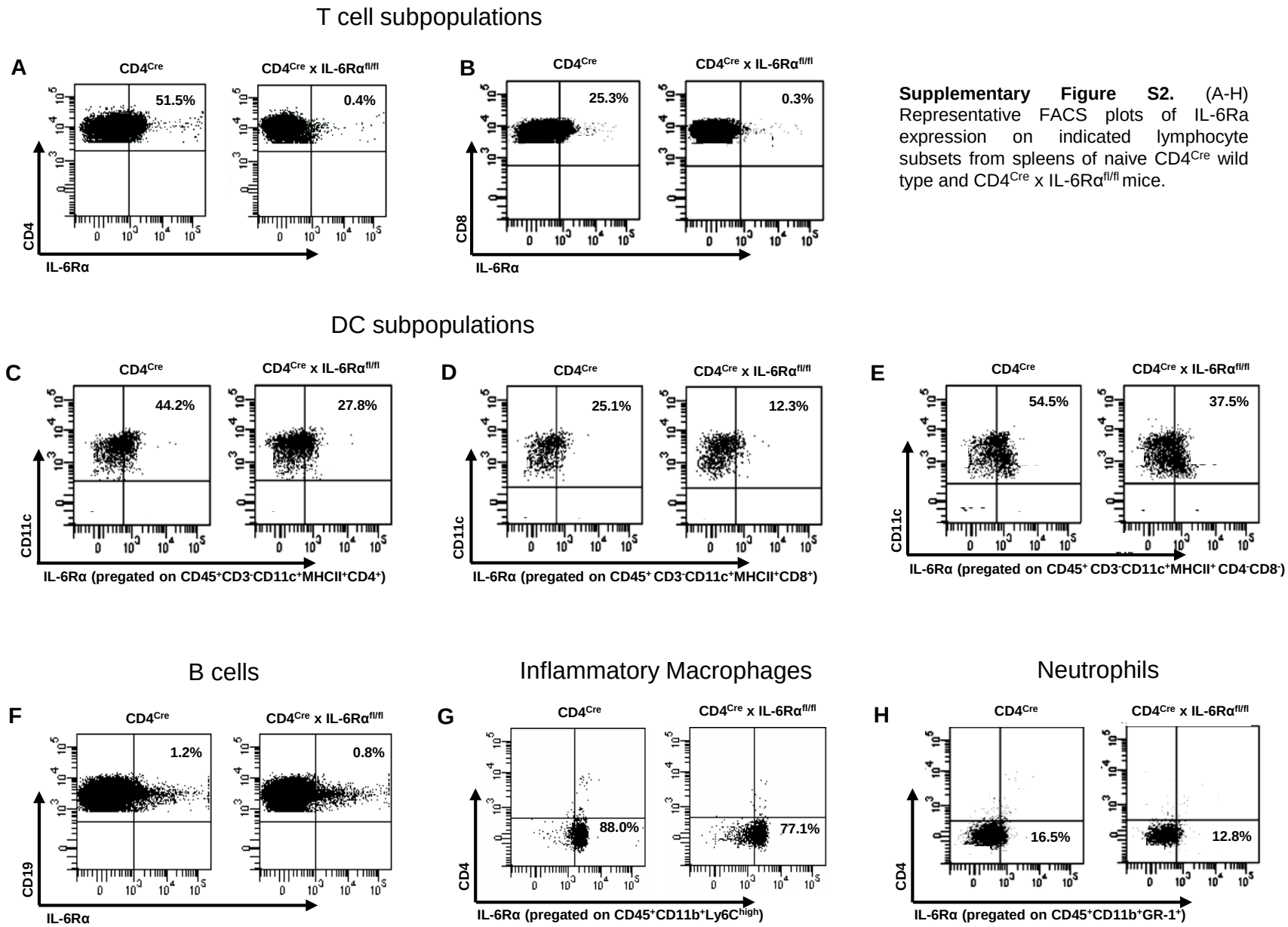
Supplementary Figure S4. Renal T cell responses in recipients of IL-6Ra$^{-/-}$ whole CD4^{+} T cells after NTN induction

Supplementary Figure S5. Systemic Treg percentages remain unaffected by IL-6Ra deficiency and in IL-6$^{-/-}$ mice

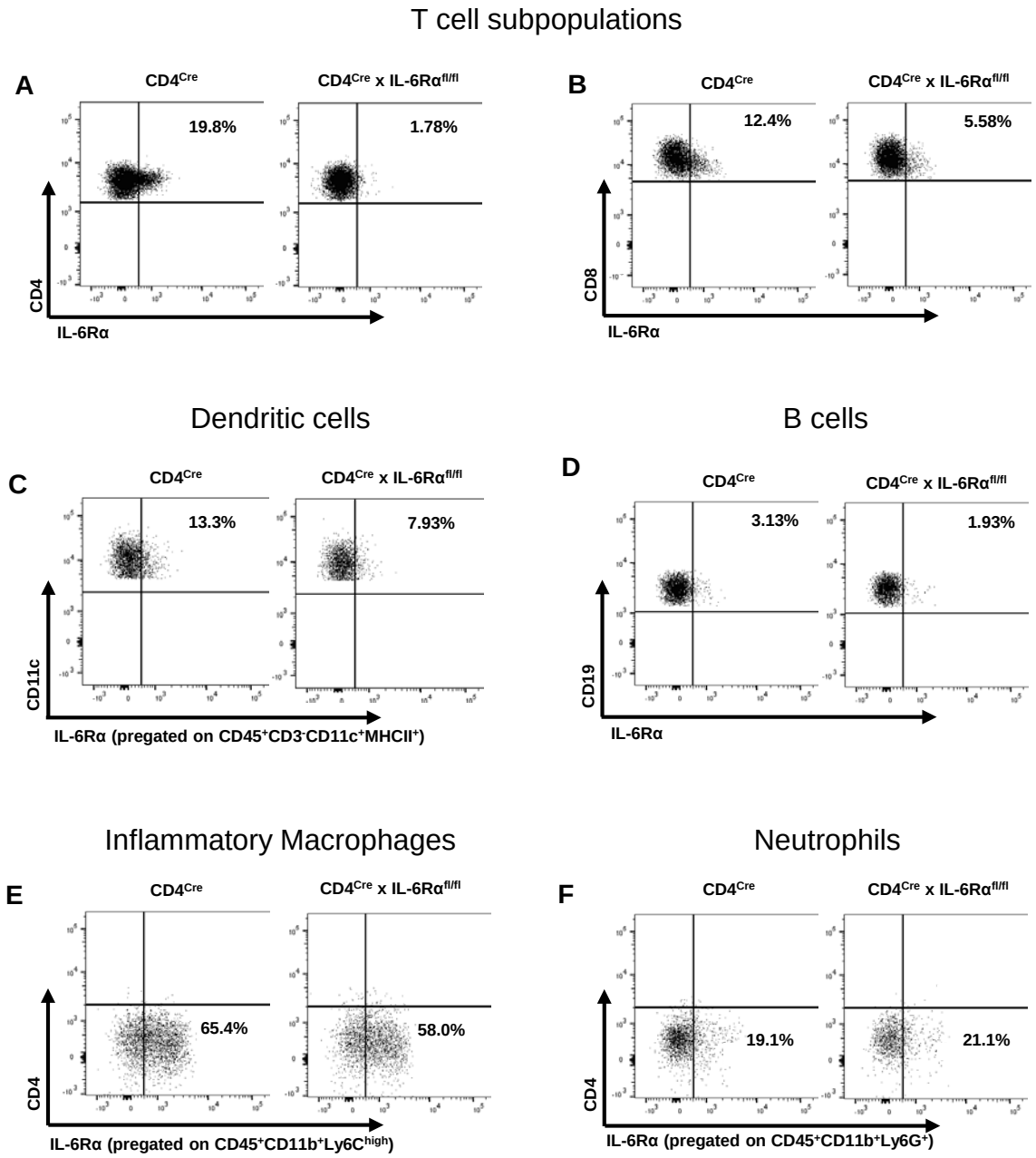
Supplementary Figure S6. Th17 responses are unchanged in nephritic mice after transfer of IL-6Ra$^{-/-}$ Tregs



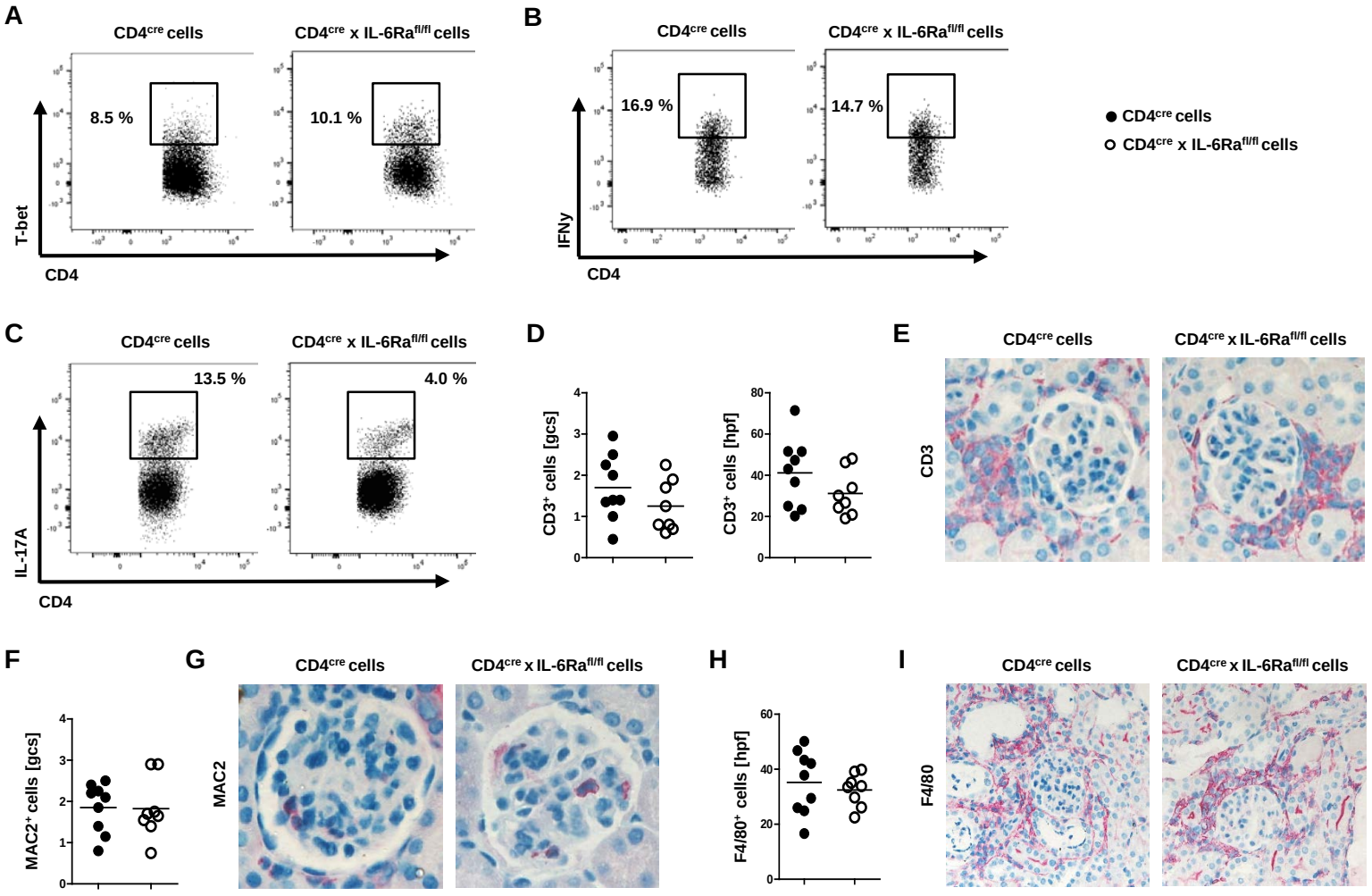
Supplementary Figure S1. (A) FACS analysis of IL-6Ra expression on indicated lymphocyte subsets from spleens of naive mice. (B) Representative FACS plot of IL-6Ra expression (left) and isotype control (right) on naive splenic $CD4^+$ T cells.



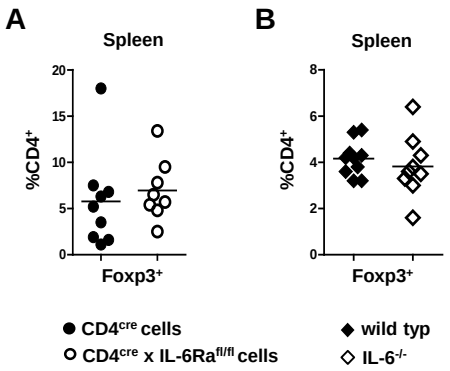
Supplementary Figure S2. (A-H) Representative FACS plots of IL-6Ra expression on indicated lymphocyte subsets from spleens of naive $CD4^{Cre}$ wild type and $CD4^{Cre}$ x IL-6R$\alpha^{fl/fl}$ mice.



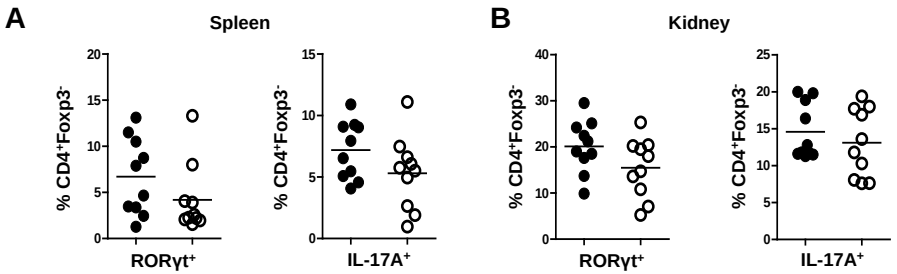
Supplementary Figure S3. (A-F) Representative FACS plots of IL-6Ra expression on indicated lymphocyte subsets from kidneys of naive $CD4^{Cre}$ wild type and $CD4^{Cre}$ x $IL\text{-}6R\alpha^{fl/fl}$ mice.



