

**Diplomarbeit**

**Die Blockade der Costimulationsmoleküle CD30/Ox40  
als neue Therapieoption in der experimentellen  
Glomerulonephritis**

eingereicht von

**Konstantin Adrian Klötzer**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Klinischen Abteilung für Nephrologie**

Universitätsklinik für Innere Medizin

LKH Graz

unter der Anleitung von

**Assoz. Prof.<sup>in</sup> Priv.-Doz.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> med.univ. Kathrin Eller**

und

**Dr.<sup>in</sup> med.univ. Katharina Artinger, PhD**

## **Eidesstattliche Erklärung**

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 26.04.2020*

*Konstantin Adrian Klötzer, eh.*

## Danksagungen

Vielen Dank an Katharina Artinger und Kathrin Eller für die perfekte Betreuung und die Möglichkeit an diesem Projekt mitarbeiten zu dürfen. Vielen Dank an Corinna Schabhüttl für ihre nette und geduldige Hilfe im Labor. Großen Dank an das ganze Team für diese lehrreiche Zeit. Es ist nicht selbstverständlich so herzlich in ein Team aufgenommen zu werden!

Der Dank an meine Eltern ist nicht in Worte zu fassen. Danke für eure bedingungslose Unterstützung und Fürsorge. Danke für eure stets offenen Ohren und Herzen.

Vielen Dank an meine Schwester Sarah, zu der ich immer aufblicken konnte und die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite steht.

Danke an meine lieben Freunde und Studienkollegen für eine unvergessliche Studienzeit. Und natürlich vielen Dank an meine Freundin Melinda. Sie war mir seit unserem ersten Tag eine wichtige emotionale Stütze. Auch dann noch, als sie das Wort „Costimulation“ schon nicht mehr hören wollte.

# Zusammenfassung

## Einleitung:

Die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) CD30 und Ox40 sind wichtige costimulierende Rezeptoren auf T-Zellen und sind an den inflammatorischen Mechanismen zahlreicher T-Zell-abhängiger Autoimmunerkrankungen beteiligt. Wir untersuchten die Rolle dieser Rezeptoren in der nephrotoxischen Serum Nephritis (NTS), einem experimentellen Mausmodell einer Immunkomplex-vermittelten rapid-progressiven Glomerulonephritis (RPGN), welches ebenfalls wesentlich von T-Zellen abhängig ist. Daten aus unserem Labor konnten zeigen, dass CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse vor der NTS geschützt sind und neben einer signifikant reduzierten Albuminurie wesentliche Verbesserungen im histologischen Bild der Nieren aufweisen. Auch die therapeutische kombinierte Blockade mit CD30 Ligand- und Ox40 Ligand-Antikörpern erwies sich verglichen mit den Kontrollgruppen als wirkungsvoll. Da die Expression dieser Rezeptoren und Liganden jedoch nicht auf T-Zellen beschränkt sind, wollten wir die Mechanismen hinter den protektiven Effekten der Blockade in der NTS besser verstehen. Wir untersuchten die Hypothese, dass die Expression von CD30 und Ox40 speziell auf CD4<sup>+</sup> Zellen für die Beteiligung dieser Rezeptoren an der Pathogenese der NTS verantwortlich ist. Um dies zu beweisen führten wir ein Transferexperiment in T- und B-Zell defizienten Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen durch.

## Methoden:

Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen, welche weder reife B- noch T-Zellen besitzen, wurden pro Tier  $1,5 \times 10^6$  aus den Milzen von entweder CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen oder CD30/Ox40<sup>+/+</sup> Wildtyp-Mäusen isolierte CD4<sup>+</sup> Zellen intravenös injiziert. Anschließend wurden die Mäuse mittels subkutaner Gabe von Kaninchen IgG präimmunisiert und schließlich ein Kaninchen-Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran intravenös injiziert, um eine Immunkomplex-Glomerulonephritis bzw. nephrotoxische Serum Nephritis (NTS) zu induzieren. Die Tiere wurden 14 Tage nach NTS-Induktion evaluiert und beide Gruppen in Hinblick auf Albuminurie (Albumin-Kreatinin-Quotient), Blut-Harnstoff-Stickstoffkonzentrationen (BUN-Level) und histologischem glomerulärem Schaden (PAS-Score) evaluiert. Immunhistochemisch wurden in die Nieren infiltrierende CD4<sup>+</sup> Zellen (CD4), Makrophagen (CD68) und neutrophilen Granulozyten (Ly6G) zwischen den beiden Gruppen verglichen.

### Ergebnisse:

Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse rekonstituiert mit CD30/Ox40<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen zeigten am Tag 14 nach NTS-Induktion eine signifikant geringere Albuminurie (p<0,01) und geringere Blut-Harnstoff-Stickstoffkonzentrationen (p<0,001) verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Auswertung des glomerulären Schadens nach PAS-Färbung ergab einen signifikant geringeren PAS-Score in Mäusen, die mit CD30/Ox40<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen rekonstruiert wurden im Vergleich zu Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen, denen WT Zellen transferiert wurden (p<0,0001). Diese Mäuse zeigten auch signifikant geringere Zahlen an CD4<sup>+</sup> Zellen (p<0,01), Makrophagen (p<0,01) und neutrophile Granulozyten (p<0,01) in den Nieren verglichen mit der Wildtyp-Transfer-Gruppe. Letztere entwickelten einen schweren Phänotyp der NTS.

### Conclusio:

Wir konnten zeigen, dass sich die protektiven Effekte der CD30/Ox40-Blockade auf die Effekte dieser costimulierenden Achsen auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen zurückführen lassen. Der genetische Knockout beschränkt auf CD4<sup>+</sup> Zellen führte zu einem verbesserten Phänotyp der NTS vergleichbar mit dem in CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen. Gemeinsam mit den bisherigen Daten aus unserem Labor ergibt sich der Verdacht, dass CD30 und Ox40 für die Proliferation von CD4<sup>+</sup> Zellen bedeutend sind und auf diese Weise zur Pathogenese der NTS beitragen. Damit stellt die kombinierte Blockade proinflammatorischer Mitglieder aus der TNFRSF, insbesondere die der CD30- und Ox40-Achse, einen neuen und vielversprechenden Therapieansatz in der Glomerulonephritis dar.

## Abstract

### Introduction:

CD30 and Ox40 are members of the tumour necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF) and play an important role in T cell co-stimulation. To investigate their involvement in pathogenesis of immune complex-mediated rapidly progressive glomerulonephritis, an experimental mouse model (nephrotoxic serum nephritis) was used. Preliminary data of nephrotoxic serum nephritis (NTS) in CD30/Ox40<sup>-/-</sup> double knockout mice showed significantly reduced levels of albuminuria and improved histopathological renal changes. Furthermore, combined CD30 ligand antibody and Ox40 ligand antibody treated mice showed a therapeutic benefit compared to the control group. However, CD30 and Ox40 are not only expressed on T cells but also on other cells and tissues. Therefore, we wanted to get a better understanding of the mechanisms behind the protective effects of CD30/Ox40<sup>-/-</sup> knockout. It was hypothesized that the absence of CD30 and Ox40 on CD4<sup>+</sup> cell surfaces was responsible for the protection of knockout mice and a T cell transfer experiment into Rag1<sup>-/-</sup> mice was designed to prove that.

### Methods:

CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from spleens of either wildtype mice or CD30/Ox40<sup>-/-</sup> double knockout mice and injected into Rag1<sup>-/-</sup> mice. Latter are deficient in T and B cells. Thus, two groups of mice with either CD30/Ox40<sup>+/+</sup> or CD30/Ox40<sup>-/-</sup> reconstituted T cells were created. Each mouse was injected intravenously with 1,5x10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> cells. Mice were preimmunized with subcutaneous injection of rabbit IgG. Following this, immune complex mediated nephrotoxic serum nephritis was induced by intravenous injection of rabbit anti-glomerular basement membrane antibodies and mice were evaluated 14 days later. The evaluation included albuminuria (albumin to creatinine ratio), blood urea nitrogen levels, histopathology and immunohistopathology of the kidneys (including staining for PAS, CD4, CD68 and Ly6G).

### Results:

Similar to CD30/Ox40<sup>-/-</sup> mice, protection from disease was found in Rag1<sup>-/-</sup> mice reconstituted with CD30/Ox40<sup>-/-</sup> T cells. We found significantly reduced levels of albuminuria (p<0,01), blood urea nitrogen levels (p<0,001) and improved histopathological renal changes in PAS score (p<0,0001). Numbers of kidney infiltrating CD4<sup>+</sup> cells,

macrophages and neutrophils were all significantly reduced ( $p < 0,01$ ). In contrast,  $Rag1^{-/-}$  mice reconstituted with wildtype T cells developed a severe phenotype of disease.

Significance:

Data of our research group showed that  $CD30/Ox40^{-/-}$  mice were protected from nephrotoxic serum nephritis. Similarly, disease was ameliorated when  $CD30/Ox40^{-/-} CD4^{+}$  cells were transferred to  $Rag1^{-/-}$  mice. Together, these results indicate an important role for CD30 and Ox40 signaling in T cell proliferation and their involvement in the pathogenesis of experimental glomerulonephritis. Thus, combined TNFRSF signal blocking, particularly combined CD30/Ox40 signal blocking, might be a novel therapeutic strategy in glomerulonephritis.

# Inhaltsverzeichnis

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	II
DANKSAGUNGEN	III
ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABSTRACT	VI
INHALTSVERZEICHNIS	VIII
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN	XI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIII
TABELLENVERZEICHNIS	XIV
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Niere und die glomeruläre Filtration</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Glomerulonephritis</b>	<b>2</b>
1.2.1 Morphologien der Glomerulonephritiden	2
1.2.2 Diffuse extrakapilläre Glomerulonephritis	4
1.2.3 Formen der Glomerulonephritis nach ihrer Pathophysiologie	6
1.2.3.1 Einteilung nach Pathophysiologie	6
1.2.3.2 Immunkomplex Glomerulonephritiden	7
1.2.3.2.1 IgA-Nephropathie	7
1.2.3.2.2 Akute postinfektiöse Glomerulonephritis	8
1.2.3.2.3 Lupus-Nephritis	10
1.2.3.3 Pauci-Immun Glomerulonephritis	14
1.2.3.4 Anti-GBM-Glomerulonephritis	16
1.2.3.5 Weitere Formen der Glomerulonephritis	18
1.2.4 Therapie	18
1.2.4.1 Glukokortikoide	19
1.2.4.2 Cyclophosphamid	21
1.2.4.3 Azathioprin und Mycophenolat-Mofetil	22
1.2.4.4 Rituximab	22
1.2.4.5 Calcineurin-Inhibitoren	24
1.2.4.6 Eculizumab	25
1.2.4.7 Plasmapherese	25
<b>1.3 Experimentelle Glomerulonephritis: Nephrotoxische Serum Nephritis</b>	<b>26</b>
1.3.1 Allgemein	26
1.3.2 Die NTS als Modell einer Glomerulonephritis	27

1.3.3	Pathohistologie und Klinik	28
1.3.4	Die immunologischen Mechanismen der NTS	28
1.3.4.1	Renale Dendritische Zellen	29
1.3.4.2	Das adaptives Immunsystem in der NTS	32
1.3.4.2.1	CD4 <sup>+</sup> Zellen	32
1.3.4.2.2	γδ-T-Zellen	33
1.3.4.2.3	Die Rekrutierung angeborener Immunzellen durch T-Zellen	34
1.3.4.2.4	CD8 <sup>+</sup> Zellen	36
1.3.4.2.5	Regulation der immunologischen Abläufe	37
1.3.4.2.6	B-Lymphozyten	39
1.3.4.3	Das angeborene Immunsystem	40
1.3.4.3.1	Die Initiierung der Entzündungsreaktion	40
1.3.4.3.2	Die „Waffen“ des angeborenen Immunsystems und Gewebeschäden	42
1.3.4.3.2.1	Neutrophile Granulozyten	43
1.3.4.3.2.2	Makrophagen	44
<b>1.4</b>	<b>Costimulation</b>	<b>45</b>
1.4.1	Der T-Zell-Rezeptor-Komplex und seine Signalwege	46
1.4.2	Costimulation und die CD28-Familie	48
1.4.3	Die TNF-Rezeptor-Superfamilie	49
1.4.4	Ox40	52
1.4.4.1	Ox40-Expression	52
1.4.4.2	Signalwege durch die Ox40-Achse	53
1.4.4.3	Effekte der Ox40-Achse	54
1.4.4.4	Ox40 in Krankheit und experimentellen Tiermodellen	57
1.4.4.5	Ox40-Defizienz im Menschen	59
1.4.4.6	Therapeutische Nutzung	60
1.4.5	CD30	61
1.4.5.1	Die CD30-Achse und ihre Signalwege	61
1.4.5.2	CD30-Expression	61
1.4.5.3	Effekte der CD30-Achse	62
1.4.5.4	CD30 in Krankheit und experimentellen Tiermodellen	63
1.4.5.5	Therapeutische Nutzung	64
1.4.6	Therapeutische Anwendung costimulierender Signale	65
1.4.6.1	TNF-α Blockade	65
1.4.6.2	CTLA-4-Immunglobuline	66
1.4.6.3	CD40-Blockade	66
<b>1.5</b>	<b>Vorbestehende Daten (unpublizierte Daten von Artinger et al.)</b>	<b>67</b>
1.5.1	Nephritische Mäuse exprimieren vermehrt CD30, Ox40 und deren Liganden auf CD4 <sup>+</sup> Zellen	67
1.5.2	CD30/Ox40 <sup>-/-</sup> Mäuse sind vor der NTS geschützt	67
1.5.3	Die kombinierte therapeutische Antikörperblockade von CD30L und Ox40L verbessern den Phänotyp der NTS	68
1.5.4	Zusammenfassung	68
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>70</b>
<b>2.1</b>	<b>Mäuse</b>	<b>70</b>
2.1.1	Rag1 <sup>-/-</sup> Mäuse	70
2.1.2	CD30/Ox40 <sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse	71