Supplementary Figure S4. (A-C) Representative FACS plots of renal (A) T-bet (B) IFNγ and (C) IL-17A expressing $CD4^+$ Teff of the indicated recipient groups. (D) Quantification of renal glomerular and interstitial infiltration of $CD3^+$ T cells. (E) Representative immunohistology of renal $CD3^+$ T cells (red) of the indicated groups. (F) Quantification of infiltrating glomerular $MAC2^+$ macrophages. (G) Representative immunohistology of glomerular $MAC2^+$ macrophages (red) of the indicated groups. (H) Quantification of infiltrating interstitial $F4/80^+$ Macrophages. (I) Representative immunohistology of interstitial $F4/80^+$ macrophages (red) of the indicated groups.



Supplementary Figure S5. FACS analyses of splenic Tregs from (A) nephritic Rag1$^{-/-}$ recipients of the indicated whole CD4^{+} T cell populations and (B) nephritic wild type and IL-6$^{-/-}$ mice.



Supplementary Figure S6. FACS analyses of Th17 cells by quantification of RORγt activation and secretion of IL-17A as indicated in (A) spleens and (B) kidneys.

Amphiregulin Aggravates Glomerulonephritis *via* Recruitment and Activation of Myeloid Cells

Simon Melderis,[1] Julia Hagenstein,[1] Matthias Tobias Warkotsch,[1] Julien Dang,[2] Georg Rudolf Herrnstadt,[1] Christoph Benjamin Niehus,[1] Katrin Neumann,[4] Ulf Panzer,[1] Carmen Berasain,[5] Matias A. Avila,[5] Pierre-Louis Tharaux,[2] Gisa Tiegs,[4] and Oliver M. Steinmetz[1]

[1]III. Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany
[2]Paris Cardiovascular Center (PARCC), Inserm, Université de Paris, F-75015 Paris, France
[4]Institute for Experimental Immunology and Hepatology, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Germany
[5]Program of Hepatology, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), University of Navarra, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) and Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona, Spain

ABSTRACT

Background Recent studies have identified the EGF receptor (EGFR) ligand amphiregulin (AREG) as an important mediator of inflammatory diseases. Both pro- and anti-inflammatory functions have been described, but the role of AREG in GN remains unknown.

Methods The nephrotoxic nephritis model of GN was studied in AREG$^{-/-}$ mice after bone marrow transplantation, and in mice with myeloid cell–specific EGFR deficiency. Therapeutic utility of AREG neutralization was assessed. Furthermore, AREG's effects on renal cells and monocytes/macrophages (M/M) were analyzed. Finally, we evaluated AREG expression in human renal biopsies.

Results Renal AREG mRNA was strongly upregulated in murine GN. Renal resident cells were the most functionally relevant source of AREG. Importantly, the observation that knockout mice showed significant amelioration of disease indicates that AREG is pathogenic in GN. AREG enhanced myeloid cell responses *via* inducing chemokine and colony stimulating factor 2 (CSF2) expression in kidney resident cells. Furthermore, AREG directly skewed M/M to a proinflammatory M1 phenotype and protected them from apoptosis. Consequently, anti-AREG antibody treatment dose-dependently ameliorated GN. Notably, selective abrogation of EGFR signaling in myeloid cells was sufficient to protect against nephritis. Finally, strong upregulation of AREG expression was also detected in kidneys of patients with two forms of crescentic GN.

Conclusions AREG is a proinflammatory mediator of GN *via* (*1*) enhancing renal pathogenic myeloid cell infiltration and (*2*) direct effects on M/M polarization, proliferation, and cytokine secretion. The AREG/EGFR axis is a potential therapeutic target for acute GN.

JASN 31: ●●●–●●●, 2020. doi: https://doi.org/10.1681/ASN.2019111215

The EGF receptor (EGFR) pathway is crucially involved in a multitude of cellular processes, such as cell cycle, growth, and differentiation. Given its highly potent effects, agents blocking the EGFR have been established as therapeutics for the treatment of various human malignancies. Recent studies, however, have indicated that targeting the EGFR axis might be used beyond tumor therapy. Treatment with the EGFR-blocking tyrosine kinase

Received November 25, 2019. Accepted May 1, 2020.

S.M. and J.H. contributed equally to this work.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Oliver M. Steinmetz, III. Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany. Email: o.steinmetz@uke.de

Copyright © 2020 by the American Society of Nephrology

inhibitor erlotinib ameliorated immune-mediated experimental arthritis.[1] Also, in the renal field, evidence for an important pathophysiologic role of the EGFR signaling cascade is accumulating.[2,3] In particular, deficiency of the EGFR ligand HB-EGF was shown to protect from renal tissue injury in acute GN.[4] Interestingly, selective abrogation of EGFR signaling in podocytes only resulted in significant reduction of glomerular crescent formation. Most importantly, however, ligand and cell-type nonspecific blockade of the EGFR pathway also strongly ameliorated GN.[4] Along the same line, pan-EGFR signaling blockade was shown to ameliorate renal fibrosis,[5–8] murine diabetic nephropathy,[9] and lupus nephritis in the Fcgr2b$^{-/-}$ model.[10] Finally, enhancement of EGFR activity by a naturally occurring mutation resulted in spontaneous development of glomerulopathy.[11]

Which of the seven known EGFR ligands, apart from HB-EGF, is involved in the individual disease pathogenesis in these models has remained largely unclear. In this respect, amphiregulin (AREG) is of particular interest.[12] A number of recent landmark studies have highlighted several unique roles of AREG among the EGFR ligands. Initially, a proinflammatory role was postulated. Overexpression of AREG in keratinocytes resulted in skin inflammation, resembling human psoriasis.[13] Later, AREG expression was found to be elevated in various tissues from patients with rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. Mechanistically, it was demonstrated that AREG stimulated synoviocytes and salivary gland cells to express proinflammatory mediators.[14,15] Moreover, a strong profibrotic role of AREG was identified in a model of liver fibrosis.[16] Along the same line, AREG was shown to be secreted by tubule cells from kidneys of patients with varying renal diseases. Importantly, the degree of AREG expression correlated with renal fibrosis, and urinary AREG levels were enhanced in patients with acute or chronic kidney injury.[17] A very recent study by the same authors, published during preparation of our manuscript, also provided functional *in vivo* evidence for a profibrotic role of AREG. Cell-specific abrogation of AREG secretion from proximal tubule cells resulted in amelioration of renal fibrosis in the unilateral ureteral obstruction and ischemia reperfusion injury models.[18] In stark contrast to these proinflammatory and disease-aggravating effects, AREG seems to possess additional tissue-protective functions.[19]

Interestingly, AREG was recently found to be secreted by activated regulatory T cells (Tregs). Treg-derived AREG, however, did not contribute to their immune regulatory functions, but rather mediated tissue repair across pathologies of various organs.[20–23] This tissue-protective AREG effect seems to be more general in nature and somewhat independent of the leukocyte source. Similar to Treg-derived AREG, secretion by ILC2s (group 2 innate lymphoid cells) was shown to enhance tissue regeneration in models of colitis[24] and acute ischemic renal injury.[25] In addition, AREG derived from macrophages mediated protective effects in chronic volume overload triggered experimental heart failure[26] and lung and liver injury.[27] Furthermore, AREG seems to be a central player in defense against helminth infections. Several studies could demonstrate unique roles of the AREG/EGFR axis in enhancing Th2 responses.[28,29] This might also be relevant for immune-mediated diseases, in which Th2 immunity is either aggravating, as in asthma, or protective, as in many forms of acute GN. Finally, it has been shown that during inflammation, Tregs upregulate expression of the EGFR and ligation of AREG potently enhances their immunosuppressive capacity.[30–34] Similarly, it has been shown that stabilization of EGFR expression on Tregs by the long noncoding RNA lnc-EGFR improves their suppressive function.[35] This might be of particular importance for GN because Tregs are central mediators of renoprotection.[36–42] In summary, both pro- and anti-inflammatory, as well as tissue-reparative roles for AREG have been described. However, no data exist so far about the *in vivo* relevance and functions of AREG in GN. We thus aimed to address this aspect, particularly with regards to AREG/EGFR blockade as a potential therapeutic strategy.

Significance Statement

The EGF receptor (EGFR) ligand amphiregulin (AREG) has emerged as a potent mediator of inflammation. AREG's tissue-protective and immunosuppressive properties have recently received much attention, but the ligand has another function. In a mouse model of GN, AREG plays an unexpectedly strong proinflammatory rather than protective role. Renal resident cells that secrete AREG enhance the recruitment, proliferation, and activation of tissue-destructive myeloid cells. Importantly, studies in human crescentic GN also revealed strong upregulation of renal AREG expression, indicating clinical relevance of the murine model. These findings contribute to a more balanced understanding of AREG's biology and help with the selection of patients and timing of AREG/EGFR-directed therapies.

METHODS

Animals

AREG$^{-/-}$ mice (B6.129P2-Areg^{tm1Dle}) were originally obtained from M.A.A. (Pamplona, Spain).[43] LoxP site-flanked EGFR$^{fl/fl}$ mice [B6(Cg)-Egfr^{tm1Dwt}] were provided by P.-L.T. (Paris, France).[44] Monocytes/macrophages (M/M)-specific deletion of the EGFR was achieved by crossbreeding with mice expressing LysM-driven Cre recombinase [B6.129P2-Lyz2$^{tm1(cre)Ifo/J}$]. Specificity of the EGFR knockout on M/M was tested by PCR analysis of genomic DNA and mRNA, prepared from FACS-sorted peritoneal macrophages and T cells (primer sequences available upon request). All mice were on a C57BL/6J background and bred in our facility under specific pathogen-free conditions.

Animal Experiments and Functional Studies

Nephrotoxic nephritis (NTN) was induced in the indicated strains of mice by a single intraperitoneal injection of nephrotoxic sheep serum. Renal and splenic leukocytes were isolated at the indicated time points, as described below, and

analyzed by FACS. Urine samples were collected after housing the mice in metabolic cages. Albuminuria was determined by standard ELISA (Bethyl Laboratories). BUN and urinary creatinine were quantified using standard laboratory methods.

For bone marrow transplantation, 9-week-old mice were irradiated with 9Gy. Donor bone marrow cells were isolated as described previously.[45] In brief, femoral and humeral bones were dissected and flushed with PBS. Cells were filtered through a 40-μm mesh and washed by centrifugation at 300×*g*. In total, 1×10^7 cells were injected into the tail veins of the recipient mice 12 hours after irradiation. NTN was induced 7 weeks after transplantation. For neutralization studies, the accelerated nephrotoxic nephritis model (aNTN) was used. C57BL/6 mice were preimmunized with 0.5 mg sheep IgG in CFA. Five days later, aNTN was induced and anti-AREG (AF989; R&D Systems, Wiesbaden, Germany) or isotype antibodies (AB-108-C; R&D Systems) were intraperitoneally injected at the indicated dose and time points. Organs were removed at day 5 after aNTN induction. Animal experiments were performed according to national and institutional animal care and ethical guidelines and were approved by local committees (approval codes 96/16, 67/17, and 065/2018).

Murine Morphologic Studies

Crescent formation and glomerular necrosis were determined in a minimum of 50 glomeruli per mouse in 2-μm-thick kidney sections stained with periodic acid–Schiff, in a blinded manner. Semiquantitative analysis of tubulointerstitial damage, using a score of 0–4, was performed using 20 randomly selected cortical areas (×200) as published previously.[46] Hematoxylin and eosin staining was performed according to standard methods for detection of eosinophil granulocytes. Paraffin-embedded sections were stained with antibodies directed against CD3 (A0452; Dako, Hamburg, Germany), F4/80 (BM8; BMA Biomedicals, Hiddenhausen, Germany), MAC-2 (M3/38; Cedarlane-Laboratories, Burlington, ON, Canada), Foxp3 (FJK-16s; eBiosciences, San Diego, CA), or GR-1 (NIMP-R14; Hycult Biotech, Uden, The Netherlands), and developed with a polymer-based secondary antibody alkaline phosphatase kit (POLAP; Zytomed, Berlin, Germany). Positive cells in 50 glomerular cross-sections and 20 tubulointerstitial high-power fields (magnification ×400) per kidney section were counted in a blinded fashion.

Analyses of Human Renal Biopsy Specimens

Immunostaining of human tissue was performed in 3-μm formalin–acetic acid–alcohol fixed and paraffin-embedded tissue sections of kidney biopsies. Briefly, after dewaxing and rehydration, the sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody rabbit anti-AREG (HPA008720, 1:1000; Atlas Antibodies). Sections were then incubated with polymer-based peroxidase-conjugated antibody (Histofine; Nichirei Biosciences). Staining was revealed with 3,3′-diaminobenzidin (DAB), and counterstained with hematoxylin and eosin. Human renal tissue specimens were obtained from the Pathology Department of Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France. Human tissue was used after obtaining informed consent from all patients, and kidney biopsy collection was approved by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Ethics Committee (Institutional Review Board 00003888, approval 13-087; FWA00005831 National Institutes of Health, Office of Human Research Protection) and the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ile de France IV, Institutional Review Board: 00003835. approval 2015/73NICB). Kidney biopsy specimens were collected in compliance with all relevant ethical regulations, and those with sufficient tissue for immunohistochemical evaluation after the completion of diagnostic workup were included. In total, four biopsy specimens from patients with Goodpasture syndrome and four biopsy specimens from patients with ANCA vasculitis (three microscopic polyangiitis, one granulomatous polyangiitis) were stained. Three control kidneys were obtained from patients who presented with kidney failure, without proteinuria or sediment abnormalities, with a biopsy showing no evidence for glomerular and vascular lesions nor abnormal inflammatory infiltration, and with <10% of interstitial fibrosis.