2.1.2.1	Genotypisierung	71
<b>2.2</b>	<b>Gewinnung des NTS-Serums</b>	<b>73</b>
2.2.1	Gewinnung der Antigene	73
2.2.3	Immunisierung gegen die isolierten Antigene	74
<b>2.3</b>	<b>Isolation der CD4<sup>+</sup> Zellen</b>	<b>75</b>
2.3.1	Grundprinzipien der Zellisolation	75
2.3.2	CD4 <sup>+</sup> Zell Isolation aus Wildtyp- oder Knockout-Mäusen	75
<b>2.4</b>	<b>Zelltransfer</b>	<b>76</b>
<b>2.5</b>	<b>NTS-Induktion</b>	<b>77</b>
<b>2.6</b>	<b>Bestimmung des Albumin-Kreatinin-Quotienten</b>	<b>78</b>
2.6.1	Albumin-ELISA	80
2.6.2	Kreatinin-Assay	81
<b>2.7</b>	<b>BUN-Level</b>	<b>81</b>
2.7.1	Harnstoff-Stickstoff	81
2.7.2	Kolorimetrische Bestimmung	82
<b>2.8</b>	<b>PAS-Färbung</b>	<b>82</b>
<b>2.9</b>	<b>Immunhistochemie</b>	<b>83</b>
2.9.1	CD4	84
2.9.2	CD68	84
2.9.3	Ly6G	84
2.9.4	Durchführung	85
<b>2.10</b>	<b>Statistische Auswertung und Darstellung</b>	<b>86</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE – RESULTATE</b>	<b>88</b>
<b>3.1</b>	<b>Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse sind vor der NTS geschützt, wenn transferierte CD4<sup>+</sup> Zellen weder CD30 noch Ox40 exprimieren</b>	<b>88</b>
3.1.1	Albuminurie	88
3.1.2	BUN-Level	88
3.1.3	PAS-Score	89
<b>3.2</b>	<b>Immunhistochemische Färbungen zeigen massive Unterschiede in der Menge infiltrierender Immunzellen in die Niere</b>	<b>90</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>99</b>

# Glossar und Abkürzungen

## A

ANA *antinukleäre Antikörper*  
ANCA *Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper*  
AP-1 *Aktivator-Protein-1*  
APCs *Antigen-präsentierende Zellen*  
ATP *Adenosintriphosphat*

## B

BCR *B-Zell-Rezeptor*  
BSA *engl. bovine serum albumin*  
BTLA *engl. B- and T-lymphocyte attenuator*  
BUN *engl. blood urea nitrogen*

## C

CD *Cluster of Differentiation*  
CD30L *CD30 Ligand*  
CTLA-4 *engl. cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*

## D

DAMP *engl. Damage-associated molecular pattern*  
DC *Dendritischen Zellen*  
DNA *Desoxyribonukleinsäure*

## E

EAE *experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis*  
ELISA *engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

## F

FADD *engl. Fas-associated protein with death domain*  
FoxP3 *Forkhead-Box-Protein P3*

## G

GBM *glomeruläre Basalmembran*  
GN *Glomerulonephritis*  
GR *Glukokortikoidrezeptor*  
GREs *engl. Glucocorticoid Response Elements*

## H

HLA *engl. Human Leucocyte Antigen*  
HPF *engl. high power field*

## I

ICAM *engl. intercellular adhesion molecule*  
IFN *Interferon*  
Ig *Immunglobulin*  
IL *Interleukin*  
iNKT *invarianten natürlichen Killer-T-Zellen*  
ITAMS *engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*

iT<sub>reg</sub> *induzierte regulatorische T-Zellen*

## K

KO *Knockout*

## L

LPF *engl. low power field*

## M

MAP *engl. mitogen-activated protein*  
MCP *engl. Monocyte chemoattractant protein*  
MHC *engl. major histocompatibility complex*  
MM *Mastermix*  
MMF *Mycophenolat-Mofetil*  
MPO *Myeloperoxidase*  
mTOR *engl. mammalian target of rapamycin*

## N

NFκB *engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*  
NFAT *engl. nuclear factor of activated T-cells*  
NOD *engl. Non-Obese Diabetic*  
nT<sub>reg</sub> *natürliche regulatorische T-Zellen*  
NTS *nephrotoxischen Serum Nephritis*

## O

OD *engl. optical density*  
Ox40L *Ox40 Ligand*

## P

PAS *engl. Periodic acid-Schiff reaction*  
PBS *engl. phosphate-buffered saline*  
PCR *engl. polymerase chain reaction*  
PD-1 *engl. Programmed cell death protein 1*  
PI3-K *Phosphoinositid-3-Kinase*  
PIP<sub>3</sub> *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat*  
PLC-γ *Phosphoinositid-Phospholipase C-γ*  
PR3 *Proteinase 3*  
PRR *Pattern-Recognition-Rezeptoren*

## R

Rag1 *engl. recombination activation gene 1*  
rDC *renale dendritische Zellen*  
RNA *Ribonukleinsäure*  
RORγt *engl. RAR-related orphan receptor γt*  
ROS *reaktiven Sauerstoffspezies*  
RPGN *rapid-progressive Glomerulonephritis*

## S

SLE *systemischer Lupus erythematoses*

## **T**

TCR *T-Zell-Rezeptor*  
TLR *Toll-like-Rezeptor*  
TNF *Tumornekrosefaktor*  
TNFRSF *Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie*  
TRADD *engl. Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*  
TRAF *TNR-Rezeptor-assoziiierter-Faktor*  
T<sub>reg</sub> *regulatorische T-Zellen*

TTP *Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura*

## **V**

VCAM *engl. vascular cell adhesion molecule*

## **W**

WT *Wildtyp*

# Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: AUFBAU EINES GLOMERULUMS.	3
ABBILDUNG 2: GLOMERULONEPHRITIS MIT HALBMONDBILDUNG.	5
ABBILDUNG 3: T-ZELL-REZEPTOR-KOMPLEX.	47
ABBILDUNG 4: GELELEKTROPHORESE ZUR GENOTYPISIERUNG.	73
ABBILDUNG 5: CD4 <sup>+</sup> ZELLTRANSFER IN RAG1 <sup>-/-</sup> MÄUSE.	77
ABBILDUNG 6: ALBUMINURIE (ALBUMIN-KREATININ-QUOTIENT) AN TAG 14 NACH NTS-INDUKTION.	88
ABBILDUNG 7: BLUT-HARNSTOFF-STICKSTOFFKONZENTRATIONEN AN TAG 14 NACH NTS-INDUKTION.	89
ABBILDUNG 8: NIERENPRÄPARATE IN PAS FÄRBUNG.	89
ABBILDUNG 9: DARSTELLUNG DES PAS-SCORE.	90
ABBILDUNG 10: CD4 <sup>+</sup> ZELLEN UND NEUTROPHILE PRO 6 HPFS.	91
ABBILDUNG 11: CD68-STAINING SCORE.	91
ABBILDUNG 12: NIERENPRÄPARATE NACH IMMUNHISTOCHEMISCHER FÄRBUNG.	92

## **Tabellenverzeichnis**

TABELLE 1: KLINIK DES NEPHRITISCHEN UND NEPHROTISCHEN SYNDROMS.	2
TABELLE 2: DIAGNOSEKRITERIEN SLE.	13
TABELLE 3: AUSGEWÄHLTE REZEPTOREN DER TNF-REZEPTOR-SUPERFAMILIE.	50

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Niere und die glomeruläre Filtration

Kaum ein anderes Organ übernimmt derart vielfältige und komplexe Funktionen zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Organismus wie die Niere. Die Aufgaben der Nieren umfassen dabei neben den offensichtlichen Funktionen als Ausscheidungsorgan und damit der Beseitigung harnpflichtiger Substanzen auch die Aufrechterhaltung von Elektrolyt-, Säure-Basen- und Wasserhaushalt, die Produktion wichtiger Hormone und metabolische Funktionen in einer Reihe von Stoffwechselprozessen. Hinzu kommt eine zentrale Beteiligung an der Einstellung des arteriellen Blutdrucks (1, 2). Das paarig angelegte Organ gliedert sich in mehrere Lobi renales, welche wiederum aus einer äußeren Rinde (Cortex) und der Medulla bestehen und schließlich ins Kelchsystem der Niere münden. In der Rinde findet man die zahlreichen Glomeruli der Niere mit ihren efferenten und afferenten Arteriolen sowie den proximalen und distalen Konvoluten des Tubulussystems (3). Funktionell ist es so, dass der durch die Glomeruli gefilterte Primärharn aus der Bowman-Kapsel in das Tubulussystem gelangt (siehe auch Kapitel 1.2.1). Die Tubuli ziehen anschließend eine Schleife durch das Nierenmark an deren Ende sie in der Rinde wieder unmittelbaren Kontakt mit ihren Glomeruli (distales Konvolut) aufnehmen um anschließend mit anderen Tubuli in einem Sammelrohr zusammenzulaufen. Die Sammelrohre münden schließlich im Kelchsystem der Nieren von wo aus der endgültige Harn schließlich über den Ureter in die Blase gelangt (1, 3). Für die Nierenfunktion wichtig ist demnach die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), also das durch die Gesamtheit der Glomeruli pro Zeiteinheit filtrierte Volumen. Dieses ist neben dem effektiven Filtrationsdruck von der Durchlässigkeit des glomerulären Filters (hydraulische Leitfähigkeit) und der glomerulären Filterfläche abhängig (1). Schäden im Bereich der Glomeruli können entsprechend die GFR beeinträchtigen und dadurch zur Einschränkung der Nierenfunktion führen. Solchen Schäden können viele Ursachen zugrunde liegen. Solche sind z. B. arterieller Hypertonus und Arteriosklerose aber auch vielfältige inflammatorische Prozesse, zusammengefasst als Glomerulonephritiden (2). Die klinischen Folgen neben dem Verlust der Nierenfunktion sind vielfältig. Kommt es zu Schäden im glomerulären Filter können Plasmaproteine sowie Erythrozyten diesen überwinden. Die Folge sind Hämaturie und Proteinurie. Der Proteinverlust über die Nieren kann so groß sein, dass der sinkende onkotische Druck zur Ausbildung von Ödemen führt. Durch Kompensationsmechanismen wird versucht die verminderte glomeruläre Filtration durch eine vermehrte Nierendurchblutung auszugleichen. Es resultiert ein arterieller Hypertonus (2, 4). Diese Symptome glomerulärer

Erkrankungen können in verschiedenen Syndromen klinisch beschrieben werden. Nephritisches und nephrotisches Syndrom werden in Tabelle 1 zusammengefasst. Darüber hinaus sind auch milde Verläufe mit geringer Proteinurie oder Mikrohämaturie möglich (5, 6).

<b>Nephritisches Syndrom</b>	<b>Nephrotisches Syndrom</b>
Hämaturie, subnephrotische Proteinurie, art. Hypertonie, Oligurie/Anurie	Proteinurie (> 3,5 g in 24 h), Hypoalbuminämie, Ödeme, Hyperlipidämie

**Tabelle 1: Klinik des nephritischen und nephrotischen Syndroms.**

Zusammengefasst nach Khanna R. *Clinical presentation & management of glomerular diseases: hematuria, nephritic & nephrotic syndrome* und Chadban SJ, Atkins RC. *Glomerulonephritis* (5, 6).

## **1.2 Glomerulonephritis**

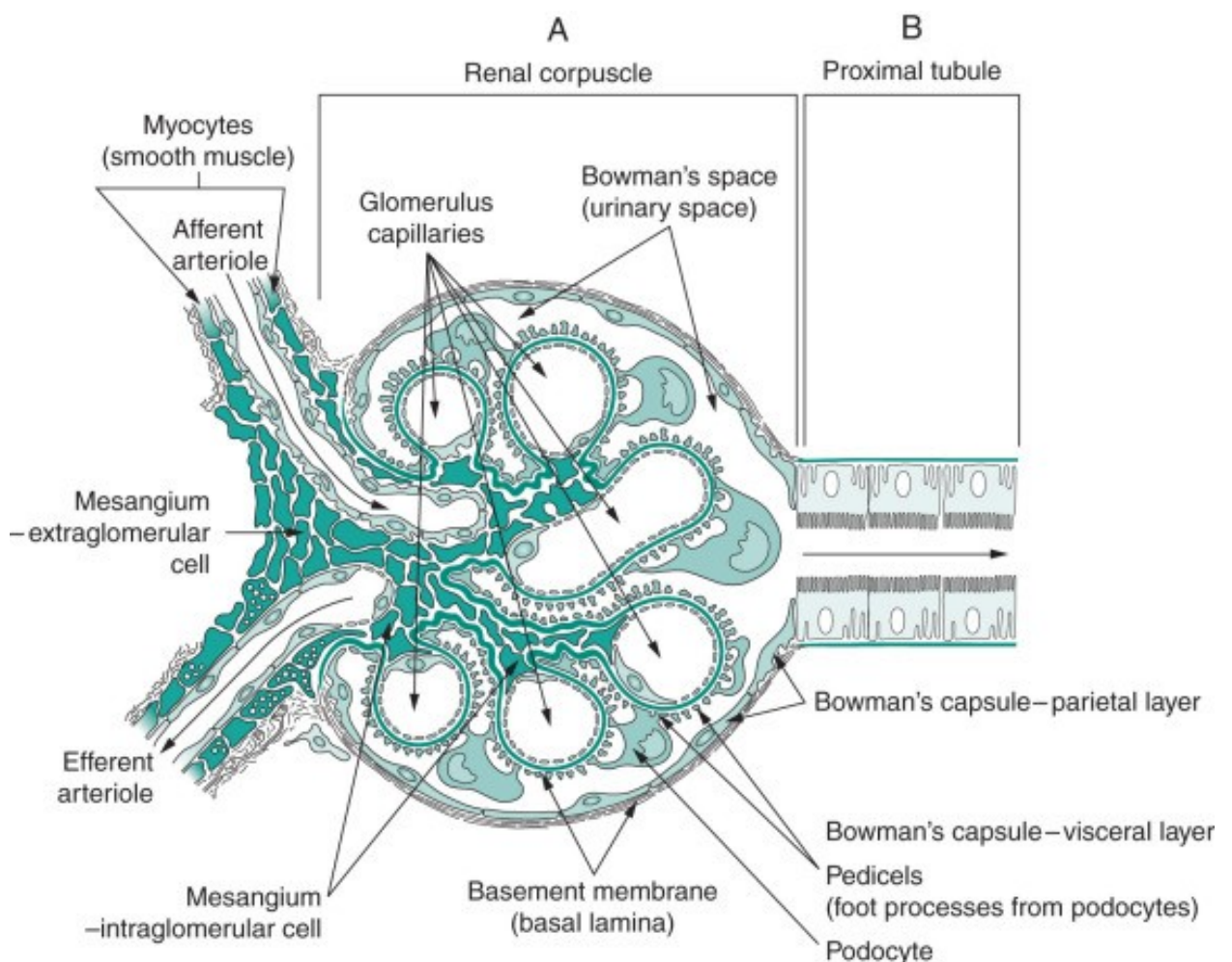
Das Wort Glomerulonephritis (GN) ist ein komplexer Sammelbegriff zahlreicher heterogener Erkrankungen, welche alle eine Inflammation im Bereich der Glomeruli unterschiedlichster Ursache gemeinsam haben. Es fällt daher schwer über Glomerulonephritiden zu sprechen, ohne eine spezifische Entität dieser Erkrankungen in den Fokus zu setzen. Gemeinsamkeiten dieser Erkrankungen bestehen auch in der klinischen Präsentation sowie den immunsuppressiven Therapien. Der Begriff der Glomerulonephritis sollte nicht mit glomerulären Erkrankungen im weiteren Sinne verwechselt werden. Solche können auch auf Grund bestimmter Mutationen, arteriellem Hypertonus, Thrombosen, Diabetes Mellitus und einigen anderen Ursachen auftreten. Hier soll es um die immunologisch-entzündlichen Erkrankungen gehen, welche auch im Rahmen von Systemerkrankungen auftreten können (7).

### **1.2.1 Morphologien der Glomerulonephritiden**

Bevor man sich jedoch mit der Glomerulonephritis auseinandersetzt, sollte man sich mit dem Aufbau des Glomerulums vertraut gemacht haben (vgl. Abbildung 1).

Zentraler Bestandteil eines Glomerulums ist ein Kapillarknäuel, welches durch eine zuführende Arteriole gespeist wird und in einer abführenden Arteriole mündet. Dieses Knäuel ist von der sogenannten Bowman-Kapsel umgeben. Gebildet wird diese Kapsel aus einem Epithel von Parietalzellen aufgehängt an einer Basalmembran. Zwischen Kapsel und Kapillarknäuel erstreckt sich eine Art freier Raum, in welchem das glomeruläre Filtrat gesammelt und anschließend in das Tubulussystem drainiert werden kann. Stellt man sich den Weg vom Inneren einer Kapillare in den Kapselraum vor, müssen folgende Schichten

überwunden werden: Zunächst sind Kapillaren mit Endothelzellen ausgekleidet, welche in direktem Kontakt mit ihrer Basalmembran stehen. Die glomeruläre Basalmembran (GBM) stellt also die nächste Schicht nach dem Kapillarendothel dar und wird nach außen in Richtung Kapselraum von den sogenannten Podozyten aufgelagert. Podozyten umschlingen mit ihren Fußfortsätzen die Kapillaren bzw. Basalmembran und stellen damit die letzte Schicht des glomerulären Filters dar. Die Kapillarschlingen sind innen von einer Art Gerüst gestützt, welches als Mesangium bezeichnet wird. Das Mesangium besteht aus Mesangiumzellen und einer Matrix (2, 8).



**Abbildung 1: Aufbau eines Glomerulums.**

*A: Glomerulum (Renal corpuscle). B: Proximaler Tubulus (Proximal tubule). 1: Basalmembran (Basement membrane). 2: Parietalzellen (Parietal layer). 3: viszerales Blatt d. Bowman Kapsel (Bowman's capsule visceral layer) 4: Podozyten (Podocyte). 5: Fußfortsätze (Pedicels). 6: Kapselraum (Bowman's space). 7: Mesangiumzellen (extraglomerular and intraglomerular cells). 8: Muskelzellen d. Arteriolen (Myocytes). 9: Arteriola afferens (Afferent arteriole). 10: glomeruläre Kapillaren (Glomerulus capillaries). 11: Arteriola efferens (Efferent arteriole).*

Quelle: Übernommen aus Dean DF, Molitoris BA. Chapter 7 - The Physiology of the Glomerulus. In: Ronco C, Bellomo R, Kellum JA, Ricci Z, editors. *Critical Care Nephrology* (3. Edition) (8) mit Erlaubnis von Elsevier.

Bevor man die komplexen Mechanismen hinter den Glomerulonephritiden verstanden hatte, wurden diese nach ihrem histologischen Erscheinungsbild eingeteilt. Diese Einteilung entspricht nur bedingt den zugrundeliegenden Mechanismen und wird damit als nicht ausreichend betrachtet, diese Erkrankungen in ihrem Umfang zu verstehen (6, 9). Dennoch sollen sie an dieser Stelle als Einstieg in dieses vielfältige Thema dienen.

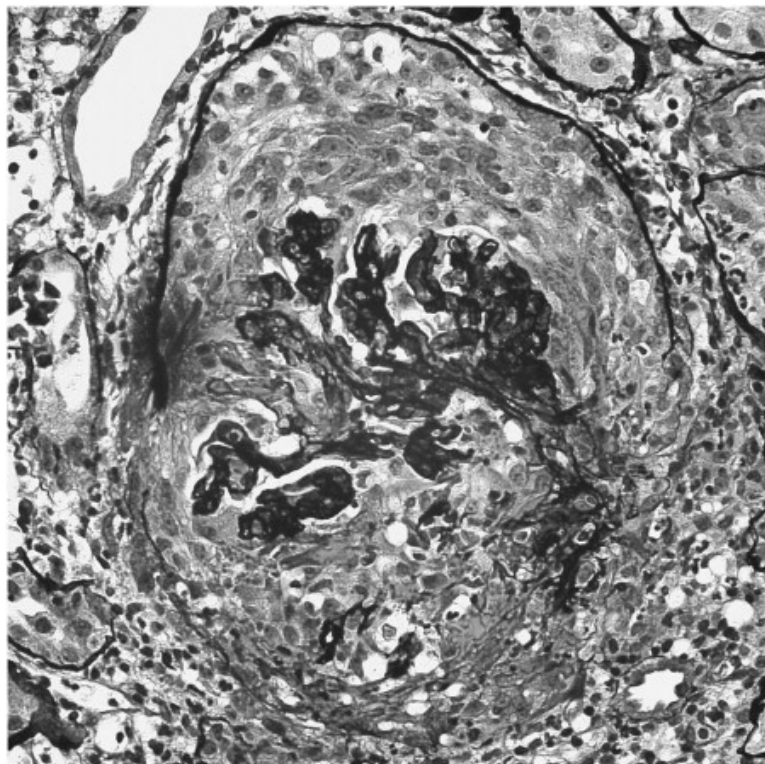
In der klassischen histopathologischen Beschreibung wird das Befallsmuster der Glomeruli beschrieben. Sind alle Glomeruli im Rahmen einer Erkrankung befallen, spricht man in der Pathologie von einer diffusen GN. Herdförmige Befallsmuster, die zum Beispiel weniger als 50% der Glomeruli betreffen, werden dagegen als fokal bezeichnet. Auch der Befall innerhalb eines Glomerulums lässt sich beschreiben. Dabei unterscheidet man eine globale GN mit sichtbaren Schäden beinahe aller Kapillarschlingen von einer segmentalen GN, in welcher nur einzelne Schlingen betroffen sind (7).

Neben den Kapillarschlingen können natürlich auch weitere Strukturen histologische Auffälligkeiten zeigen. Parietalzellen der Kapsel zeigen eventuell eine vermehrte Proliferation bis hin zur Bildung von Halbmonden. Auch das Mesangium kann vermehrt proliferieren bzw. seine Matrix vermehren. Entlang von Basalmembranen kann es zu Ablagerungen und Änderungen ihrer Beschaffenheit kommen. Endothel und Kapillarschlingen können nekrotisieren, proliferieren oder schwellen und auch Podozyten können von Schäden bis hin zu Nekrosen betroffen sein. Auf solche Veränderungen bezieht sich die klassische, aber ziemlich komplizierte pathologische Einteilung der Glomerulonephritiden (7).

### **1.2.2 Diffuse extrakapilläre Glomerulonephritis**

Wie bereits erwähnt sollte die Einteilung der Glomerulonephritiden nach Pathophysiologie bevorzugt werden. Dennoch soll an dieser Stelle gesondert der primär histologische Begriff der diffusen extrakapillären GN beschrieben werden. Dabei handelt es sich um eine besonders schwere Form eines glomerulären Schädigungsmusters, welches klinisch häufig mit einem rapid-progressiven Verlauf einhergeht. Der Begriff der rapid-progressiven Glomerulonephritis (RPGN) wird deswegen häufig als Synonym verwendet (7). Verschiedene Entitäten der GN können histologisch und klinisch zum Bild einer solchen RPGN führen. Häufig wird die Anti-GBM-GN mit dem Bild einer RPGN in Verbindung gebracht, es können jedoch auch Pauci-Immun und Immunkomplex-vermittelte Glomerulonephritiden eine derartige Präsentation zeigen (10). Je nach Ursache kann sich das immunhistochemische Bild unterscheiden. Lichtmikroskopisch aber zeichnet sich diese schwere Form der GN durch die Bildung sogenannter Halbmonde aus, welche unter anderem

aus der Proliferation des extrakapillären Kapselepitheles hervorgehen (Abbildung 2). Ebenfalls klassisch sind das Vorkommen von Kapillarschlingennekrosen sowie sichtbare Ansammlungen von Fibrin zwischen nekrotischen Schlingen und proliferierendem Kapselepithel (7). Zunehmend beginnt man zu verstehen, dass an der Halbmondbildung auch proliferierende Podozyten und Fibroblasten beteiligt sind. Auch die Aktivierung von Gerinnungsfaktoren und Ausbildung von Fibrinansammlungen scheinen nicht Folge, sondern eher mitverantwortlich für die extrakapilläre Proliferation zu sein (10). Natürlich sind auch durch z. B. Immunkomplexe vermittelte inflammatorischen Reaktionen und Kapillarnektrosen essenziell für die Ausbildung dieses typischen histologischen Bildes. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die extrakapilläre GN aus einem komplexen Zusammenspiel zwischen Kapillarschäden, dem Gerinnungssystem sowie verschiedenen intrinsischen und immunologischen Zellen hervorgeht, wobei inflammatorische Mechanismen unterschiedlicher Ursache den Auslöser darstellen (10). Stellvertretend für diese inflammatorischen Mechanismen werden in Kapitel 1.3.4 die genauen immunologischen Vorgänge in einem naheliegenden Mausmodell erläutert.