Isolation of Leukocytes from Various Tissues

Spleens were harvested in HBSS and passed through 70-μm nylon meshes. After lysis of erythrocytes with ammonium chloride, cells were washed and passed through 40-μm meshes. Kidneys were minced and incubated in digestion medium (RPMI 1640 medium containing 10% FCS [Gibco], 1% HEPES, 1% penicillin/streptomycin [Life Technologies, Karlsruhe, Germany], 8 μg/ml collagenase D, and 0.4 μg/ml DNase) at 37°C for 45 minutes. Tissues were then dissociated, using the gentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec) to get a single-cell suspension and were centrifuged at 300×*g* at 4°C for 8 minutes. To further purify the cells, Percoll gradient (37% Percoll; GE Healthcare, Chalfont St Giles, United Kingdom) centrifugation was performed at 500×*g* at room temperature for 20 minutes. Peripheral blood was drawn into EDTA-coated tubes and red blood cell lysis was performed. Peritoneal macrophages were isolated as described previously.[45] Briefly, the peritoneal cavity was lavaged with PBS, 3 days after 1 ml intraperitoneal thioglycollate (Sigma, Steinheim, Germany) injection. Cells were passed over a 40-μm mesh, washed by centrifugation at 300×*g* for 5 minutes, and resuspended in RPMI 1640 L-glutamine medium (Life Technologies) containing 1% penicillin/streptomycin, 1% HEPES, 10% FCS, and 50 ng/ml M-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ). After all isolation procedures, cells were counted and prepared for FACS or culture.

Flow Cytometry

Cells were surface-stained for 30 minutes at 4°C with fluorochrome-labeled antibodies against CD45, CD4, CD11c (all BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), CD3, CD8, CD19, Ly6C, Ly6G, CD11b, CCR2, CD206 (BioLegend, San Diego,

CA). For intracellular and nuclear staining, samples were processed, using a commercial nuclear staining Kit (Foxp3 staining kit; eBiosciences). Fluorochrome-labeled antibodies against IL-4, IL-13, IL-17, IFNγ, and Foxp3 (eBiosciences) were used. For intracellular cytokine staining, cells were activated with PMA (50 ng/ml; Sigma-Aldrich), ionomycin (1 μg/ml; Calbiochem-Merck, Darmstadt, Germany), and brefeldin A (10 μg/ml; Sigma-Aldrich) for 3.5 hours. LIVE/DEAD staining (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon) was used to exclude dead cells. FACS sorting was performed from single-cell suspensions of spleens and peritoneum by the Institutional FACS Sorting Core Facility.

Mesangium and Tubule Cell Culture

Mouse kidney proximal tubule cells derive from a cell line, which was initially generated by microdissection from mouse proximal tubules and subsequent immortalization by transformation with SV-40 virus.[47] Mouse kidney mesangial cells were initially prepared from mouse glomeruli by differential sieving and digestion techniques, followed by immortalization *via* transformation with SV-40 virus.[48] Cells were cultured in DMEM medium (Life Technologies) containing 10% FCS, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin at 37°C with 5% CO_2. The cells were incubated in serum-free DMEM medium 24 hours before stimulation. Cells were stimulated with AREG (10–100 ng/ml, 989-AR; R&D Systems), HB-EGF (10–100 ng/ml, SRP6050; Sigma), EGF (30–100 ng/ml, 2028-EG-200; R&D Systems), IL-1β (10 ng/ml, 211–11B), IL-6 (100 U/ml, 216–16), IFNγ (100 ng/ml), IL-17A (10 ng/ml), IL-17F (10 ng/ml), IL-17C (10 ng/ml), TNFα (10 ng/ml, 315–01A), and IL-22 (100 ng/ml) (all Peprotech), alone or with a combination. For AREG/EGFR neutralization experiments, 1.5 μg/ml anti-AREG (AF989), 1.5 μg/ml isotype control (AB-108-C, R&D Systems), or 1 μM erlotinib (Selleckchem, Houston, TX) was added to the culture. Cells were harvested after 6 hours of stimulation and cDNA was prepared for PCR analyses. For assessment of AREG protein secretion, cells were incubated with 50 ng/ml AREG for 6 hours, then the supernatant was carefully removed and cells were washed twice in PBS. After a further 20 hours of incubation in AREG-free medium, levels of AREG protein in the supernatant were determined by standard ELISA (R&D Systems), according to the manufacturer's instructions.

Macrophage Apoptosis

Peripheral blood from naïve transgenic and control mice was drawn into EDTA-coated tubes and prepared for FACS staining. Cell surface and LIVE/DEAD staining was performed before the staining of phosphatidylserine with fluorochrome-labeled annexin V (BioLegend), according to the manufacturer's protocol.

Macrophage Phagocytosis Studies

Thioglycollate-induced peritoneal M/M were isolated as described above and seeded in cell culture dishes (1×10^6 cells/ml) for 2 hours at 37°C and 5% CO_2. Cells were washed with PBS and adherent cells were harvested. For assessment of phagocytosis, macrophages were stimulated with or without 50 ng/ml AREG in the presence of FITC-labeled latex beads (LB30–1m; Sigma) for 48 hours at 37°C and 5% CO_2 (cell-to-bead ratio of 1:5). Phagocytosis, as indicated by FITC fluorescence of macrophages, was quantified by flow cytometry.

In Vitro M/M Proliferation and Cytokine Expression

For proliferation experiments, 1 ml of macrophage culture was plated at a concentration of 3.3×10^4/ml on a six-well plate. Cells were cultivated in a humidified incubator with 5% CO_2 at 37°C. Colony formation in the presence of AREG, TNFα, HB-EGF, or EGF was evaluated after 5 or 6 days, as indicated. Analysis was performed by counting CFUs, cells per CFU, and cells per well. CFUs were determined as a group of cells with direct cell–cell contacts or a distance of less than one cell in width and a total number of more than three cells. For macrophage cytokine expression analyses, cells were seeded at a concentration of 5×10^5/ml on a 24-well plate with or without AREG, HB-EGF, or EGF at the indicated concentrations, and the supernatant was harvested after 24 hours. In the case of exogenous AREG supplementation, cells from AREG$^{-/-}$ mice were repetitively stimulated with 50 ng/ml AREG at 0, 4, and 20 hours and the supernatant was harvested at 24 hours. IL-1β was quantified by ELISA (BioLegend), according to the manufacturer's instructions. For assessment of AREG protein secretion, cells were incubated with 50 ng/ml AREG for 6 hours, then the supernatant was carefully removed and cells were washed twice in PBS. After further 20 hours of incubation in AREG-free medium, levels of AREG protein in the supernatant were determined by standard ELISA (R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. For assessment of M1 differentiation, M/M were *in vitro*–stimulated for 48 hours, with or without 50 ng/ml AREG, in the presence or absence of 50 ng/ml LPS and subsequently analyzed for Ly6C expression by FACS.

Real-Time Quantitative PCR

Total RNA of renal cortex, spleens, mesangium, and tubule cells or FACS-sorted leukocyte populations was isolated according to a standard TRIzol protocol and purified by utilizing a NucleoSpin kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Real-time PCR was performed in duplicate for each sample (all primer sequences available upon request), using the SYBR green method. Results were normalized to expression of 18S rRNA, using the ΔCT method. For comparison with baseline levels, the $\Delta\Delta$CT method was applied.

Statistical Analyses

Results are expressed as mean±SEM. The *t* test was used for comparison between two groups. In case of three or more groups, one-way ANOVA was used, followed by a *post hoc*

analysis with the Tukey test for multiple comparisons or Dunnett test for comparisons of all time points versus control. A P value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

AREG Is Expressed by Renal Resident Cells and Upregulated during NTN

In order to evaluate the potential role of the EGFR axis during acute renal inflammation, we first studied expression of its seven ligands during NTN. Although some showed homeostatic (HB-EGF, TGFα, betacellulin) or reduced expression (EGF), only renal AREG mRNA was strongly upregulated (Figure 1A, Supplemental Figure 1A). In naïve kidneys, we found very low AREG expression. During NTN, however, levels massively increased, peaking at days 7–10. Afterward, expression decreased again and reached steady-state conditions (Figure 1A). An overview of the renal expression of the seven EGFR ligands is shown in Figure 1B. In line with the massive induction of renal mRNA expression, we also found serum levels of soluble AREG protein to be increased at days 7 and 10 of NTN (Figure 1C). We next examined splenic mRNA, but found no relevant expression of AREG or regulation of any of the other EGFR ligands during NTN (Supplemental Figure 1B). Given that during NTN AREG was selectively upregulated in the kidney but not in the spleen, we hypothesized that resident renal cells might be the source, which would be in line with recent observations.[17,18] In order to analyze this aspect, we started off by studying regulation of AREG expression in two prototypical renal cell populations. Interestingly, *in vitro* stimulation of mouse mesangium (mMC) and mouse proximal tubule (mPTC) cells with various cytokine mediators known to be important in NTN did not induce AREG mRNA transcription (Supplemental Figure 2, A–C). However, both cell types expressed high levels of AREG mRNA and protein (Figure 1, D–G) in response to stimulation with AREG itself, indicating a positive feed-forward loop. Expression of the EGFR in whole kidney tissue as well as mMC and mPTC was confirmed by quantitative RT-PCR (Supplemental Figure 2, D and E). Addition of an anti-AREG antibody or the tyrosine kinase inhibitor erlotinib both effectively abrogated AREG self-induced expression of AREG mRNA, confirming signaling *via* the AREG/EGFR pathway (Supplemental Figure 3, A and B). Extensive testing of multiple further cytokine combinations revealed that addition of TNFα to AREG augmented AREG mRNA transcription even more (Supplemental Figure 3B). Given that the expression profile of AREG was unique among all EGFR ligands, we obtained knockout mice ($AREG^{-/-}$) to further study AREG's role in NTN. Complete absence of AREG was confirmed by quantitative RT-PCR analyses of nephritic renal tissue. Among all

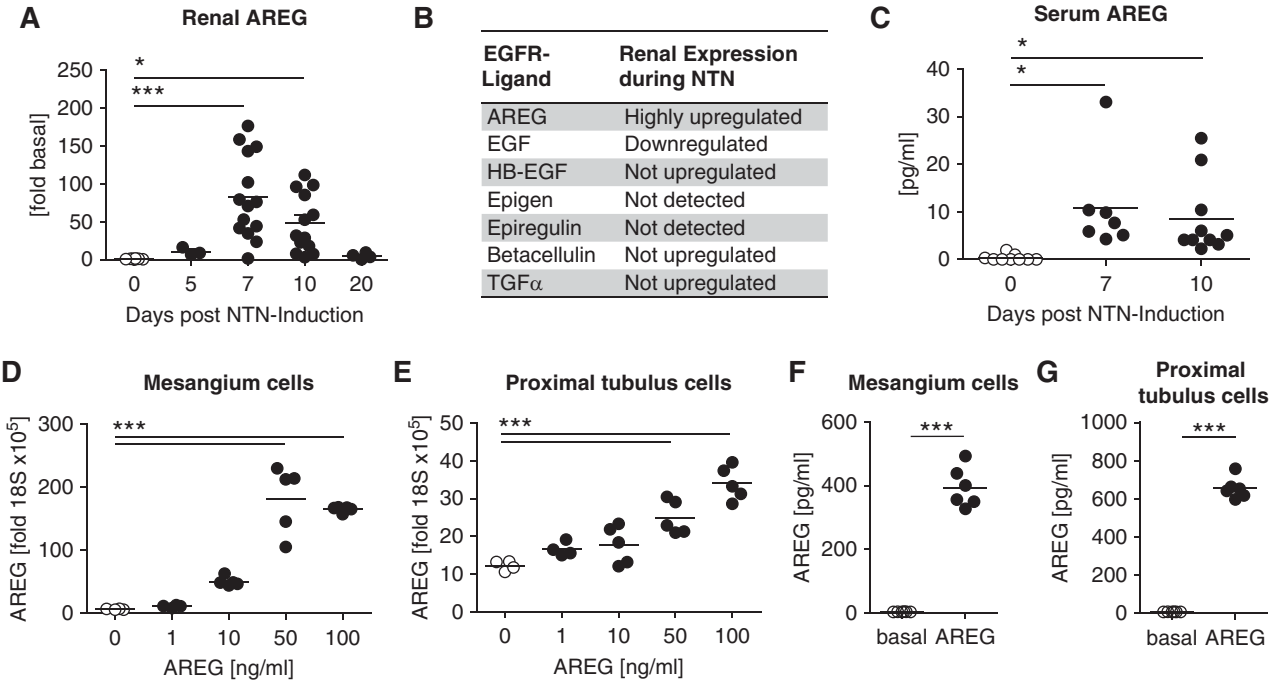


Figure 1. AREG is expressed by renal resident cells and upregulated during NTN. (A) Time course of renal AREG mRNA expression after induction of NTN relative to baseline levels. (B) Overview of renal mRNA expression of the seven known EGFR ligands during NTN. (C) ELISA analyses of soluble AREG protein in the serum at the indicated time points of NTN. (D and E) AREG mRNA expression by cultured (D) mesangial and (E) proximal tubule cells after 6 hours of *in vitro* stimulation with AREG at the indicated concentrations. (F and G) Levels of soluble AREG protein in the supernatant of cultured (F) mesangial and (G) proximal tubule cells, 20 hours after initial 6-hour *in vitro* stimulation with AREG. Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. *$P<0.05$; ***$P<0.001$.

other EGFR ligands, we found only renal EGF expression to be mildly but significantly upregulated in AREG$^{-/-}$ mice, compared with wild-type controls during NTN (Supplemental Figure 4A). Splenic expression of all EGFR ligands was again low and no differences compared with wild-type mice were noted (Supplemental Figure 4B).

AREG Deficient Mice Are Protected from NTN

Because recent studies have suggested broad anti-inflammatory and tissue protective properties, we aimed to examine AREG's functional role in NTN. Surprisingly however, our analyses at days 7 and 10 showed markedly reduced glomerular crescent formation and interstitial damage (Figure 2, A–C) in AREG$^{-/-}$ mice. In addition, albuminuria (Figure 2D) and BUN (Figure 2E) levels were also significantly lower at both time points, as compared with wild-type controls. Taken together, this demonstrates significant protection from renal histologic and functional injury in AREG$^{-/-}$ mice, indicating a pathogenic rather than protective role for AREG in acute GN.

AREG$^{-/-}$ Mice Show Reduced Renal Myeloid Cell Infiltration and Activation in NTN

We next examined the effect of AREG knockout on renal inflammatory cell infiltration and systemic immunity in NTN. Renal T cell infiltration was not consistently affected and only a mild glomerular reduction at day 7 could be found (Supplemental Figure 5, A–C). However, in the kidneys and also systemically, T cells from AREG$^{-/-}$ mice showed increased production of proinflammatory cytokines (Supplemental Figure 5, D and E). Because this phenomenon could not account for the observed amelioration of renal injury, we looked for further immune alterations, which might overrule the effects of enhanced T cell activation. Renal infiltration of eosinophil granulocytes, another leukocyte population known to be influenced by AREG, was not different between the groups (Supplemental Figure 6, A and B). Interestingly, however, at both 7 and 10 days of NTN, numbers of infiltrating neutrophils were lower in AREG$^{-/-}$ mice (Figure 3, A–C). Similarly, renal glomerular, as well as interstitial M/M infiltration was significantly reduced (Figure 3, D–G). Notably, M/M were not only reduced numerically in AREG$^{-/-}$ mice, but also showed a less inflammatory phenotype with skewing toward M2 polarization. In this regard, we found that renal mRNA expression of the proinflammatory macrophage-secreted cytokine IL-1β was significantly diminished in AREG$^{-/-}$ mice (Figure 3H). Furthermore, our analyses showed reduced proportions of renal Ly6C^{hi} inflammatory M/M (Figure 3, I and J) at both time points. Conversely, M2 characteristic Mannose receptor/CD206 expression on renal M/M was significantly increased in the absence of AREG (Figure 3K, Supplemental Figure 7A). Interestingly, this skewing toward an M2 phenotype was restricted to M/M in the kidney. In contrast, M/M in blood and spleens of AREG$^{-/-}$ mice showed enhanced M1 polarization (Supplemental Figure 7, B and C).

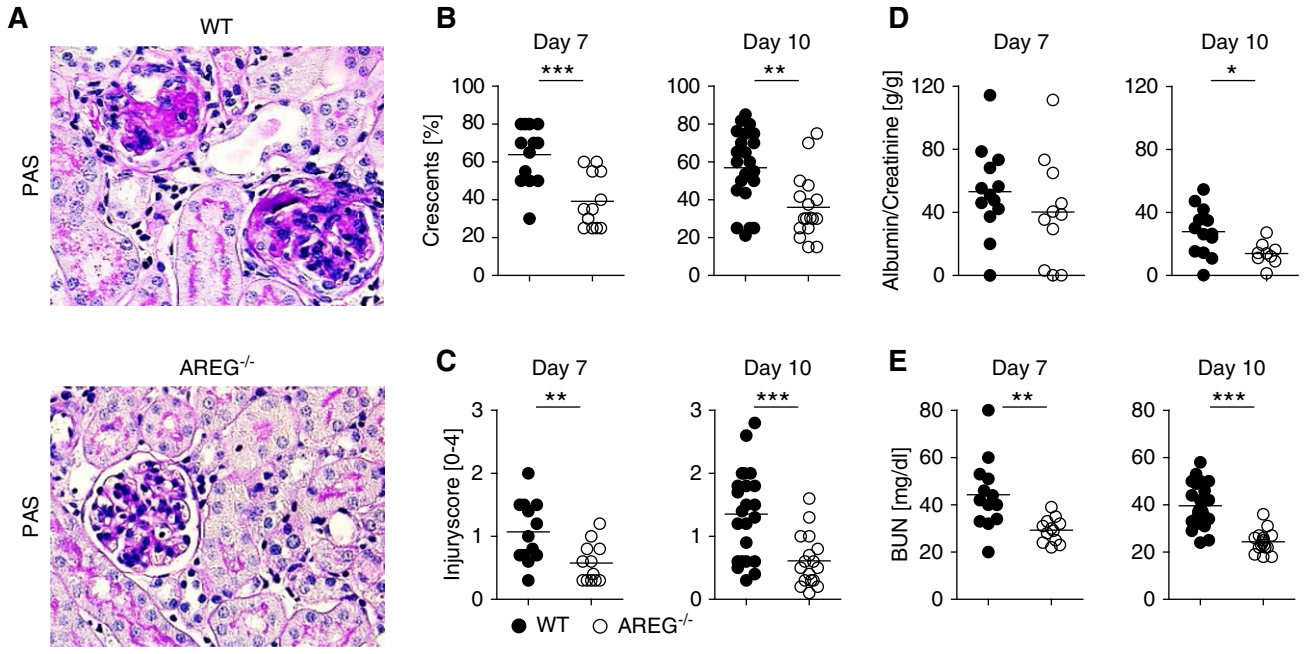


Figure 2. AREG-deficient mice are protected from NTN. (A) PAS-stained sections of nephritic kidneys from the indicated strains of mice at day 10 of NTN (original magnification ×400). (B and C) Quantification of (B) glomerular crescents and (C) interstitial injury at the indicated time points after NTN. (D) Albumin-creatinine ratio in the urine of indicated mouse strains at days 7 and 10 of NTN. (E) BUN levels of indicated mouse strains at 7 and 10 days after NTN induction. Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. PAS, periodic acid–Schiff; WT, wild-type.

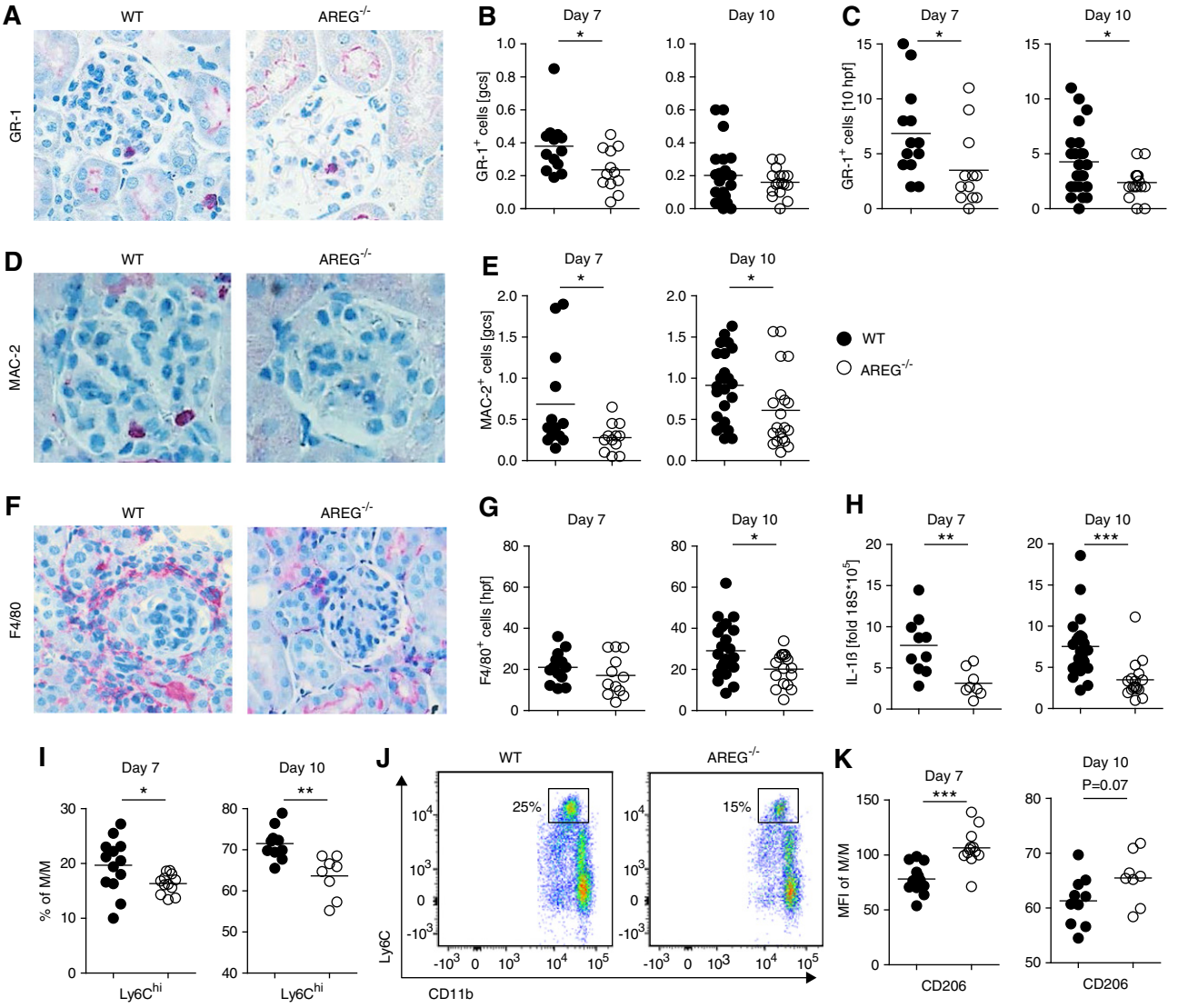


Figure 3. AREG$^{-/-}$ mice show reduced renal myeloid cell infiltration and activation in NTN. (A) Immunohistochemical staining of GR-1^{+} polymorphonuclear neutrophils (PMN) in kidneys of nephritic mice. (B and C) Quantification of (B) glomerular and (C) interstitial PMN infiltration at the indicated time points after NTN. (D) Immunohistochemical staining of glomerular MAC-2^{+} M/M in kidneys of nephritic mice. (E) Quantification of glomerular M/M infiltration at the indicated time points after NTN. (F) Immunohistochemical staining of interstitial F4/80^{+} M/M in kidneys of nephritic mice. (G) Quantification of interstitial M/M infiltration at the indicated time points after NTN. (H) Semiquantitative analysis of renal IL-1β mRNA expression by real-time quantitative PCR at the indicated time points after NTN. (I) FACS quantification of renal Ly6C^{high} inflammatory M/M at the indicated time points after NTN. (J) Representative FACS plot of renal Ly6C^{high} M/M at day 7 of NTN. (K) Mean fluorescence intensity (MFI) of Mannose receptor/CD206 expression on renal M/M at the indicated time points after NTN (original magnification ×400). Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. gcs, glomerular cross section; hpf, high-power field; WT, wild-type.