**Abbildung 2: Glomerulonephritis mit Halbmondbildung.**

*Dargestellt ist das histologische Bild eines Glomerulums eines Patienten mit Anti-GBM-Krankheit. Das Glomerulum zeigt eine deutliche extrakapilläre Proliferation mit Halbmondbildung und Fibrin-Ablagerungen. Besonders im unteren Bereich zeigen sich schwere glomeruläre Schäden mit Rupturen der Bowman-Kapsel.*

*Quelle: Abbildung übernommen aus Henderson L, Turner N. Chapter 11 Anti-GBM Disease: Mechanisms, Clinical Features, and Treatment. In: Mason JC, Pusey CD, editors. Handbook of Systemic Autoimmune Diseases (11) mit Erlaubnis von Elsevier.*

Klinisch ist die RPGN mit einem nephritischen Syndrom und rascher progredienter Verschlechterung der Nierenfunktion vergesellschaftet. Dabei kann es neben der mikroskopischen oder seltener makroskopischen Hämaturie auch zur Proteinurie unterschiedlicher Ausprägung kommen (6, 12). Ohne Therapie führt eine RPGN in kurzer Zeit zur hochgradigen dialysepflichtigen Niereninsuffizienz. Um das Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten und den irreversiblen Verlust der Nierenfunktion zu unterbinden, sind eine frühe Diagnosestellung und Therapieeinleitung elementar. Wichtigste Prognosefaktoren stellen die restliche Nierenfunktion sowie der Anteil betroffener Glomeruli dar. Insbesondere initial dialysepflichtige Patientinnen und Patienten weisen in Hinblick auf den Erhalt ihrer Nierenfunktion eine sehr schlechte Prognose auf (12).

### **1.2.3 Formen der Glomerulonephritis nach ihrer Pathophysiologie**

Lange wurden Glomerulonephritiden nach ihrem histologischen Erscheinungsbild eingeteilt. Mit zunehmendem Verständnis der komplexen Pathomechanismen hinter glomerulären inflammatorischen Erkrankungen entstand zunehmend der Anspruch eine sinnvollere und einheitliche Klassifikation einzuführen. Im Jahr 2015 trafen führende Pathologen und Pathologinnen sowie Nephrologen und Nephrologinnen in Rochester (USA) zusammen, um ein neues Klassifikationssystem zu etablieren. Dieses sollte sich an der Ätiologie bzw. Pathophysiologie der Erkrankungen orientieren und Ordnung in das Chaos dieser Erkrankungsgruppe bringen. Ziel dabei war auch ein einheitliches System für die Beschreibung von Biopsien einzuführen und damit ein international einheitliches System für die Erfassung von Glomerulonephritiden zu ermöglichen. Die Ergebnisse dieses Zusammentreffens wurden im *Mayo Clinic/Renal Pathology Society Consensus Report on Pathologic Classification, Diagnosis, and Reporting of GN* publiziert (9).

#### **1.2.3.1 Einteilung nach Pathophysiologie**

Folgende Klassifikation wurde darin vorgeschlagen:

Die Pathophysiologie der Glomerulonephritis wird in fünf Gruppen eingeteilt (9).

- 1.) Immunkomplex GN: Ablagerungen von polyklonalen Immunglobulinen und Komplementfaktoren.
- 2.) Pauci-Immun GN: Meist mit Anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) assoziierte Gruppe ohne relevante Immunkomplexablagerungen.
- 3.) Anti-GBM Glomerulonephritis: Zirkulierende Anti-GBM Antikörper setzen sich an der glomerulären Basalmembran ab.

- 4.) Monoklonale Immunglobulin GN: Die hier entstehenden Immunglobulin-Ablagerungen sind von monoklonaler Natur und meist mit entsprechenden Erkrankungen wie z. B. monoklonalen Gammopathien assoziiert.
- 5.) C3 Glomerulopathie: Hier kommt es zur Ablagerung des Komplementfaktors C3 durch Störungen im Komplementsystem selber ohne eine relevante bzw. ursächliche Immunglobulin-Assoziation.

Für Rückschlüsse auf die Pathophysiologie sind die Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz von besonderer Bedeutung. Auch der Nachweis zirkulierender Autoantikörper kann hilfreich sein. Die genannten Gruppen entsprechen dabei jedoch keinen bestimmten Krankheitsentitäten. Falls diese bekannt ist, sollte die GN auch als solche bezeichnet werden (z. B. Lupus-Glomerulonephritis und IgA-Nephropathie in der Gruppe der Immunkomplex GNs). Erst wenn eine Ätiologie bzw. Entität festgelegt wurde, wird das glomeruläre Schädigungsmuster beschrieben. Dies ist auch deswegen sinnvoll, weil die Beschreibung eines solchen häufig nicht eindeutig einer bestimmten Erkrankung zugeteilt werden kann. Dennoch gibt es natürlich durchaus histologische Bilder, die für eine bestimmte Pathophysiologie typisch sind (9).

### **1.2.3.2 Immunkomplex Glomerulonephritiden**

#### ***1.2.3.2.1 IgA-Nephropathie***

Bei dieser, auch als *Morbus Berger* bezeichneten Erkrankung, führen mesangiale Ablagerungen von Immunglobulin-A (IgA) zum Bild einer Glomerulonephritis. Diese ist dabei die weltweit am häufigsten auftretende Form einer GN. Klinik und Präsentation können stark variieren. Asymptomatische Verläufe mit Mikrohämaturie sind genauso wie ein nephrotisches Syndrom bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz möglich. Das Durchschnittsalter liegt bei 30 Jahren, wobei sowohl Kinder im Volksschulalter als auch Erwachsene vor der Pension betroffen sein können (7). Unterschieden wird außerdem eine primäre von einer sekundären Form. Bei der sekundären Form kommt es im Rahmen einer Grunderkrankung, z. B. unter Beteiligung der Leber, zum Auftreten der IgA-Nephritis (13). IgA ist besonders mit Schleimhäuten assoziiert und stellt den häufigsten Immunglobulin-Subtyp im Menschen dar. Im Blut ist es nach IgG immerhin das zweithäufigste zirkulierende Immunglobulin. Die Clearance von IgA findet zu einem relevanten Teil in der Leber statt, aber auch Milz und Niere sind daran beteiligt. Mesangiumzellen exprimieren bestimmte Rezeptoren, die für die IgA-Clearance bedeutend zu sein scheinen. Kommt es zu einem Ungleichgewicht aus Anfall dieser Immunglobuline und deren Clearance, kann eine

vermehrte Ablagerungen in den Nieren resultieren (13). Das Vorkommen von IgA-Ablagerungen in der Niere ist dabei auch in gesunden Personen der Normalbevölkerung zu beobachten. Schlussendlich beteiligt an der Entstehung der Erkrankung sind neben einer verminderten Clearance Besonderheiten von IgA-Rezeptoren sowie vermehrtes Vorkommen bestimmter IgA-Subgruppen. Auch das Komplementsystem scheint wesentlich zum individuellen Risiko einer IgA-Nephropathie beizutragen (13). Suzuki et al. entwickelten ein konkretes Modell der Pathophysiologie von IgA-Nephritiden. Zentral sind danach untypisch glykosylierte IgA-Subpopulationen, gegen welche in weiterer Folge andere Antikörper gebildet werden. Dadurch entstehen zirkulierende Immunkomplexe, welche sich schließlich im renalen Mesangium ansammeln (14). Neben dem immunhistologischen Nachweis mesangialer IgA-Ablagerungen, zeigt sich ein vielseitiges histologisches Schädigungsmuster. Die häufig verwendete Oxford Klassifikation der IgA-Nephritis bezieht sich dabei auf vier histologische Merkmale: Mesangiale Hyperzellularität, endokapilläre Hyperzellularität, segmentale Glomerulosklerose sowie tubuläre Atrophie oder interstitielle Fibrose. Das histologische Bild stellt einen wichtigen Prognosefaktor dar (7, 13, 15).

#### ***1.2.3.2.2 Akute postinfektiöse Glomerulonephritis***

Glomerulonephritiden können in Folge verschiedener Infektionen auftreten. Besonders bekannt ist die sogenannte Poststreptokokken-GN, die überwiegend Kinder im ersten Lebensjahrzehnt betrifft und in Folge einer Infektion mit  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken auftritt. Es gibt noch weitere Erreger die gehäuft mit Glomerulonephritiden assoziiert sind. Zu diesen gehören Hepatitis B- und C-Viren, Endokarditis-Erreger wie *Staphylococcus aureus*, Mykobakterien, aber auch Pilze und Parasiten (7, 16). Die Pathophysiologie postinfektiöser Glomerulonephritiden ist nicht mit Sicherheit geklärt, beinhaltet aber die Ansammlung von Immunkomplexen im Bereich der Glomeruli. Als Ursache dieser Ansammlungen werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert: Präformierte Antigen-Antikörper-Komplexe, die im Rahmen der Immunreaktionen gegen entsprechende Erreger entstehen, werden im Komplex in die Glomeruli eingeschwemmt. Alternativ kann es zur Einschwemmung und Adhärenz von Antigenen selber kommen, was in Folge die Bildung von Immunkomplexen verursacht. Eine dritte Möglichkeit ist das Vorliegen von Kreuzreaktionen gegen Bestandteile der Glomeruli, die im Rahmen der Immunantworten gegen bestimmte Erreger-Antigene entstehen (7, 16). Schlussendlich lassen sich häufig granuläre Immunkomplex-Ablagerungen entlang der GBM-Außenseite in immunhistochemischen Färbungen nachweisen. Morphologisch zeigen sich meist eine

Proliferation von Endothel und Mesangium mit eingeeengten Kapillaren. Aus histologischer Sicht werden postinfektiöse Glomerulonephritiden auch als diffuse endokapilläre GN beschrieben. Ablagerungen (sowohl Komplementfaktoren als auch Immunglobuline) lassen sich dabei teilweise auch im Mesangium nachweisen (7).

Die Poststreptokokken-GN tritt gewöhnlich Wochen nach einer Infektion mit  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken auf und präsentiert sich klinisch mit sehr unterschiedlichen Schweregraden. Völlig asymptomatische Verläufe sind häufig, schwere Krankheitsbilder mit der Ausbildung einer RPGN und Halbmondbildung eher selten. Die typische Symptomatik entspricht einem nephritischen Bild mit Hämaturie, Hypertonie, Ödemen und eingeschränkter Nierenfunktion. Auch eine Proteinurie bis hin zum nephrotischen Syndrom (3,5 g in 24 h mit Hypoalbuminämie, Hyperlipidämie und Ödemen (6)) ist möglich (16, 17). Insbesondere bei Kindern ist in der Regel mit einem milden Verlauf und guter Prognose zu rechnen. Die relativ selten betroffenen Erwachsenen, welche an einer Poststreptokokken-GN erkranken, haben eine schlechtere Prognose als Kinder und können im Rahmen der Erkrankung eine chronische Niereninsuffizienz entwickeln. Erwachsene die erkranken, sind meist durch Risikofaktoren wie Diabetes mellitus vorbelastet. Generell ist das Risiko nach Infektion mit Streptokokken eine GN zu entwickeln deutlich von weiteren Faktoren abhängig. Zu diesen gehört neben individuellen genetischen und immunologischen Veranlagungen auch der Erregerstamm der Streptokokken (17). Die Epidemiologie zeigt außerdem eine große geographische Varianz. Während in westlichen Nationen von einer Inzidenz deutlich unter 1 Erkrankung pro 100.000 Personen und Jahr ausgegangen wird, zeigen insbesondere Entwicklungsländer häufig ein vielfach höheres Auftreten. Obwohl postinfektiöse Glomerulonephritiden häufig mit Streptokokken-Infektionen assoziiert werden, haben diese Erkrankungen in den letzten Jahren deutlich abgenommen (17). Wesentlich relevanter werden dagegen Infektionen mit *Staphylokokkus aureus*, die zum Beispiel im Rahmen einer Endokarditis oder Pneumonie noch während der aktiven Infektion zum Bild einer GN führen können. Von dieser Erkrankung sind im Gegensatz zur Poststreptokokken-GN in erster Linie Erwachsene betroffen. Der Verlauf und die Prognose sind variabel, im Falle von Komorbidität aber häufig schwerwiegender. Akutes Nierenversagen, Hämaturie und schwere Proteinurie sind typisch. Histologisch zeigen sich in einem relevanten Anteil der Fälle Halbmondbildungen. Außerdem werden gehäuft Assoziationen mit IgA-Ablagerungen hergestellt, was für eine mögliche pathophysiologische Verbindung zu den IgA-Nephritiden sprechen könnte (16, 17).