AREG Induces Myeloid Cell–Attracting Chemokines and Colony Stimulating Factor 2 from Resident Renal Cells

To investigate the mechanisms underlying reduced renal myeloid cell infiltration in AREG$^{-/-}$ mice, we examined renal chemokine production. Indeed, we found significantly diminished renal expression of the neutrophil-attracting CXCL1 and CXCL5, as well as of the macrophage-attracting chemokine MCP-1/CCL2 (Figure 4A). To delineate whether this was a direct effect of AREG, we measured production of these chemokines from *in vitro*–stimulated resident renal cells. AREG by itself had no effect on expression of chemokines from mMC or mPTC. Because it was reported that TNFα enhances AREG's effects on human tubule cells,[17] we tested this combination. Indeed, simultaneous stimulation potently induced CXCL1 and CCL2 transcription by mMC (Figure 4B) and CXCL1, CXCL5, and CCL2 by mPTC (Figure 4C). The observed enhancement of chemokine production was a specific effect of AREG signaling because upregulation could be

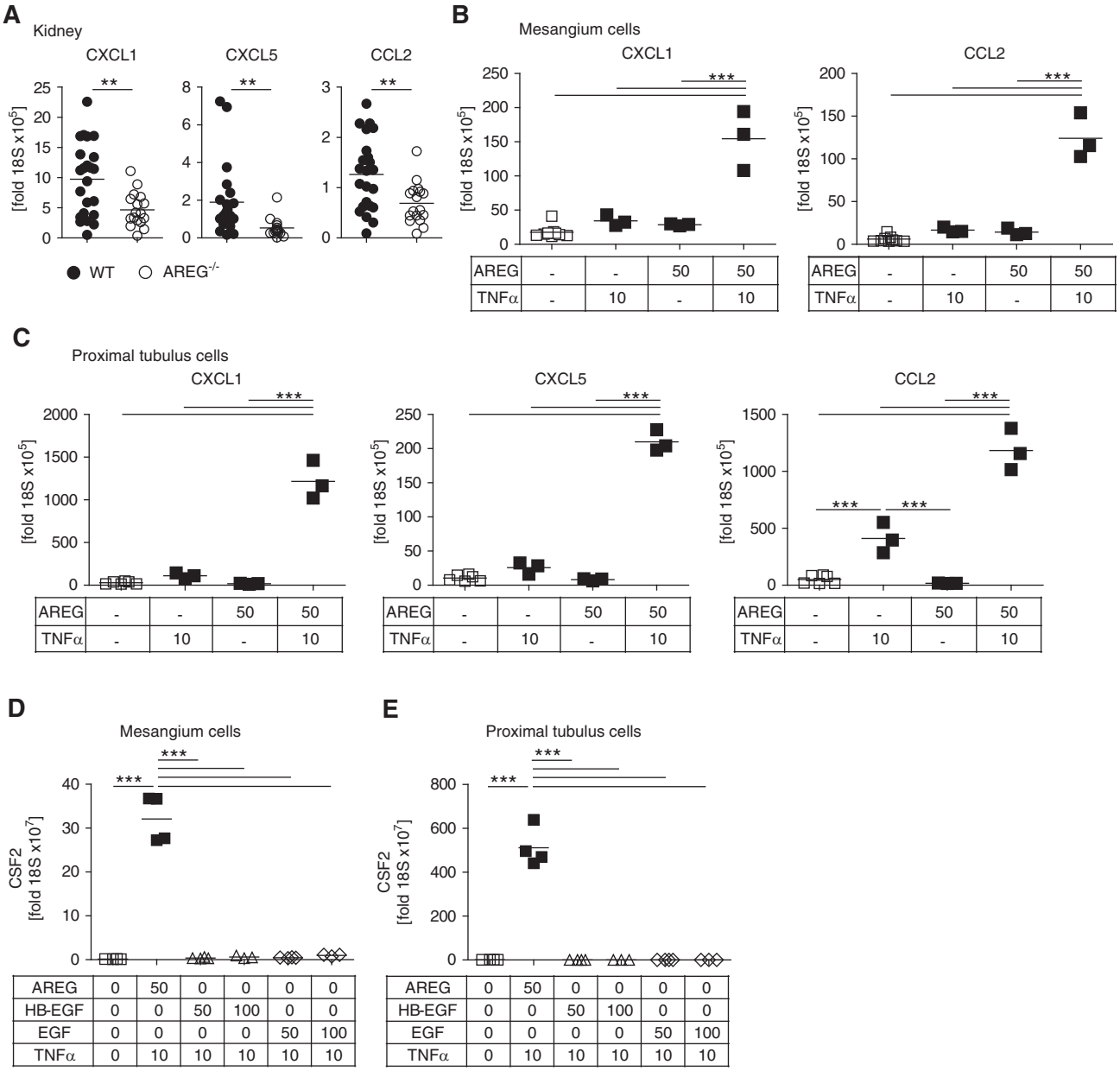


Figure 4. AREG induces myeloid cell–attracting chemokines and CSF2 secretion from resident renal cells. (A) Renal mRNA expression of the indicated chemokines at day 10 after NTN. (B) Expression of the indicated chemokine mRNAs by cultured mMC after stimulation with AREG and/or TNFα at the indicated concentrations in nanograms per milliliter. (C) Expression of the indicated chemokine mRNAs by cultured mPTC after stimulation with AREG and/or TNFα at the indicated concentrations in nanograms per milliliter. (D and E) Expression of CSF2 mRNA by cultured mMC and mPTC after stimulation with AREG, HB-EGF, or EGF in combination with TNFα at the indicated concentrations in nanograms per milliliter. Symbols represent individual animals or cell culture preparations, horizontal lines show mean values. $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$. WT, wild-type.

blocked by AREG-neutralizing antibodies or inhibition of the EGFR by the tyrosine kinase inhibitor erlotinib (Supplemental Figure 8A). To investigate whether chemokine induction was unique to AREG or shared with other EGFR ligands, we also investigated the effects of HB-EGF and EGF. Indeed, in the presence of TNFα, both HB-EGF and EGF increased expression of CXCL1 and CCL2 from mMC (Supplemental Figure 9, A–D). Furthermore, TNFα plus HB-EGF or EGF also induced chemokine expression from mPTC, albeit significantly less effectively, compared with AREG (Supplemental Figure 10, A–F). Next, we wanted to know whether AREG might not only support myeloid cell recruitment but also differentiation and proliferation of proinflammatory M/M. In this respect, we found the combination of AREG with TNFα to potentiate

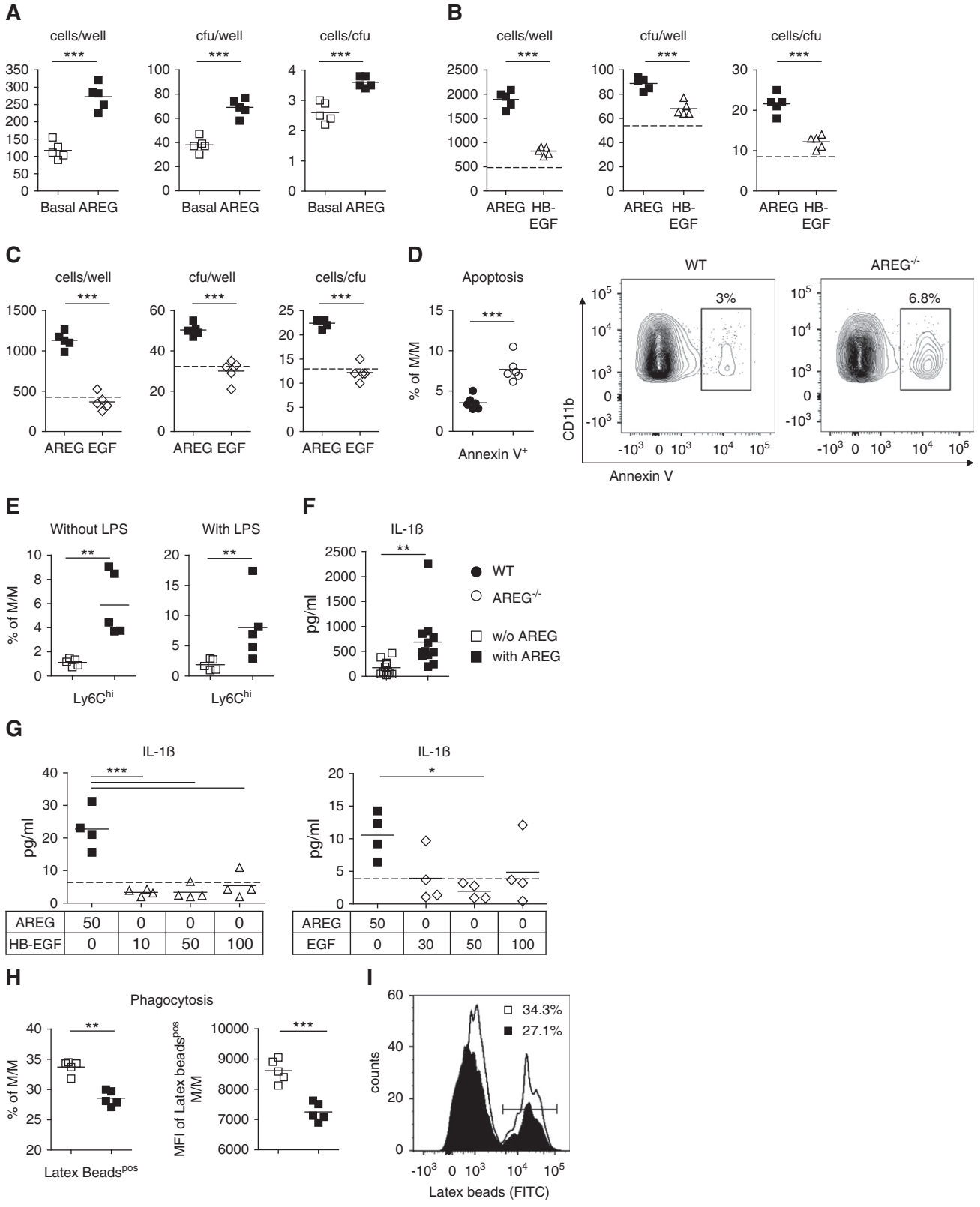


Figure 5. AREG enhances M/M proliferation and induces a proinflammatory M1 phenotype. (A) *In vitro* M/M proliferation at 6 days after stimulation with 50 ng/ml AREG, as measured by the number of cells per well, CFU per well, and cells per CFU. (B) *In vitro* M/M proliferation at 6 days after stimulation with 50 ng/ml AREG compared with 50 ng/ml HB-EGF, as measured by the number of cells per well, CFU per well, and cells per CFU. (C) *In vitro* M/M proliferation at 5 days after stimulation with 50 ng/ml AREG compared with

expression of the myeloid cell colony stimulating factor 2 (CSF2) from mMC and mPTC. This effect was specific for AREG as HB-EGF and EGF stimulation had no effect (Figure 4, D and E).

AREG Enhances M/M Proliferation and Induces a Proinflammatory M1 Phenotype

Next, we aimed to study whether AREG might also have direct effects on M/M themselves, because these upregulate the EGFR during inflammation (Supplemental Figure 11A). Indeed, we found AREG to strongly enhance M/M proliferation *in vitro* (Figure 5A). This effect was AREG-specific and could not be reproduced with HB-EGF or EGF (Figure 5, B and C). Furthermore, we found that AREG also effectively protected M/M from apoptosis *in vivo* (Figure 5D). We then aimed to analyze whether AREG could also alter the M/M phenotype. Supporting our *in vivo* observations, we found that *in vitro* treatment with AREG promoted generation of proinflammatory Ly6C^{hi} M1-type macrophages in both the presence and absence of inflammatory conditions (Figure 5E). AREG stimulation also enhanced M/M production of the highly proinflammatory cytokine IL-1β (Figure 5F). This effect was again specific to AREG as neither HB-EGF nor EGF increased IL-1β levels (Figure 5G). Finally, we found that in addition to promoting M1-type proinflammatory functions, AREG also suppressed the M2 characteristic phagocytic capacity of M/M (Figure 5, H and I). All AREG effects in our *in vitro* culture systems required release of endogenous AREG as M/M from AREG$^{-/-}$ mice did not respond to treatment with a single AREG dose (Supplemental Figure 11, B–E). Importantly, however, M/M from AREG$^{-/-}$ mice were not generally hyporesponsive because they proliferated equally well in response to TNFα stimulation (Supplemental Figure 11F). Indeed, we found that AREG treatment self-induced AREG expression by M/M similar to the feed-forward loop observed in mMC and mPTC (Supplemental Figure 11G). Interestingly, the requirement for endogenous AREG release could be fully bypassed by supplementation of exogenous AREG (Supplemental Figure 11H).

AREG from Nonhematopoietic Cells Enhances M/M Responses and Aggravates NTN

In order to further investigate the differential roles of hematopoietic versus nonhematopoietic sources of AREG, we next performed bone marrow transplantation experiments. As suggested by our previous findings, loss of AREG from hematopoietic cells (AREG$^{-/-}$ into wild-type) did not result in amelioration of NTN. Loss of AREG from nonhematopoietic cells (wild-type into AREG$^{-/-}$), however, conferred significant protection from renal injury in comparison with wild-type (wild-type into WT) controls (Figure 6, A and B). Notably, we again found strong effects on M/M polarization. Similar to the situation in AREG pan-knockout mice, loss of AREG selectively from nonhematopoietic cells resulted in skewing of M/M toward an M2 phenotype. Frequencies of M1-type renal Ly6c^{high} M/M were significantly reduced (Figure 6, C and D), whereas conversely, percentages of CD206^{+} M2-type M/M (Figure 6, E and F) and M/M expression levels of CD206 (Figure 6G) were enhanced. In contrast to the pronounced effects on M/M, renal CD3^{+} T cell numbers, as well as Foxp3^{+} Treg numbers and percentages, were not different between the groups (Supplemental Figure 12, A–D).

AREG Neutralization in the Macrophage-Dependent Effector Phase Ameliorates Nephritis

Because our data pointed toward a role of AREG for proinflammatory M/M activation, we next aimed to provide *in vivo* evidence. In order to minimize effects on T cell activation in the induction phase of adaptive immunity and more specifically target T cell–activated M/M in the effector phase of nephritis, we switched to the model of aNTN. Wild-type mice were preimmunized with sheep globulin to allow for development of T cell responses against the nephritogenic antigen, and aNTN was subsequently induced. A single dose of 5 μg of anti-AREG antibodies (Figure 7A) 1 day after injection of NTN serum was already sufficient to mildly but significantly ameliorate nephritis (Figure 7B). The degree of protection was dose-dependent because repeated injections of 7.5 μg of anti-AREG antibodies (Figure 7C) in a second set of experiments resulted in more profound reduction of renal tissue injury (Figure 7, D and E). Supporting a role of AREG for M/M responses, we found significantly reduced glomerular and interstitial renal macrophage infiltration in the anti-AREG group (Figure 7, F–I). T cell infiltration, in contrast, remained unaffected (Supplemental Figure 13, A and B). Effects on systemic T cell responses were also minor, in particular when compared with results from constitutively AREG-deficient mice, showing only marginally increased percentages of IFNγ-producing splenic CD4^{+} T effector cells (Supplemental Figure 13C).