### ***1.2.3.2.3 Lupus-Nephritis***

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine schwerwiegende Autoimmunerkrankung, welche nahezu alle Organsysteme betreffen kann. Die Lupus-Nephritis betrifft dabei bis zu 50% der SLE- Patienten und -Patientinnen und stellt einen wesentlichen Faktor für Prognose und Morbidität dar. Andere häufig betroffene Organsysteme und Strukturen sind die Haut, Gelenke sowie seröse Häute. Epidemiologisch zeigt sich eine relevante geographische und ethnische Varianz, wobei Frauen wesentlich häufiger betroffen sind als Männer. Die Prävalenz in Europa liegt zwischen 25 und 90 Fällen pro 100.000 Personen mit einem Altersgipfel zwischen 20 und 40 Jahren. An der Lupus-Nephritis erkranken am häufigsten junge Frauen bzw. weibliche Jugendliche mit afroamerikanischer Herkunft (18, 19).

Die Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung ist komplex und vielfältig. Einerseits gibt es bestimmte Autoantigene bzw. Autoantikörper, die eine zentrale Rolle in der Erkrankung einzunehmen scheinen. Andererseits sind diese Antikörper jedoch nicht ausreichend, um das Bild dieser Erkrankung zu erklären. Zusätzliche Faktoren müssen vorliegen, um eine völlige Dysregulation der Immunantworten loszutreten. Insgesamt sind bereits über 50 genetische Polymorphismen bekannt, die mit dem gehäuften Auftreten eines SLE assoziiert sind (20, 21). Besagte Autoantikörper sind gegen Bestandteile von Zellkernen wie z. B. DNA oder Histone gerichtet (sogenannte antinukleäre Antikörper = ANA). Am besten korrelieren dabei komplementbindende Anti-dsDNA-Antikörper mit einer Nierenbeteiligung im Sinne einer Lupus-Nephritis (19). Unter physiologischen Bedingungen würde die Immunogenität dieser Antigene nicht ausreichen, um im Organismus entsprechend schwere Immunantworten loszutreten. Dem Immunsystem müssen besagte Antigene zunächst in einem inflammatorischen Umfeld präsentiert werden um als fremd und pathologisch interpretiert zu werden. In Patientinnen und Patienten mit SLE scheinen dafür Veränderungen in der Apoptose und Autophagie wichtige Rollen zu spielen, welche zu einer veränderten Wahrnehmung des Immunsystems gegenüber diesen körpereigenen Antigenen führen. Möglicherweise sind auch Apoptoseprodukte selber, die nicht entsprechend im Organismus beseitigt werden, die Quelle pathologischer Autoantigene (22). Genetische Polymorphismen, die an Prozessen wie der Apoptose-Induktion oder Beseitigung apoptotischer Zellen beteiligt sind, können das Risiko einen SLE zu entwickeln erhöhen. Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) auf angeborenen Immunzellen treffen in solchen Fällen eher auf ihre Liganden, was weitere Entzündungsreaktionen initiiert bzw. verstärkt. Entsprechend sind auch genetische bzw. strukturelle Besonderheiten dieser Rezeptoren mit

einem höheren oder niedrigeren Risiko assoziiert (21). Auch Veränderungen im Komplementsystem erhöhen das Risiko an Lupus zu erkranken. Besonders Antikörper, die gegen Komplementfaktoren gerichtet sind, korrelieren mit der Erkrankung. Der Mechanismus dahinter könnte ein negativer Einfluss auf die Beseitigung komplementgebundener Immunkomplexe durch Makrophagen und Erythrozyten sein und könnte insbesondere bei der Ausbildung einer Lupus-Nephritis Bedeutung haben (18). Das Komplementsystem stellt aber auch unabhängig von solchen Antikörpern einen Risikofaktor dar. Genetische Polymorphismen sowohl von verschiedenen Komplementfaktoren als auch Komplementrezeptoren korrelieren mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko (21). Es lässt sich also festhalten, dass das Komplementsystem einerseits für die Beseitigung von Immunkomplexen und apoptotischem Material entscheidend ist und dass es andererseits angeborene Immunreaktionen gegen vorhandene Immunkomplexe verstärken kann. Außerdem kommen erniedrigte Konzentrationen von Komplementfaktoren im Serum häufig während akuten Lupus-Schüben vor (19). Natürlich spielen auch adaptive Immunmechanismen eine zentrale Rolle in der Pathogenese des SLE. Eine Konstante zwischen Lupus-Patienten und -Patientinnen ist das Vorhandensein von antigenspezifischen Autoantikörpern. Damit solche produziert werden, müssen entsprechende B-Zellen zu Plasmazellen aktiviert und stimuliert werden. Dies geschieht in streng regulierten Mechanismen zwischen angeborenem Immunsystem, dendritischen Zellen (DC) sowie T- und B-Zellen. Veränderungen an unterschiedlichsten Stellen dieser Interaktionen können zum Verlust der Toleranz adaptiver Immunzellen gegenüber körpereigenen Antigenen führen. Solche Veränderungen bzw. Polymorphismen können z. B. Bestandteile des B-Zell-Rezeptors oder von diesem ausgehender Signalwege sein. In gewisser Weise scheint die Empfindlichkeit von B-Zellen genetisch festgelegt zu sein (21, 23). Auch T-Zellen sind in vielerlei Hinsicht in die Pathogenese eingebunden. Eine der stärksten genetischen Assoziationen mit Lupus sind genetische Varianten der HLA-Komplexe (engl. Human Leucocyte Antigen). Die Mechanismen dahinter sind zwar noch nicht verstanden, eine Beteiligung von T-Zellen ist jedoch aufgrund derer Interaktion mit MHC-Molekülen (engl. major histocompatibility complex) wahrscheinlich (18, 24). Darüber hinaus zeigen T-Zellen in Lupus-Patienten und -Patientinnen eine erhöhte Aktivität, veränderte Subpopulationsmuster sowie genetische Polymorphismen costimulierender Rezeptoren und Liganden (18, 21, 23).

Die hier als Beispiele aufgeführten Risikofaktoren für die Pathogenese eines SLE bzw. einer Lupus-Nephritis sind keineswegs krankheitsdefinierend. Viele Faktoren wie beispielsweise

gewisse HLA Genotypen erhöhen auch das Risiko für andere immunologische Erkrankungen. Generell sind viele der hier genannten Faktoren eher als Normvarianten genetischer Vielfalt zu werten, die in Summe und bei gemeinsamen Vorkommen die Entwicklung einer solchen Autoimmunerkrankung verursachen können. Was also genau die Erkrankung SLE darstellt, ist schwierig zu erfassen. Die Diagnose „Lupus“ wird deswegen klinisch nach definierten Klassifikationskriterien gestellt. Zu diesen gehören nach *2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus* (25):

Das Vorhandensein eines ANA-Titers von mindestens 1:80. Lassen sich keine entsprechenden Titer nachweisen, sollte nicht von einem SLE gesprochen werden.

Zusätzlich werden Punkte für verschiedene Symptome verteilt. Diese beziehen sich auf unterschiedliche Organsysteme, wobei pro Organsystem nur das Symptom mit der höchsten Punktzahl hinzugezogen wird. Außerdem dürfen für das entsprechende Symptom keine naheliegenden alternativen Erklärungen vorliegen. Zusätzliche Punkte können immunologische Untersuchungen bringen. Tabelle 2 fasst die möglichen Symptome und Befunde zusammen. Insgesamt müssen mindestens 10 Punkte vorliegen, um das Krankheitsbild als SLE klassifizieren zu können. Diesen neuen Kriterien wird von den Autorinnen und Autoren eine Sensitivität von 96.1% und Spezifität von 93.4% zugeschrieben. Damit sind sie alten Kriterien überlegen (25).

<b>Organsystem/ Gruppe</b>	<b>Symptome/ Zeichen</b>	<b>Punkte</b>
Allgemein	Fieber	2
Hämatologie	Leukopenie	3
	Thrombozytopenie	4
	Autoimmunhämolyse	4
Neurologie/Psychologie	Delir	2
	Psychose	3
	Krampfanfälle	5
Dermatologie/ Haut	Alopezie	2
	Ulzerationen (oral)	2
	Subakut kutaner <b>oder</b>	4
	Diskoider Lupus	
	Akut kutaner Lupus	6

Seröse Häute	Pleura-/Perikarderguss	5
	Akute Perikarditis	6
Rheumatologie	Gelenkbeteiligung	6
Niere Nierenbiopsie/Lupusnephritis	Proteinurie > 0,5g pro 24h	4
	Klasse II oder V	8
	Klasse III oder IV	10
Antiphospholipid-AK	Cardiolipin-Antikörper od. β2-Glykoprotein-1- Antikörper od. Lupus-Antikoagulans	2
Komplementfaktoren	Niedrige C3 <b>oder</b> C4 Level	3
	Niedrige C3 <b>und</b> C4 Level	4
Autoantikörper (SLE-spezifisch)	Anti-ds-DNS <b>oder</b>	6
	Anti-Sm	

**Tabelle 2: Diagnosekriterien SLE.**

Dargestellt sind die Klassifikationskriterien und Punkte nach *2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus*. Neben den Eingangskriterien müssen 10 Punkte erreicht werden, um einen SLE diagnostizieren zu können (25).

Die Lupus-Nephritis stellt wahrscheinlich die größte Gefahr für Patientinnen und Patienten mit einem SLE dar. Trotz ihres oft asymptomatischen Verlaufs ist sie eine der häufigsten Todesursachen in Lupus-Patienten und -Patientinnen und hat ein hohes Risiko in eine terminale Niereninsuffizienz überzugehen. Klinisch präsentieren sich Patientinnen und Patienten mit Lupus-Nephritis durch eine Proteinurie, wobei deren Ausprägung vom histologischen Schädigungsmuster abhängig ist. Bei bis zur Hälfte aller Patientinnen und Patienten mit Nephritis entwickelt sich ein nephrotisches Syndrom mit Ödemen. Rund 80% der Patientinnen und Patienten zeigen eine Hämaturie, in wenigen Fällen ist diese makroskopisch sichtbar. Weitere häufige Manifestationen sind arterielle Hypertonie und Niereninsuffizienz mit Zunahme der Nierenretentionsparameter. Auch der Verlauf als rapid-progressive GN ist möglich (18, 19).

Das histologische Bild der Lupus-Nephritis wird nach der *International Society of Nephrology/Renal Pathology Society* in sechs Klassen unterteilt. Dabei sind die Klassen sowohl prognostisch als auch therapeutisch von Bedeutung. Während die Klasse I lichtmikroskopisch keine Veränderungen zeigt, zeigen sich durch Immunfluoreszenz oder

Immunhistochemie bereits mesangiale Immunkomplexablagerungen. Klinisch sind solche Patientinnen und Patienten unauffällig. In der Klasse II führen diese Immunkomplexe bereits zur Mesangiumzellproliferation. Klasse III und IV zeichnen sich durch mesangiale und subendotheliale Immunkomplexe aus sowie dem Bild einer endokapillären Proliferation. Liegt dabei eine segmentale endokapilläre Proliferation vor, von welcher weniger als 50% der Glomeruli betroffen sind, spricht man von Klasse III. Bei der Klasse IV liegt dagegen eine Beteiligung von über 50% vor. Ein histologischer Schaden dieser Ausprägung führt häufig zur Niereninsuffizienz und bei einigen Patientinnen und Patienten zum Bild eines nephrotischen Syndroms. Bei der Klasse V handelt es sich um massive subepitheliale Immunkomplexablagerungen in über 50% der Glomeruli mit häufig nephrotischer Proteinurie. Diese nicht-proliferative, membranöse GN entwickelt in den meisten Fällen keine relevante Niereninsuffizienz. Umso schwerwiegender ist dafür die Klasse VI mit schwerer Glomerulosklerose in über 90% aller Glomeruli und schwerer Niereninsuffizienz. Weitere mögliche histologische Bilder, die jedoch nicht in dieser Klassifikation erfasst werden, sind die seltene isolierte interstitielle Nephritis, die thrombotische Mikroangiopathie sowie Podozytopathie (18, 26). Zusätzlich sollten für alle histologischen Klassen die Aktivität und Chronizität durch Bestimmung des Aktivitäts- bzw. Chronizitätsindex evaluiert werden. Nach *Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis* (26) werden für die Aktivität Faktoren wie die endokapilläre Hyperzellularität, die Anwesenheit von Neutrophilen und Karyorrhesis, fibrinoide Nekrosen und hyaline Ablagerungen in den Glomeruli, die zelluläre Halbmondbildung und interstitielle Entzündungszeichen herangezogen. Daraus ergibt sich ein Score zwischen 0 und 24 Punkten. Der Chronizitätsindex ergibt sich demnach aus der Glomerulosklerose und fibrösen Halbmonden, tubulärer Atrophie sowie interstitieller Fibrose. Um die Chronizität semiquantitativ zu bestimmen ergibt sich dabei ein Score zwischen 0-12 Punkten (26).