50 ng/ml EGF, as measured by the number of cells per well, CFU per well, and cells per CFU. Dotted lines in (C and D) indicate basal conditions without addition of EGFR ligands. (D) Quantification and representative FACS plot of apoptosis from blood M/M of naïve mice with the indicated genotypes. (E) FACS quantification of Ly6C^{high} M1-type M/M after 48 hours *in vitro* stimulation with or without LPS, in the presence or absence of 50 ng/ml AREG. (F) IL-1β secretion as measured by ELISA in the supernatant of M/M after 24 hours *in vitro* stimulation with or without 50 ng/ml AREG. (G) IL-1β secretion as measured by ELISA in the supernatant of M/M after 24 hours *in vitro* stimulation with 50 ng/ml AREG compared with indicated concentrations of HB-EGF (left) and EGF (right) in nanograms per milliliter. Dotted line indicates IL-1β levels at basal conditions. (H) Percentages of latex beads (FITC)^{pos} M/M (left) and latex bead (FITC) mean fluorescence intensity (MFI) within latex bead^{pos} M/M (right) after 48 hours *in vitro* culture with or without 50 ng/ml AREG. (I) Representative histogram of latex beads (FITC)-positive CD11b^{+} M/M. Symbols represent individual animals or cell culture preparations, horizontal lines show mean values. *$P<0.05$; **$P<0.01$; ***$P<0.001$. WT, wild-type.

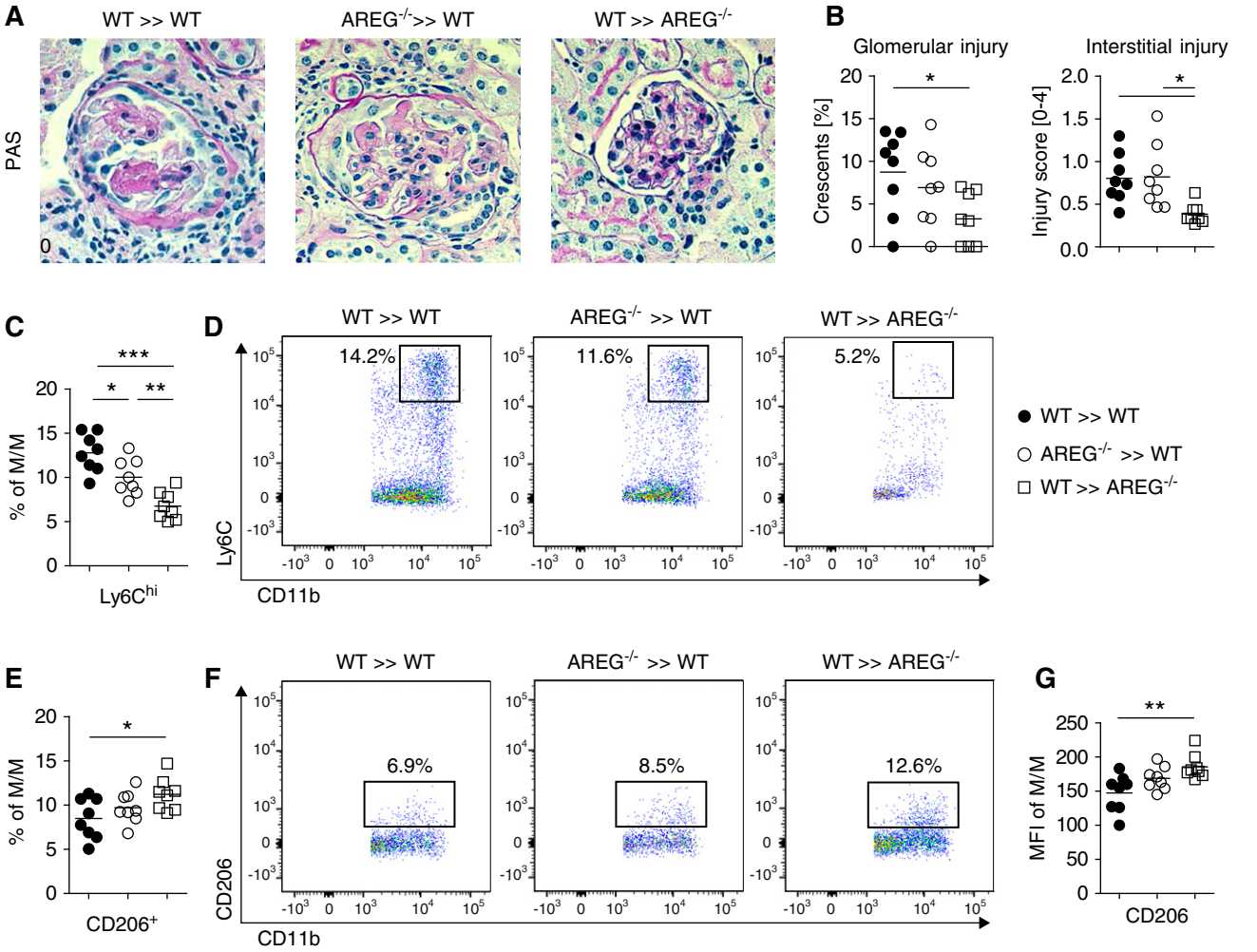


Figure 6. AREG from nonhematopoietic cells enhances M/M responses and aggravates NTN. (A) PAS-stained sections of nephritic kidneys from the indicated bone marrow donor/recipient combinations at day 7 of NTN (original magnification ×400). (B) Quantification of glomerular crescents and interstitial injury. (C) FACS quantification of renal Ly6C^{high} inflammatory M/M of the indicated groups of mice. (D) Representative FACS plots of renal Ly6C^{high} inflammatory M/M. (E) FACS quantification of renal CD206/Mannose receptor^{+} M2-type M/M of the indicated groups of mice. (F) Representative FACS plots of renal CD206/Mannose receptor^{+} M2-type M/M. (G) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD206/Mannose receptor within renal M/M. Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. PAS, periodic acid–Schiff; WT, wild-type.

Lack of EGFR Signaling in M/M Attenuates Nephritis

Next, we aimed to investigate the functional role of the AREG/EGFR signaling axis directly on M/M *in vivo*. We thus generated LysM^{cre}×EGFR$^{fl/fl}$ mice, in which lack of EGFR signaling is restricted to M/M. Selective and efficient knockout on M/M was confirmed by PCR of genomic DNA and mRNA from highly purified leukocyte populations (Supplemental Figure 14, A–C). Importantly, after induction of NTN, histologic damage and albuminuria were markedly reduced (Figure 8, A–C) by absence of EGFR signaling on M/M. In line with our previous experiments, we also found renal glomerular and interstitial M/M infiltration to be diminished in LysM^{cre}×EGFR$^{fl/fl}$ mice (Figure 8D). This effect was specific to M/M because renal neutrophil infiltration remained unaltered (Supplemental Figure 14D). Importantly, LysM^{cre}×EGFR$^{fl/fl}$ mice also showed impaired M1-type macrophage responses with significantly reduced proportions of Ly6C^{hi} and CCR2^{+} M/M (Figure 8, E and F). In addition, we noted significantly lower renal expression of the proinflammatory macrophage-attracting chemokines CCL2 and CCL5, as well as the M1 characteristic inflammatory mediators TNFα and iNOS. Also renal AREG mRNA levels were reduced (Figure 8G). Finally, we studied cell survival and, similar to our findings from AREG$^{-/-}$ mice, we found apoptosis to be increased in M/M from LysM^{cre}×EGFR$^{fl/fl}$ mice (Figure 8H).

Renal AREG Expression Is Increased in Human Crescentic GN

Finally, we aimed to assess the potential clinical relevance of our findings for human GN. We thus performed AREG

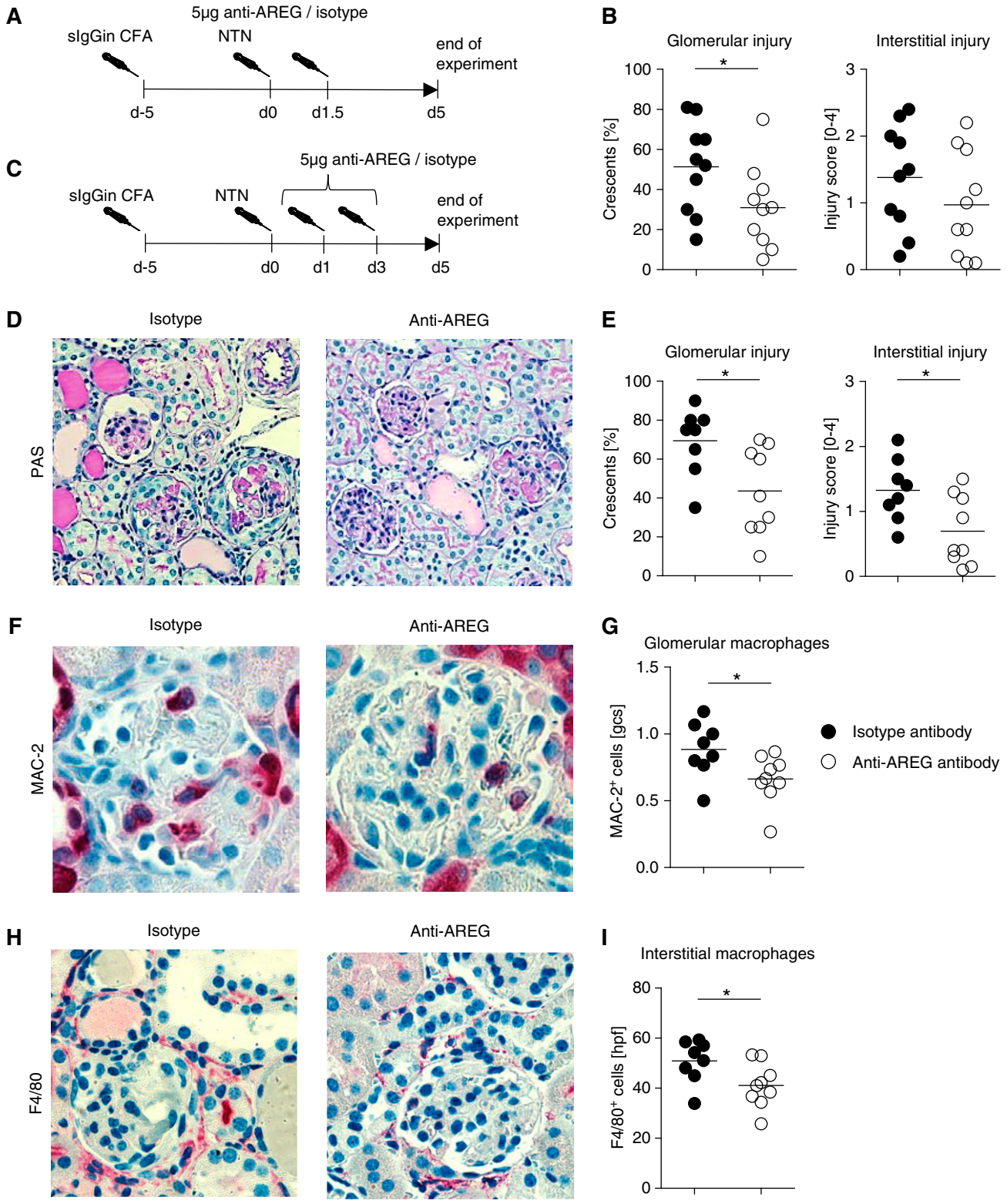


Figure 7. AREG neutralization in the macrophage-dependent effector phase ameliorates nephritis. (A) Overview of the experimental setup. (B) Quantification of glomerular crescents and interstitial injury. (C) Overview of the second experimental setup. (D) PAS-stained sections of nephritic kidneys from anti-AREG or isotype antibody–treated mice at day 5 after induction of aNTN (second experimental setup, original magnification ×200). (E) Quantification of glomerular crescents and interstitial injury from the second experimental setup. (F) Immunohistochemical staining and (G) quantification of glomerular MAC-2$^+$ M/M of the indicated groups from the second

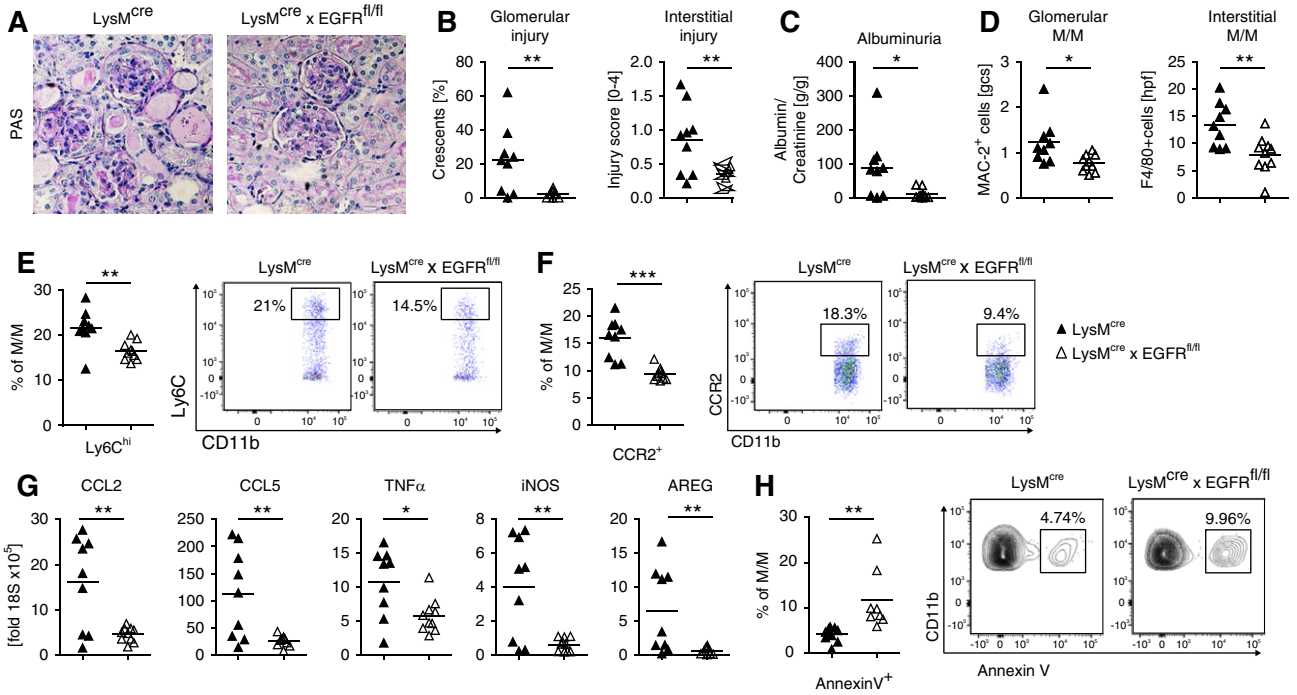


Figure 8. Lack of EGFR signaling in M/M attenuates nephritis. (A) PAS-stained sections of nephritic kidneys from the indicated strains of mice at day 7 (original magnification ×200). (B) Quantification of glomerular crescents and interstitial injury. (C) Albumin-creatinine ratio in the urine of mice from the indicated strains. (D) Quantification of renal glomerular and interstitial M/M infiltration during NTN by immunohistochemistry. (E) Quantification and representative FACS plot of renal Ly6C^{high} inflammatory M/M of the indicated strains of mice. (F) Quantification and representative FACS plot of renal CCR2^{+} inflammatory M/M of the indicated strains of mice. (G) Semi-quantitative analyses of renal mRNA expression of the indicated chemokines or cytokines by real-time quantitative PCR. (H) Quantification and representative FACS plot of apoptosis from blood M/M of naïve mice with the indicated genotypes. Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. PAS, periodic acid–Schiff.

immunostaining on human renal biopsy specimens. In kidneys of control patients, only weak glomerular and tubulointerstitial AREG expression was detected (Figure 9A). Specimens of patients with two different forms of crescentic GN (microscopic polyangiitis and Goodpasture syndrome), however, showed massively increased AREG staining, predominantly in renal resident cells. The strongest positivity was found in areas of glomerular crescents. Furthermore, AREG expression was particularly detected in parietal epithelial cells, podocytes, and tubule cells. Weaker staining was also observed in the periglomerular inflammatory infiltrate (Figure 9, B and C).

DISCUSSION

Our study aimed to evaluate the previously unknown role of AREG in acute GN. Initially, we analyzed expression of the seven known EGFR ligands during the course of NTN. Most of them remained undetected or were constitutively expressed. Interestingly, and in congruence with recent reports from various other renal pathologies,[49] renal expression of EGF was significantly reduced. AREG, in contrast, showed a unique and distinctive pattern. Renal mRNA and serum protein levels were highly upregulated during the course of inflammation. This highlights the potential relevance of AREG and indicates that signaling of the different EGFR ligands might not be redundant but could rather result in individual effects, as was previously also suggested by studies of liver inflammation and injury.[50,51] As cellular sources for renal AREG, we could *in vitro* identify mesangium and proximal tubule cells, which resembles the *in vivo* situation in both mice[18] and humans.[17] Interestingly, stimulation with numerous well characterized mediators of GN[52] could not induce transcription of AREG mRNA. Rather, we found evidence for a feed-forward loop, in which AREG strongly enhances its own secretion. This positive feedback mechanism might initially be sparked by early mediators of renal inflammation, such as TNFα, which we found to enhance AREG's self-stimulating effects.

experimental setup (original magnification ×400). (H) Immunohistochemical staining and (I) quantification of interstitial F4/80^{+} M/M of the indicated groups from the second experimental setup (original magnification ×400). Symbols represent individual animals, horizontal lines show mean values. *P<0.05. gcs, glomerular cross section; hpf, high-power field; PAS, periodic acid–Schiff.

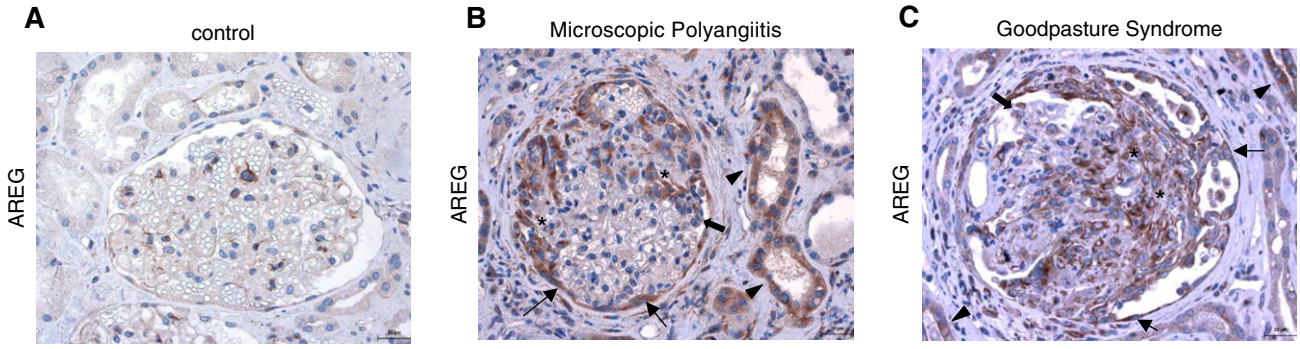


Figure 9. Renal AREG expression is increased in human crescentic GN. AREG immunostaining (brown) of kidney biopsy specimens from (A) control patients, (B) patients with microscopic polyangiitis, and (C) patients with Goodpasture syndrome. Asterisks indicate areas of glomerular crescents, thin arrows indicate parietal epithelial cells, thick arrows indicate podocytes, and arrowheads indicate tubule cells.

Next, we evaluated the functional effects of AREG on the clinical course of acute GN. Studies at day 7 and 10 after nephritis induction, two time points at which renal AREG levels are highest, uniformly showed significant protection from disease in AREG-deficient mice. This finding is remarkable because AREG has recently been described to potently enhance the immunosuppressive function of Tregs.[30–34] Furthermore, several studies published in high impact journals could show that AREG derived from Tregs and other immune cells has tissue reparative properties.[20–27] We thus aimed to identify the mechanisms by which AREG mediated its surprisingly strong proinflammatory effects in acute GN. In this respect, broad analyses of renal and systemic immune responses revealed the expected enhancement of $CD4^+$ T helper cell activation in $AREG^{-/-}$ mice.[30] In contrast, however, we also found a significant reduction of renal myeloid cell infiltration and activation. It thus seems that AREG has strong proinflammatory effects on myeloid cells, which in our acute GN model overrule the suppressive effects on $CD4^+$ T cell responses. Indeed, more detailed studies of M/M showed significant skewing toward an anti-inflammatory M2 macrophage phenotype in the absence of AREG. These changes were restricted to renal, but not systemic M/M, indicating local shaping of the M/M phenotype in the micromilieu of the inflamed kidneys.

In order to shed light on how exactly AREG influences renal M/M responses, we started by studying effects on renal resident cells. Interestingly, renal levels of myeloid cell–attracting chemokines CXCL1, CXCL5, and CCL2 were significantly reduced in AREG-deficient mice. On the other hand, these chemokines were strongly induced after stimulation of both mMC and mPTC with AREG in combination with TNFα. AREG might thus mediate indirect effects on myeloid cell responses *via* facilitating their renal recruitment. These effects, however, were not unique to AREG, as the prototypic EGFR ligands HB-EGF and EGF could also stimulate chemokine transcription, albeit somewhat less effectively. Next, we sought to evaluate effects of AREG on M/M proliferation and phenotype. Indeed, stimulation of mMC and mPTC resulted in enhanced CSF2/GM-CSF transcription, which is known to support differentiation and proliferation of proinflammatory M1-type M/M.[53] Furthermore, direct *in vitro* stimulation of M/M with AREG much enhanced their survival and proliferation. These previously unknown effects were exclusively induced by AREG but not by HB-EGF or EGF. In line with these data, AREG protected M/M from apoptosis and *in vitro* stimulation resulted in skewing toward an M1 phenotype with increased proinflammatory IL-1β secretion.

Finally, we also measured phagocytosis, which is a characteristic hallmark of M2-type M/M, and found significant impairment after AREG stimulation. We thus suspected that renal AREG enhances pathogenic myeloid cell responses *via* two pathways. Firstly, in an indirect fashion, AREG-induced secretion of chemokines from resident renal cells might recruit activated M/M and granulocytes into the kidneys. Future studies analyzing mice with renal cell type–selective EGFR deficiency will help to validate and refine this hypothesis. Secondly, in a direct manner, AREG seems to favor proinflammatory M1-type M/M generation and expansion. Although the indirect effects are likely to be shared among several EGFR ligands, the direct effects on M/M seem to be unique to AREG. It is tempting to speculate that these M/M activating functions might significantly contribute to AREG's strong profibrotic properties, which are mechanistically still poorly understood.[18] In order to further delineate the cellular source of proinflammatory AREG, we next performed bone marrow transplantation experiments. Indeed, mice with AREG deficiency restricted to tissue resident cells showed changes very similar to pan-$AREG^{-/-}$ mice. NTN was significantly ameliorated and M/M showed distinctive skewing toward the M2 phenotype. Wild-type recipients of $AREG^{-/-}$ bone marrow, in contrast, were not protected from nephritis. In conclusion, proinflammatory AREG in our model seems to derive from resident renal cells, rather than from infiltrating leukocytes. This finding is remarkable and supports a novel concept, which might be more broadly applicable. Although leukocyte-secreted AREG was shown to mediate protective

effects,[20–27,30–34] tissue-derived AREG seems to be profibrotic[18] and proinflammatory. The exact cellular sources of AREG, as well as the mechanisms and differential intracellular EGFR signaling pathways underlying this observation clearly warrant further studies.

Next, we wanted to evaluate whether blockade of AREG could be of potential use as a therapy for established GN. In order to predominantly target activated myeloid cells, we made use of the aNTN model.[54] Mice were preimmunized with sheep-globulin, allowing unaltered induction of adaptive T cell responses against the subsequently deposited nephritogenic antigen. Nephritis was then induced at day 5 after immunization. This was followed by therapeutic application of anti-AREG antibodies during the effector phase of aNTN, in which T cell–stimulated macrophages are active. Using this protocol, neutralization of AREG indeed predominantly reduced renal macrophage responses, with only minimal effects on T cells. Importantly, AREG blockade resulted in amelioration of renal injury in a dose-dependent manner, indicating potential clinical usefulness. However, our findings also suggest careful timing of AREG-directed interventions. These are more likely to be useful during an acute flare of nephritis but might be less effective, or even deleterious, during chronic T cell–dominated forms of inflammation. Next, we aimed to clarify whether abrogating AREG's effects specifically on M/M would be sufficient to ameliorate GN. Furthermore, this setup avoids potential bias, which might be caused by altered AREG signaling in T cells, or other yet undefined cellular players. We therefore generated mice with myeloid cell–restricted EGFR deficiency and induced NTN. Supporting our hypothesis and our findings from the AREG-directed interventions, we again found significant amelioration of renal injury in the knockout mice. Importantly, and in line with recent studies on experimental colitis,[55] infection,[56] and atherosclerosis,[57] EGFR silencing in myeloid cells was accompanied by reduced renal M/M influx and skewing toward an anti-inflammatory M2 phenotype. Furthermore, renal M1-type M/M-attracting chemokines and M1 characteristic TNFα and iNOS expression were diminished. Last but not least, similar to our findings from AREG pan-deficient mice, we also found that EGFR signaling protected M/M from apoptosis. Finally, in order to evaluate the potential clinical relevance of our findings for human disease, we analyzed AREG expression in kidneys from patients with two different types of crescentic GN. Regardless of the entity and in line with our findings from the murine studies, strong upregulation of AREG was predominantly found in various types of resident renal cells. Although crescent areas showed strongest staining intensity, single cell types that could be identified included parietal epithelial cells, podocytes and tubule cells. In addition, somewhat weaker staining was also detected in cells of the periglomerular infiltrate. These findings call for future studies to better define and characterize the exact cellular sources of AREG, as well as their individual relevance. Taken together, our data identify AREG as a novel mediator of acute crescentic GN. We show that renal tissue–derived AREG has potent direct and probably also indirect proinflammatory effects on myeloid cell responses by (*1*) enhancing renal myeloid cell infiltration *via* induction of chemokine secretion from resident renal cells; and (*2*) direct effects on M/M by enhancing M1-type polarization, proliferation, and cytokine secretion. Our results thus favor studies evaluating AREG-specific antibody neutralization for the treatment of acute renal inflammation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank I. Holtze for her excellent technical help.

Dr. Oliver M. Steinmetz designed the study. Dr. Oliver M. Steinmetz and Dr. Simon Melderis wrote the manuscript. Dr. Julia Hagenstein, Dr. Simon Melderis, Dr. Matthias Tobias Warkotsch, Dr. Julien Dang, Dr. Georg Rudolf Herrnstadt, and Dr. Christoph Benjamin Niehus carried out experiments. Dr. Carmen Berasain, Dr. Matias A. Avila, Dr. Gisa Tiegs, and Dr. Pierre-Louis Tharaux donated mice. Dr. Katrin Neumann, Dr. Matias A. Avila, Dr. Gisa Tiegs, Dr. Pierre-Louis Tharaux, and Dr. Ulf Panzer critically evaluated the manuscript. Dr. Simon Melderis, Dr. Julia Hagenstein, Dr. Julien Dang, Dr. Pierre-Louis Tharaux, and Dr. Oliver M. Steinmetz analyzed the data.