### **1.2.3.3 Pauci-Immun Glomerulonephritis**

Bei dieser Gruppe von Glomerulonephritiden führen Autoantikörper zu einer Vaskulitis mit Beteiligung der Glomeruli. Der Begriff Pauci (*lat.* = *wenig, gering*) bezieht sich dabei auf die Menge von Immunkomplexablagerungen, welche das immunhistologische Bild nicht auf gleiche Weise prägen wie in andere Entitäten der GN. Ursächliche Autoantikörper werden als antineutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA) bezeichnet und sind gegen Antigene im Cytoplasma neutrophiler Granulozyten gerichtet. Die *2012 Revised*

*International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides* (27) definiert die ANCA-assoziierte Entzündung als nekrotisierende Vaskulitis kleiner Gefäße ohne wesentliche Immunkomplexablagerungen. Das histologische Bild zeigt typischerweise nekrotische Kapillarschlingen mit Exsudation von Fibrin und einen halbmondförmigen Umbau des Bowman-Kapselepithels durch Proliferation bis hin zur Glomerulosklerose. Dieses Bild wird histologisch auch als extrakapilläre oder fokal nekrotisierende Glomerulonephritis beschrieben (7). Im Falle der ANCA-assoziierten GN lassen sich nach histologischem Bild vier Klassen definieren. Bei der fokalen Klasse zeigen sich überwiegend (>50%) normale Glomeruli ohne die oben beschriebenen Veränderungen. Liegt in mehr als 50% der Glomeruli ein halbmondförmiger Umbau vor, klassifiziert man das Bild als „crescentic“ (*engl. halbmondförmig*), im Falle von mehr als 50% global sklerosierter Glomeruli als „sklerosierend“. Die vierte Klasse wird als „gemischt“ bezeichnet. Auch bei diesen Erkrankungen korreliert das histologische Bild mit Klinik und Prognose (28, 29).

Eine Pauci-Immun oder ANCA-assoziierte GN tritt vor allem nach dem 50. Lebensjahr auf (28). In früheren Lebensjahren ist sie zwar möglich, aber seltener. Meistens treten diese Glomerulonephritiden nicht isoliert auf (sogenannte *renal limited vasculitis*), sondern im Rahmen systemischer Erkrankungen. Diese sind die Mikroskopische Polyangiitis (MPA), Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) und Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA, auch als Churg-Strauss-Krankheit bezeichnet). Diese Erkrankungen werden durch ihr klinisches und histopathologisches Bild unterschieden. Eine Glomerulonephritis kann aber bei jeder dieser Vaskulitiden vorkommen (27, 28). Die für diese Erkrankungen wahrscheinlich mitverantwortlichen ANCA können gegen zwei bekannte Hauptantigene gerichtet sein. Diese sind die Myeloperoxidase (MPO) und Proteinase 3 (PR3). Die MPO-ANCA treten dabei in der Immunfluoreszenz als p-ANCA-Muster und die PR3-ANCA als c-ANCA-Muster auf. Zwischen diesen Antikörpern gibt es relevante epidemiologische Unterschiede. So ist das Risiko für verschiedene ANCA-Vaskulitis-Entitäten sowie Organmanifestationen unterschiedlich. Auch geographisch sind PR3- und MPO-ANCA ungleichmäßig verteilt. Außerdem scheint es Unterschiede in der Prognose beider Antikörper zu geben. Unabhängig davon stellen beide ANCA-Titer, insbesondere für die Niere, einen wesentlichen Indikator für die Krankheitsaktivität dar. Interessanterweise zeigen dagegen etwa 10% aller Patientinnen und Patienten negative Titer für beide ANCA (28). PR3 und MPO finden sich im Cytoplasma von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Kommt es zur Aktivierung der Granulozyten durch proinflammatorische Cytokine, werden PR3 und MPO vermehrt auf die Oberflächen dieser Zellen transportiert.

Dort sind sie für ihre spezifischen Antikörper erreichbar. Auf noch nicht abschließend geklärte Art und Weise führen die Interaktionen von ANCAs mit ihren Antigenen zur Aktivierung dieser neutrophilen Granulozyten. In weiterer Folge kommt es zur Adhäsion dieser Zellen an das Endothel und dort zu ihren toxischen Effekten. Wesentlich an diesen Mechanismen beteiligt sind außerdem Fcγ-Rezeptoren auf den Neutrophilen, die alternative Komplementaktivierung und NETosis (vgl. Kapitel 1.3.4). Die Ursachen dieser ANCA-assoziierten Autoimmunität sind wie bei anderen immunologischen Erkrankungen vielfältig. Einerseits spielen natürlich genetische Faktoren wie HLA-Subtypen und andere immunologische Polymorphismen eine wichtige Rolle. Andererseits können extrinsische Faktoren wie bestimmte Medikamente und Infektionen bei entsprechender Veranlagung als Trigger fungieren (28, 30).

#### **1.2.3.4 Anti-GBM-Glomerulonephritis**

Die Anti-GBM-GN ist die renale Manifestation des sogenannten Goodpasture-Syndroms. Dabei handelt es sich nach *2012 International Chapel Hill Consensus Conference* um eine Immunkomplex-Vaskulitis kleiner Gefäße, die sich an den Kapillaren von Lunge und Glomeruli manifestiert (31). Ursächlich für diese Erkrankung sind, wie der Name bereits vermuten lässt, gegen die Basalmembran besagter Kapillaren gerichtete Antikörper. Das „Goodpasture-Autoantigen“ ist dabei eine Struktur innerhalb der  $\alpha$ -3-Kette von Typ IV Kollagenen ( $\alpha$ 3[IV]NC1), wobei im Krankheitsverlauf auch Antikörper gegen weitere Kollagenketten gebildet werden können. Beim Goodpasture-Syndrom handelt es sich um eine äußerst seltene Erkrankung von welcher geschätzt eine von Millionen Personen pro Jahr in der europäischen Bevölkerung betroffen sind. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. Die Altersverteilung erscheint zweigipflig. Typische Erkrankte sind zwischen 20 und 30 Jahren oder um das 60. Lebensjahr (32). Klinisch zeigt sich typischerweise ein akutes Nierenversagen mit nephritischem Syndrom. Die Lungenbeteiligung im Sinne pulmonaler Blutungen und Hämoptysen ist lediglich bei einem bis zu zwei Dritteln der Erkrankten zu beobachten. Historisch wird jedoch unter dem Goodpasture-Syndrom die Kombination aus Lungen- und Nierenbeteiligung im Rahmen dieser Grunderkrankung verstanden. Es existiert auch das Bild einer atypischen Anti-GBM-GN, welches einen milderen und langsameren sowie prognostisch günstigeren Verlauf zeigt. Das Bild einer RPGN mit Halbmondbildung ist dabei genauso wenig zu beobachten wie eine pulmonale Beteiligung. Dafür entwickeln Patientinnen und Patienten in solchen Fällen häufig eine nephrotische Proteinurie. In solchen Patientinnen und Patienten, die etwa 10% der Anti-GBM-GN ausmachen, werden

serologisch häufig keine entsprechenden Antikörper nachgewiesen (33, 34). Die Anti-GBM-GN gilt als Klassiker einer RPGN mit Halbmondbildungen, wobei wie oben bereits beschrieben auch andere Erkrankungen dieses histologische Bild verursachen können. Etwa 80% aller Patientinnen und Patienten zeigen Halbmonde in über 50% ihrer Glomeruli, einige von ihnen segmentale Schlingennekrosen. Einzelne Halbmonde lassen sich in bis zu 95% der Biopsien Betroffener nachweisen. Typisch ist auch das Auftreten von Rupturen der Bowman-Kapsel. Bedeutend für die Diagnose sind jedoch immunhistologische Ablagerungen entlang der GBM, welche ein lineares Muster bilden. Verantwortlich dafür sind Autoantikörper und resultierende Komplementablagerungen. Tubuli und Interstitium sind dagegen nur selten eindrucksvoll histologisch betroffen. In frühen oder atypischen und milden Verläufen kann es auch zu anderen histologischen Veränderungen kommen. Insbesondere die atypische Anti-GBM-GN zeigt ein heterogenes Bild glomerulärer Schädigungsmuster und kann mit anderen Entitäten verwechselt werden (7, 32, 33).

Die tatsächlichen Ursachen hinter dieser Erkrankung sind wesentlich komplexer als das einfache Vorkommen GBM-spezifischer Autoantikörper. Einerseits gibt es auch in dieser Autoimmunerkrankung genetische Faktoren, die das Risiko einer Erkrankung erhöhen. Zu diesen gehören wieder bestimmte HLA-Polymorphismen sowie weitere genetische Risikofaktoren, welche sich teilweise mit denen anderer inflammatorischer Erkrankungen decken (32, 35). Hinzu kommen Umweltfaktoren, die insbesondere als finale Triggerfaktoren agieren könnten. Zu solchen gehören neben Atemlufttoxinen, insbesondere Zigarettenrauch, auch virale Erreger der Atemwege. Schäden und Entzündungen der Atemwege könnten auf diese Weise bei entsprechender Prädisposition zum Kontakt der glomerulären Antigene mit dem Immunsystem führen und dabei zur Ausbildung pathologischer Autoantikörper beitragen (32). Neben humoralen Immunantworten spielen auch zelluläre Faktoren eine Rolle. Besonders autoreaktive T-Zellen scheinen zur Erkrankung beizutragen. Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine gestörte Immunregulation durch regulatorische T-Zellen in betroffenen Patientinnen und Patienten (33). Erwähnenswert ist auch das gemeinsame Auftreten von ANCA-Vasculitiden und zirkulierenden Anti-GBM-Antikörpern, welche in etwa 10% von Patientinnen und Patienten mit einer ANCA-Vaskulitis nachweisbar sind. Umgekehrt haben bis zu 50% der Patientinnen und Patienten mit Anti-GBM-Erkrankungen auch zirkulierende ANCA nachweisbar. Zwischen beiden Erkrankungen könnte also ein Zusammenhang bestehen. Möglicherweise führen zum Beispiel ANCA-assoziierte glomeruläre Schäden, ähnlich den

inhalativen Noxen in der Lunge, zur Ausbildung weiterer Autoantikörper. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden (32).

### **1.2.3.5 Weitere Formen der Glomerulonephritis**

Neben den bereits genannten existieren noch weitere Entitäten der GN. Einerseits können monoklonale Gammopathien zu einer Glomerulonephritis führen. Erkrankt ein Patient oder eine Patientin zum Beispiel an einem B-Zell-Lymphom oder Multiplen Myelom, kommt es zur übermäßigen Produktion monoklonaler Immunglobuline. Diese können genauso wie bei der postinfektiösen GN zu Ablagerungen in den Glomeruli führen und in weiterer Folge über die Komplementaktivierung eine massive Inflammation auslösen. Häufig resultiert das Bild einer proliferativen Glomerulonephritis (36). Zusätzlich kann auch die sogenannte C3 Glomerulopathie histologisch eine membranproliferative Glomerulonephritis zeigen. Diese Erkrankungen wurden lange Zeit nicht von den rein Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritiden unterschieden. Zunächst kann lichtmikroskopisch keine sichere Differenzierung erfolgen. Zusätzlich spielen das Komplementsystem und damit auch immunhistochemisch nachweisbare Komplementablagerungen in beiden Entitäten entscheidende Rollen. Der wesentliche Unterschied ist, dass bei den C3 Glomerulopathien eine Fehlregulation des Komplementsystems selbst die Ursache für die pathologische Inflammation in den Glomeruli darstellt. Eine solche Fehlregulation der alternativen Komplementaktivierung führt zu einer im Verhältnis zu den IgG-Ablagerungen übermäßigen C3 Komplementablagerung. Der Nachweis muss entsprechend immunhistologisch erfolgen. Auch unter diese Gruppe fällt die vorwiegend bei Kindern auftretende Dense Deposit Disease (DDD), welche sich durch ein spezielles elektronenmikroskopisches Bild auszeichnet (37). Weitere glomeruläre Erkrankungen wie die membranöse Glomerulopathie oder Podozytopathien inklusive Minimal-Change-Glomerulopathie, sollten nicht mehr als Glomerulonephritis bezeichnet werden (9).