DISCLOSURES

All authors have nothing to disclose.

FUNDING

This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft grants STE 1822/6-1 and SFB 1192 TPA03 (to O.M. Steinmetz).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

This article contains the following supplemental material online at http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2019111215/-/DCSupplemental.

Supplemental Figure 1. Time course of mRNA expression of the indicated EGFR ligands during NTN.

Supplemental Figure 2. Effect of stimulation with various cytokines on AREG mRNA expression.

Supplemental Figure 3. Dependence of AREG mRNA induction on AREG/EGFR signaling.

Supplemental Figure 4. EGFR ligand expression in nephritic $AREG^{-/-}$ mice.

Supplemental Figure 5. Analyses of renal and systemic T cells in NTN.

Supplemental Figure 6. Analyses of renal eosinophils in NTN.

Supplemental Figure 7. CD206 expression on renal M/M and systemic M/M phenotype.

Supplemental Figure 8. Efficacy of neutralizing anti-AREG antibody and erlotinib on chemokine expression.

Supplemental Figure 9. Expression of chemokines from mMC after stimulation with HB-EGF or EGF.

Supplemental Figure 10. Expression of chemokines from mPTC after stimulation with HB-EGF or EGF.

Supplemental Figure 11. EGFR expression on activated M/M and analyses of $AREG^{-/-}$ M/M.

Supplemental Figure 12. Renal T cell and Treg infiltration after bone marrow transplantation.

Supplemental Figure 13. Renal and systemic T cell responses in anti-AREG–treated mice.

Supplemental Figure 14. Specificity of EGFR excision in M/M from LysMCre×$EGFR^{fl/fl}$ mice.

REFERENCES

1. Swanson CD, Akama-Garren EH, Stein EA, Petralia JD, Ruiz PJ, Edalati A, et al.: Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase ameliorates collagen-induced arthritis. *J Immunol* 188: 3513–3521, 2012
2. Zhuang S, Liu N: EGFR signaling in renal fibrosis. *Kidney Int Suppl (2011)* 4: 70–74, 2014
3. Harskamp LR, Gansevoort RT, van Goor H, Meijer E: The epidermal growth factor receptor pathway in chronic kidney diseases. *Nat Rev Nephrol* 12: 496–506, 2016
4. Bollée G, Flamant M, Schordan S, Fligny C, Rumpel E, Milon M, et al.: Epidermal growth factor receptor promotes glomerular injury and renal failure in rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Nat Med* 17: 1242–1250, 2011
5. Terzi F, Burtin M, Hekmati M, Federici P, Grimber G, Briand P, et al.: Targeted expression of a dominant-negative EGF-R in the kidney reduces tubulo-interstitial lesions after renal injury. *J Clin Invest* 106: 225–234, 2000
6. Lautrette A, Li S, Alili R, Sunnarborg SW, Burtin M, Lee DC, et al.: Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: A new therapeutic approach. *Nat Med* 11: 867–874, 2005
7. Chen J, Chen JK, Nagai K, Plieth D, Tan M, Lee TC, et al.: EGFR signaling promotes TGFβ-dependent renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 23: 215–224, 2012
8. François H, Placier S, Flamant M, Tharaux PL, Chansel D, Dussaule JC, et al.: Prevention of renal vascular and glomerular fibrosis by epidermal growth factor receptor inhibition. *FASEB J* 18: 926–928, 2004
9. Lee HW, Khan SQ, Khaliqdina S, Altintas MM, Grahammer F, Zhao JL, et al.: Absence of miR-146a in podocytes increases risk of diabetic glomerulopathy via up-regulation of ErbB4 and notch-1. *J Biol Chem* 292: 732–747, 2017
10. Qing X, Chinenov Y, Redecha P, Madaio M, Roelofs JJ, Farber G, et al.: iRhom2 promotes lupus nephritis through TNF-α and EGFR signaling. *J Clin Invest* 128: 1397–1412, 2018
11. Zhang MZ, Sasaki K, Li Y, Li Z, Pan Y, Jin GN, et al.: The role of the EGF receptor in sex differences in kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 30: 1659–1673, 2019
12. Berasain C, Avila MA: Amphiregulin. *Semin Cell Dev Biol* 28: 31–41, 2014
13. Cook PW, Piepkorn M, Clegg CH, Plowman GD, DeMay JM, Brown JR, et al.: Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. *J Clin Invest* 100: 2286–2294, 1997
14. Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Masuda R, Tanaka K, et al.: Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients. *J Inflamm (Lond)* 5: 5, 2008
15. Lisi S, Sisto M, Lofrumento DD, Cucci L, Frassanito MA, Mitolo V, et al.: Pro-inflammatory role of Anti-Ro/SSA autoantibodies through the activation of Furin-TACE-amphiregulin axis. *J Autoimmun* 35: 160–170, 2010
16. Perugorria MJ, Latasa MU, Nicou A, Cartagena-Lirola H, Castillo J, Goñi S, et al.: The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis. *Hepatology* 48: 1251–1261, 2008
17. Kefaloyianni E, Muthu ML, Kaeppler J, Sun X, Sabbisetti V, Chalaris A, et al.: ADAM17 substrate release in proximal tubule drives kidney fibrosis. *JCI Insight* 1: e87023, 2016
18. Kefaloyianni E, Keerthi Raja MR, Schumacher J, Muthu ML, Krishnadoss V, Waikar SS, et al.: Proximal tubule-derived amphiregulin amplifies and integrates profibrotic EGF receptor signals in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 30: 2370–2383, 2019
19. Santamaría E, Rodríguez-Ortigosa CM, Uriarte I, Latasa MU, Urtasun R, Alvarez-Sola G, et al.: The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin protects from cholestatic liver injury and regulates bile acids synthesis. *Hepatology* 69: 1632–1647, 2019
20. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, et al.: A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* 155: 1282–1295, 2013
21. Arpaia N, Green JA, Moltedo B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al.: A distinct function of regulatory T cells in tissue protection. *Cell* 162: 1078–1089, 2015
22. Carney K, Chang YR, Wilson S, Calnan C, Reddy PS, Chan WY, et al.: Regulatory T-cell-intrinsic amphiregulin is dispensable for suppressive function. *J Allergy Clin Immunol* 137: 1907–1909, 2016
23. Ito M, Komai K, Mise-Omata S, Iizuka-Koga M, Noguchi Y, Kondo T, et al.: Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. *Nature* 565: 246–250, 2019
24. Monticelli LA, Osborne LC, Noti M, Tran SV, Zaiss DM, Artis D: IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 10762–10767, 2015
25. Cao Q, Wang Y, Niu Z, Wang C, Wang R, Zhang Z, et al.: Potentiating tissue-resident type 2 innate lymphoid cells by IL-33 to prevent renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 29: 961–976, 2018
26. Fujiu K, Shibata M, Nakayama Y, Ogata F, Matsumoto S, Noshita K, et al.: A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation. *Nat Med* 23: 611–622, 2017
27. Minutti CM, Modak RV, Macdonald F, Li F, Smyth DJ, Dorward DA, et al.: A macrophage-pericyte axis directs tissue restoration via amphiregulin-induced transforming growth factor beta activation. *Immunity* 50: 645–654 e6, 2019
28. Zaiss DM, Yang L, Shah PR, Kobie JJ, Urban JF, Mosmann TR: Amphiregulin, a TH2 cytokine enhancing resistance to nematodes. *Science* 314: 1746, 2006
29. Minutti CM, Drube S, Blair N, Schwartz C, McCrae JC, McKenzie AN, et al.: Epidermal growth factor receptor expression licenses type-2 helper T cells to function in a T cell receptor-independent fashion. *Immunity* 47: 710–722 e6, 2017
30. Zaiss DM, van Loosdregt J, Gorlani A, Bekker CP, Gröne A, Sibilia M, et al.: Amphiregulin enhances regulatory T cell-suppressive function via the epidermal growth factor receptor. *Immunity* 38: 275–284, 2013
31. Dai K, Huang L, Chen J, Yang L, Gong Z: Amphiregulin promotes the immunosuppressive activity of intrahepatic $CD4^+$ regulatory T cells to impair $CD8^+$ T-cell immunity against hepatitis B virus infection. *Immunology* 144: 506–517, 2015
32. Yuan CH, Sun XM, Zhu CL, Liu SP, Wu L, Chen H, et al.: Amphiregulin activates regulatory T lymphocytes and suppresses CD8+ T cell-mediated anti-tumor response in hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget* 6: 32138–32153, 2015
33. Wang S, Zhang Y, Wang Y, Ye P, Li J, Li H, et al.: Amphiregulin confers regulatory T cell suppressive function and tumor invasion via the EGFR/GSK-3β/Foxp3 Axis. *J Biol Chem* 291: 21085–21095, 2016

34. Nosbaum A, Prevel N, Truong HA, Mehta P, Ettinger M, Scharschmidt TC, et al.: Cutting edge: Regulatory T cells facilitate cutaneous wound healing. *J Immunol* 196: 2010–2014, 2016
35. Jiang R, Tang J, Chen Y, Deng L, Ji J, Xie Y, et al.: The long noncoding RNA lnc-EGFR stimulates T-regulatory cells differentiation thus promoting hepatocellular carcinoma immune evasion. *Nat Commun* 8: 15129, 2017
36. Wolf D, Hochegger K, Wolf AM, Rumpold HF, Gastl G, Tilg H, et al.: CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol* 16: 1360–1370, 2005
37. Kluger MA, Luig M, Wegscheid C, Goerke B, Paust HJ, Brix SR, et al.: Stat3 programs Th17-specific regulatory T cells to control GN. *J Am Soc Nephrol* 25: 1291–1302, 2014
38. Kluger MA, Meyer MC, Nosko A, Goerke B, Luig M, Wegscheid C, et al.: RORγt(+)Foxp3(+) cells are an independent bifunctional regulatory T cell lineage and mediate crescentic GN. *J Am Soc Nephrol* 27: 454–465, 2016
39. Nosko A, Kluger MA, Diefenhardt P, Melderis S, Wegscheid C, Tiegs G, et al.: T-bet enhances regulatory T cell fitness and directs control of Th1 responses in crescentic GN. *J Am Soc Nephrol* 28: 185–196, 2017
40. Diefenhardt P, Nosko A, Kluger MA, Richter JV, Wegscheid C, Kobayashi Y, et al.: IL-10 receptor signaling empowers regulatory T cells to control Th17 responses and protect from GN. *J Am Soc Nephrol* 29: 1825–1837, 2018
41. Ooi JD, Petersen J, Tan YH, Huynh M, Willett ZJ, Ramarathinam SH, et al.: Dominant protection from HLA-linked autoimmunity by antigen-specific regulatory T cells. *Nature* 545: 243–247, 2017
42. Alikhan MA, Huynh M, Kitching AR, Ooi JD: Regulatory T cells in renal disease. *Clin Transl Immunology* 7: e1004, 2018
43. Luetteke NC, Qiu TH, Fenton SE, Troyer KL, Riedel RF, Chang A, et al.: Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development* 126: 2739–2750, 1999
44. Lee TC, Threadgill DW: Generation and validation of mice carrying a conditional allele of the epidermal growth factor receptor. *Genesis* 47: 85–92, 2009
45. Kluger MA, Zahner G, Paust HJ, Schaper M, Magnus T, Panzer U, et al.: Leukocyte-derived MMP9 is crucial for the recruitment of proinflammatory macrophages in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 83: 865–877, 2013
46. Steinmetz OM, Summers SA, Gan PY, Semple T, Holdsworth SR, Kitching AR: The Th17-defining transcription factor RORγt promotes glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 22: 472–483, 2011
47. Wolf G, Mueller E, Stahl RA, Ziyadeh FN: Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 92: 1366–1372, 1993
48. Wolf G, Haberstroh U, Neilson EG: Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *Am J Pathol* 140: 95–107, 1992
49. Isaka Y: Epidermal growth factor as a prognostic biomarker in chronic kidney diseases. *Ann Transl Med* 4[Suppl 1]: S62, 2016
50. Berasain C, García-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Santamaría M, Lee DC, et al.: Novel role for amphiregulin in protection from liver injury. *J Biol Chem* 280: 19012–19020, 2005
51. Pardo-Saganta A, Latasa MU, Castillo J, Alvarez-Asiain L, Perugorría MJ, Sarobe P, et al.: The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin is a negative regulator of hepatic acute-phase gene expression. *J Hepatol* 51: 1010–1020, 2009
52. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ: The immune system and kidney disease: Basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol* 13: 738–753, 2013
53. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: Implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* 178: 5245–5252, 2007
54. Luig M, Kluger MA, Goerke B, Meyer M, Nosko A, Yan I, et al.: Inflammation-induced IL-6 functions as a natural brake on macrophages and limits GN. *J Am Soc Nephrol* 26: 1597–1607, 2015
55. Lu N, Wang L, Cao H, Liu L, Van Kaer L, Washington MK, et al.: Activation of the epidermal growth factor receptor in macrophages regulates cytokine production and experimental colitis. *J Immunol* 192: 1013–1023, 2014
56. Hardbower DM, Singh K, Asim M, Verriere TG, Olivares-Villagómez D, Barry DP, et al.: EGFR regulates macrophage activation and function in bacterial infection. *J Clin Invest* 126: 3296–3312, 2016
57. Zeboudj L, Giraud A, Guyonnet L, Zhang Y, Laurans L, Esposito B, et al.: Selective EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) deletion in myeloid cells limits atherosclerosis-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38: 114–119, 2018