### **1.2.4 Therapie**

Den unterschiedlichen Formen der GN stehen eine Vielzahl denkbarer Therapieansätze gegenüber. Zentral für die Behandlung vieler Glomerulonephritiden sind die immunsuppressiven Wirkstoffe, welche den pathologischen inflammatorischen Prozessen entgegenwirken sollen. Außerdem kommen zusätzlich einige supportive bzw. symptomatische Therapieansätze in Frage, die z. B. auf die Blutdrucksenkung oder Reduktion einer vorhandenen Proteinurie abzielen. Zu diesen gehören in erster Linie ACE-

Hemmer bzw. Angiotensin-Rezeptor-Blocker (38). Ein anderer Therapieansatz, der zumindest für postinfektiöse und Infekt-assoziierte Glomerulonephritiden in Frage kommt, ist eine adäquate antibiotische Therapie. Die Evidenz dieser Therapie ist jedoch unklar und kommt nur bei noch floriden Infektionen in Frage (19, 39). Der Fokus soll im Folgenden auf den antiinflammatorischen Substanzen liegen, die als Immunsuppressiva in den verschiedenen Formen der GN zur Anwendung kommen.

#### **1.2.4.1 Glukokortikoide**

Glukokortikoide stellen den Klassiker unter immunsuppressiven Wirkstoffen dar. Diese in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde produzierten Steroidhormone zeigen eine Vielfalt systemischer Effekte. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das Cortisol. Glukokortikoide werden häufig als Stresshormone bezeichnet, die zur Bereitstellung von Energie in entsprechenden Situationen beitragen. Ihr Einfluss ist jedoch auch unabhängig davon wesentlich für den Zucker-, Protein- und Fettstoffwechsel. Gleichzeitig haben Cortisol und verwandte Proteine auch antientzündliche Effekte (40). Letztere macht man sich in der Medizin bereits seit vielen Jahren zu Nutzen. Glukokortikoidrezeptoren (GR) findet man in beinahe sämtlichen Zellen und Geweben des Körpers. Entsprechend sind auch ihre Auswirkungen extrem vielfältig und komplex. Da nicht alle Gewebe identisch auf die Anwesenheit der GR Liganden reagieren sollen, ergibt sich die Notwendigkeit ausreichend vieler Rezeptor-Isoformen (41). Konkret entstehen diese durch alternatives Splicing aus einem einzelnen Genabschnitt und mehreren möglichen Startregionen für die Translation. Daraus ergeben sich bis zu 40 mögliche Varianten dieses Rezeptors, die in unterschiedlichen Zellen und Geweben in verschiedenen quantitativen Verhältnismustern exprimiert werden (41, 42). GR liegen gewöhnlich in Multiproteinkomplexen im Zytoplasma vor, aus denen sie erst heraustreten, sobald sie ihre Konformation nach Bindung eines geeigneten Liganden verändert haben. Anschließend bewegen sich die freien GR-Liganden-Komplexe in den Zellkern, wo sie an bestimmte DNA-Sequenzen binden können (sogenannte *Glucocorticoid Response Elements*) (41). Die vielfältigen systemischen Effekte können nun auf unterschiedliche Weise initiiert werden. Die offensichtlichste Funktion ist das Aktivieren oder Inhibieren der Transkription durch *Glucocorticoid Response Elements* (GREs) regulierte Genabschnitte (41). Der weniger offensichtliche, aber durchaus bedeutende Mechanismus, ist die Auflösung besagter Multiproteinkomplexe im Zytoplasma, durch die auch weitere Proteine als nur der GR-Liganden-Komplex losgelöst werden. Außerdem können durch ihre Liganden gebundene GRs auch unabhängig von ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren weitere Mechanismen auslösen. Letztgenannte Effekte sind

wesentlich schneller wirksam als die Regulation der Gen-Transkription (41, 43). All das führt zu einer großen Komplexität, die bis heute nicht im Detail verstanden ist (41). Für die Rolle als Immunsuppressiva sind aber im Wesentlichen folgende Interaktionen entscheidend: Das Binden an GREs führt unter anderem zur Hemmung wichtiger proinflammatorischer Genorte. Zu diesen gehören die genetischen Korrelate zu Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B oder Aktivator-Protein-1 (AP-1). Außerdem existieren auch nicht-genetische Effekte, die möglicherweise für den schnellen Wirkeintritt der Immunsuppression verantwortlich sind. Dabei spielen die Inhibition proinflammatorischer Signalwege, z. B. über „mitogen-activated protein“ (MAP)-Kinasen-Wege, sowie direkte Effekte auf immunologische Zellen, wie die Degranulation neutrophiler Granulozyten, eine wesentliche Rolle (43, 44). Genauer zu diesen Signalwegen wird in Kapitel 1.4 behandelt. Gleichzeitig führt die Aktivierung unterschiedlichster Genabschnitte durch das Binden an GREs zu den vielfältigen Nebenwirkungen der Glukokortikoide. Diese können verschiedenste Systeme betreffen und schwerwiegende Folgen haben. Natürlich erhöht sich durch die Medikation mit Glukokortikoiden das Infektionsrisiko gegenüber zahlreichen Erregern. Dies betrifft sowohl das Wiederauftreten und die Exazerbation chronischer Infektionen wie viraler Hepatitiden und HIV, aber auch Infektionen mit opportunistischen Erregern wie Candidas oder Pneumocystis jirovecii. Maßgeblich für das tatsächliche Infektionsrisiko sind einerseits die Dosis, andererseits relevante Nebenerkrankungen. Eine weitere relevante Nebenwirkung ist das vermehrte Auftreten von Osteoporose. Besonders nach längerer Therapiedauer kommt es zunehmend zur Abnahme der Knochensubstanz und einem resultierenden erhöhten Risiko für Frakturen. Auch in diesem Fall können andere Risikofaktoren, die ebenfalls das Auftreten einer Osteoporose begünstigen, diese Effekte noch wesentlich verstärken. Die Applikation von Kalzium und Vitamin-D-Präparaten kann die Auswirkungen schwächen und auch Bisphosphonate können eine Therapieoption darstellen. Das Auftreten eines Glukokortikoid-induzierten Diabetes bzw. einer hyperglykämischen Entgleisung ist eine weitere häufige Nebenwirkung. Weitere metabolische Auswirkungen können Elektrolytstörungen sowie arterieller Hypertonus bis hin zum metabolischen Syndrom sein. Klinisch relevant sind außerdem Ulzerationen im Intestinaltrakt, Wundheilungsstörungen und Osteonekrosen (41, 45, 46). Als sehr effiziente und rasch wirksame Immunsuppressiva dienen Glukokortikoide in der Therapie zahlreicher inflammatorischer Erkrankungen. Zu diesen gehören auch einige Glomerulonephritiden wie z. B. die Anti-GBM-Nephritis, ANCA-Vasculitiden sowie die Lupus-Nephritis. Besonders als Induktionstherapie mit anschließender Reduktion der Dosis haben Glukokortikoide eine

wichtige Rolle in der akuten Behandlung entsprechender Erkrankungen oder Transplantat-Abstoßungen. Werden Glukokortikoide auch über längere Phasen als Erhaltungstherapie angewendet, versucht man ihre notwendige Dosis, und damit auch das Risiko für relevante Nebenwirkungen, durch die Kombination mit anderen Immunsuppressiva zu reduzieren (39). In Zukunft könnten außerdem sogenannte selektive Glukokortikoidrezeptor-Agonisten die Steroid-Therapie revolutionieren. Dabei handelt es sich um Wirkstoffe, die durch Veränderungen in ihrer Struktur lediglich inflammatorische Regionen der DNA inhibieren können, ohne zur Aktivierung weiterer Regionen zu führen, die für Nebenwirkungen verantwortlich sind. Klinische Studien existieren, müssen die Wirksamkeit dieses Ansatzes aber zunächst noch beweisen (41).

#### **1.2.4.2 Cyclophosphamid**

Cyclophosphamid ist eine der älteren immunsuppressiven Substanzen und wird bereits seit einigen Jahrzehnten klinisch verwendet. Der alkylierende aktive Metabolit reagiert mit den Basen Guanin und Cytosin und führt zu strukturellen Veränderungen und Verknüpfungen der DNA-Stränge. Dies führt zu einem zytostatischen Effekt, insbesondere gegenüber proliferierenden Zellen. Je nach Dosierung wird Cyclophosphamid dabei zur Behandlung maligner Erkrankungen eingesetzt oder aber als potentes Immunsuppressivum durch toxische Effekte auf hämatopoetische Zellen (47). Besonders in hohen Dosierungen, aber auch über die kumulative Dosis, ergeben sich schwere Nebenwirkungen. Entsprechend dem Wirkmechanismus kommt es zu einem knochenmarksupprimierenden Effekt mit Leukopenie und einem erhöhten Infektionsrisiko bis hin zur Panzytopenie. Durch die Metabolisierung von Cyclophosphamid kommt es außerdem zum Anfallen von Acrolein im Harn und der Blase. Die resultierende hämorrhagische Zystitis ist eine sehr häufige Nebenwirkung, kann aber durch die Gabe des Zytoprotektors Mesna verhindert werden. Die kumulative Dosis von Cyclophosphamid stellt nach langfristiger Therapie einen wesentlichen Risikofaktor für maligne Erkrankungen dar. Weitere Nebenwirkungen sind Nephrotoxizität, Kardiotoxizität, Lebertoxizität und Beeinflussung der Fertilität beider Geschlechter durch Gonadotoxizität (46, 47). Cyclophosphamid wird zur Behandlung schwerer Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Zu solchen gehören die Anti-GBM-Erkrankungen, in denen Cyclophosphamid mit Glukokortikoiden kombiniert werden können. Ähnliches gilt auch für ANCA-Vasculitiden und die Lupus-Nephritis (39).

### **1.2.4.3 Azathioprin und Mycophenolat-Mofetil**

Diese Wirkstoffe werden zur Gruppe der Antimetaboliten gezählt und manipulieren die Synthese von DNA und RNA. Beide Wirkstoffe verhindern die „de novo“ Purinbiosynthese, welche für die Proliferation von Lymphozyten von besonderer Bedeutung ist. Die aktiven Metaboliten von Azathioprin sind dabei Purin-Analoga, Mycophenolat-Mofetil (MMF) ein Hemmer der für die Guanosinmonophosphat-Synthese wesentlichen Inosinmonophosphat-Dehydrogenase. Azathioprin verliert im klinischen Alltag zugunsten MMF zunehmend an Bedeutung, hat aber im Gegensatz zu letzterem keine teratogenen Effekte (48). Andere Nebenwirkungen sind auch hier ein erhöhtes Infektionsrisiko insbesondere gegenüber Viren wie CMV und HSV. Auch die Knochenmarkssuppression bzw. Leukozytopenie gehören ins Nebenwirkungsspektrum dieser Wirkstoffe. Die häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen betreffen aber den Gastrointestinaltrakt und verursachen Übelkeit und Diarrhoe (46). Besonders MMF hat heute eine wichtige Rolle in der immunsuppressiven Therapie organtransplantierte Patientinnen und Patienten (48). Auch in der Therapie von Autoimmunerkrankungen gewinnt MMF zunehmend an Bedeutung. Die Verwendung in der Induktionstherapie von Lupus-PatientInnen gleichwertig zu Cyclophosphamid wird diskutiert (39). In der Erhaltungstherapie der Lupus-Nephritis ist MMF Azathioprin in der Reduktion von Erkrankungsschüben überlegen. Keine Unterschiede gibt es dagegen in der Häufigkeit der Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz oder Sterblichkeitsrate (49). Azathioprin kann in Kombination mit Glukokortikoiden in der Erhaltungstherapie von ANCA-Vasculitiden verwendet werden und ist dabei MMF überlegen (50).

### **1.2.4.4 Rituximab**

Rituximab wurde ursprünglich für die Therapie hämatologischer Malignome entwickelt (51). Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper, der gegen das von bestimmten B-Zellen exprimierte Protein CD20 gerichtet ist. Zu finden ist CD20 auf der Oberfläche von Prä-B-Zellen bis hin zu reifen B-Lymphozyten. Nicht zu finden ist es dagegen auf Pro-Zellen und Stammzellen sowie Plasmazellen (48, 51). Antikörper- und Komplement-vermittelte Zytotoxizität bzw. Apoptose tragen schließlich zur Reduktion peripherer B-Zell-Zahlen bei (52). Dieser Effekt ist langfristig und hält über einige Monate an. Die Konzentrationen an Antikörpern sind davon nicht unmittelbar betroffen, da reife Plasmazellen CD20 nicht mehr auf ihrer Oberfläche exprimieren. Reduziert werden dafür aber unter anderem reife Gedächtniszellen (51). Funktionell ist neben der unterdrückten humoralen Komponente zu beachten, dass B-Zellen auch mit T-Zellen interagieren und durch deren Depletion wichtige

Stimulatoren der T-Zell-Aktivierung wegfallen (48). Weitere Mechanismen werden diskutiert (52).

Rituximab gewinnt als Immunsuppressivum zunehmend an Bedeutung. Zunächst konnte man die Wirksamkeit in der rheumatoiden Arthritis und ANCA-Vasculitiden nachweisen, in deren Therapieregimen es inzwischen eine zentrale Rolle eingenommen hat (48, 51). Da es sich um einen nicht vollständig humanisierten Antikörper handelt, kann es gehäuft zu Infusionsreaktionen kommen. Entsprechende hypersensible Reaktionen sind relativ häufig, nicht aber mit einer echten Anaphylaxie gleichzusetzen. Das Auftreten von Symptomen wie Fieber, Krankheitsgefühl und Gliederschmerzen lassen sich durch eine medikamentöse Prophylaxe mit Methylprednisolon, Paracetamol und Antihistaminika weitgehend verhindern (46, 51). Natürlich gibt es auch unter Rituximab ein erhöhtes Risiko für Infektionen. Besondere Beachtung sollte man dem Hepatitis B Status der Patientinnen und Patienten schenken, da Reaktivierungen einer latenten Virushepatitis häufig beobachtet werden. Selten, aber dafür umso schwerwiegender, ist das Auftreten der sogenannten progressiven multifokalen Leukenzephalopathie, die durch eine Reinfektion mit dem JC-Virus verursacht wird. Erhöht kann das Infektionsrisiko durch weitere Nebenwirkungen werden. Zu solchen gehören die Hypogammaglobulinämie und die Neutropenie. Beide können als späte unerwünschte Effekte einer Rituximabtherapie auftreten (46, 51). Bis die Therapie mit Rituximab anschlägt und es zur Depletion der B-Zellen kommt, können einige Wochen vergehen. Diese Eigenschaft macht solche Antikörper für die alleinige Induktionstherapie hochakuter autoimmunologischer Verläufe ungeeignet. Anders sieht es in Kombination mit Glukokortikoiden aus. In ANCA-Vasculitiden kann die Induktion mit Rituximab in Kombination mit Glukokortikoiden eine gleichwertige Alternative zu Cyclophosphamid basierten Regimen sein (53). Besonders bei wiederkehrenden Verläufen und schlechtem Ansprechen auf Cyclophosphamid stellt Rituximab die Therapie der Wahl dar. Dies gilt insbesondere für die Erhaltungstherapie entsprechender ANCA-Patienten und -Patientinnen (39). Die Bedeutung in der Behandlung von Lupus-Patienten und Lupus-Patientinnen ist noch nicht abschließend geklärt. In Patientinnen und Patienten mit schweren Verläufen findet Rituximab bereits Verwendung und einzelne Fallberichte sprechen für diesen therapeutischen Ansatz. Große randomisierte Studien konnten diese Erkenntnisse jedoch bisher nicht untermauern (54, 55).

#### **1.2.4.5 Calcineurin-Inhibitoren**

Diese Gruppe beinhaltet gleich zwei relativ bekannte und klinisch relevante Immunsuppressiva. Diese sind zum einen Cyclosporin, zum anderen Tacrolimus oder FK506. Beide Wirkstoffe führen zur Hemmung des Proteins Calcineurin, welches normalerweise für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (engl. nuclear factor of activated T-cells) verantwortlich ist (siehe auch Kapitel 1.4) und nehmen damit besonders auf den Stoffwechsel von T-Zellen Einfluss (56). Das etwas ältere Cyclosporin war lange Zeit der Standard nach Organtransplantationen mit einer wesentlichen Reduktion akuter Abstoßungsreaktionen. Als etwa ein Jahrzehnt später Tacrolimus auf den Markt kam, konnte diese Rate sogar noch weiter verbessert werden. FK506 nimmt bis heute eine wesentliche Rolle in modernen Immunsuppressionsregimen nach Transplantationen ein (48). Tacrolimus konnte außerdem Wirksamkeit in der Induktionstherapie der Lupus-Nephritis zeigen und war MMF dabei nicht unterlegen (57). Häufiger werden Calcineurin-Inhibitoren jedoch in nephrotischen Glomerulopathien wie der membranösen Glomerulopathie oder Minimal-Change-GN verwendet. Von Vorteil können die von der Immunsuppression unabhängigen antiproteinurischen Effekte sein, welche durch eine Beeinflussung des Zytoskelettes in Podozyten verursacht werden (46, 58). Calcineurin-Inhibitoren können zur systemischen Vasokonstriktion führen und auf diesem Weg eine arterielle Hypertonie begünstigen. Im Bereich der renalen Gefäßversorgung kann dies bis zur Minderperfusion der Nieren führen. Je nach Schwere sind eine akute Tubulusnekrose, bei längerer Verabreichung auch eine chronische Niereninsuffizienz mögliche Folgen. Davon unabhängig wird auch eine direkte Nephrotoxizität diskutiert. Weitere Nebenwirkungen sind u.a. Hyperlipidämie, Neurotoxizität und ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer hyperkalämischen metabolischen Azidose. Cyclosporin und Tacrolimus zeigen dabei unterschiedliche Risiken für die besagten Nebenwirkungen. Wichtig ist, dass regelmäßige Medikamentenspiegel in Patientinnen und Patienten mit Calcineurin-Inhibitoren bestimmt werden. In der Pharmakokinetik kann es zwischen Patientinnen und Patienten zu großen Unterschieden kommen, was das Risiko einer ineffizienten Immunsuppression bzw. einer erhöhten Toxizität mit sich bringt (46, 48). Mit Voclosporin gibt es bereits einen vielversprechenden neuen Kandidaten in der Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren. Erste klinische Studien, unter anderem in Lupus- PatientInnen, wurden bereits durchgeführt und zeigen vielversprechende Ergebnisse. Ob wirkliche Vorteile gegenüber herkömmlichen Calcineurin-Inhibitoren bestehen muss zunächst genauer evaluiert werden (59).

#### **1.2.4.6 Eculizumab**

Eine andere Gruppe immunsupprimierender Medikamente wirken durch das gezielte Inhibieren von Komplementfaktoren. Zu diesen gehört auch der humanisierte monoklonale Antikörper Eculizumab. Dieser ist gegen den Komplementfaktor C5 gerichtet, dessen Spaltprodukte wichtige Chemokine für die Neutrophilenrekrutierung und wichtige Bestandteile der lytischen Komplementkomplexe darstellen (48). Eingesetzt wird Eculizumab bisher in der atypischen Form des hämolytisch-uräemischen Syndroms, bei dem eine genetische Variante zur unkontrollierten Komplementaktivierung führt (60). Durch die zentrale Rolle des Komplementsystems in verschiedenen inflammatorischen Prozessen ist es wenig überraschend, dass Eculizumab auch in anderen Situationen Wirkung zeigt. So konnten in Patientinnen und Patienten nach Nierentransplantation und einem erhöhten immunologischen Risiko durch präformierte Antikörper, weniger akute Abstoßungsreaktionen als in der Kontrollgruppe erreicht werden (61). Auch in Glomerulonephritiden wurde Eculizumab erprobt. Positive Berichte gibt es von Patientinnen und Patienten mit einer C3 Glomerulopathie, die Aussichten auf Therapieerfolg scheinen jedoch sehr individuell zu sein und sind noch nicht verstanden (62). Außerdem könnte Eculizumab eine Therapieoption in postinfektiösen Glomerulonephritiden darstellen (39). Mit einem tieferen Verständnis immunologischer Mechanismen in glomerulären Erkrankungen, insbesondere bezogen auf das Komplementsystem, könnten sich in Zukunft weitere Patientinnen und Patienten mit Erkrankungen identifizieren lassen, in denen Eculizumab oder andere Komplement-Inhibitoren einen Vorteil bringen könnten.

Natürlich steigt auch unter der Therapie mit Komplement-Inhibitoren das Infektionsrisiko. Im Falle von Eculizumab führt die Verhinderung des lytischen Spaltproduktes C5b-9 zu einer Beeinträchtigung der Immunantworten gegen bekapselte Erreger wie *Neisseria meningitidis*. Ein vollständiger Impfstatus gegen entsprechende Erreger ist elementar, wobei selbst bei gegebener Impfmunität eine Infektion nicht ausgeschlossen ist (46, 48).

#### **1.2.4.7 Plasmapherese**

Schlussendlich steht mit der Plasmapherese eine weitere hochtechnologische Therapieoption zur Verfügung. Das Grundprinzip der Plasmapherese ist die extrakorporale Reinigung des Blutes vor toxischen Substanzen durch die Auftrennung in zelluläre Bestandteile und das Plasma. Je nach Technik wird letzteres komplett ausgetauscht und durch ein Ersatzplasma ersetzt oder aber durch bestimmte Filtertechnologien wie der Immunadsorption direkt gereinigt (63). Als Faustregel für die Indikation einer solchen Therapie gilt nach der

Meinung mancher Autorinnen und Autoren ein spezifisches zirkulierendes pathologisches Protein (in erster Linie Autoantikörper) mit einem Molekulargewicht von über 15 kDa (64). Anwendung findet dieses Verfahren in einigen neurologischen Autoimmunerkrankungen wie z. B. der Myasthenia gravis oder dem Guillain-Barré-Syndrom (65). Grundsätzlich gibt es zahlreiche weitere Erkrankungen in denen die Plasmapherese als Therapieoption in Frage kommt, die Evidenzlage ist dabei aber häufig nicht zufriedenstellend (66). Regelmäßig zur Anwendung kommen diese Verfahren auch in der Behandlung der Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP), SLE sowie dem Goodpasture-Syndrom (67-69). Die kürzlich publizierte PEXIVAS Studie untersuchte die Rolle der Plasmapherese in der Behandlung von schweren ANCA-Vasculitiden. Dabei zeigte sich jedoch kein signifikanter Vorteil in der Plasmapherese-Gruppe in Hinblick auf das Auftreten eines terminalen Nierenversagens oder den Tod der Patientinnen und Patienten mit einem Beobachtungszeitraum von 7 Jahren (70). Mehr randomisierte Studien sind notwendig, um Klarheit über den Sinn dieser aufwändigen Verfahren für einzelne Erkrankungen zu schaffen. Einen Überblick über die Evidenzlevel der Plasmapherese in verschiedenen Erkrankungen bietet eine umfangreiche Guideline der *American Society for Apheresis (ASFA)* (71).

### **1.3 Experimentelle Glomerulonephritis: Nephrotoxische Serum Nephritis**

#### **1.3.1 Allgemein**

Bei der nephrotoxischen Serum Nephritis (NTS) handelt es sich um eine von Masugi et al. erstmals bereits 1932 beschriebene experimentelle Glomerulonephritis im Tiermodell. Typische Versuchstiere sind Kaninchen, Ratten und Mäuse, wobei die Vulnerabilität gegenüber der Erkrankung auch wesentlich vom Stamm der Tiere abhängig ist (72). Das Grundprinzip dieses Modells ist die intravenöse Injektion heterologer Antikörper, die durch die Immunisierung einer fremden Spezies, klassischerweise Schafe, Ziegen oder Kaninchen, mit glomerulären Basalmembrananteilen der verwendeten Versuchstierart gewonnen werden. Viele Autorinnen und Autoren unterscheiden dabei zwei Phasen der Erkrankung. In einer ersten, sogenannten heterologen Phase, kommt es zunächst durch die Ablagerung heterologer Immunglobuline im Bereich der GBM zu einer konzentrationsabhängigen histologischen Veränderung und Proteinurie. In einer zweiten, sogenannten autologen Phase, kommt es zu adaptiven Immunreaktionen gegen die heterologen Immunglobuline mit deutlicher Verschlechterung des Krankheitsverlaufes (72, 73). Während in der heterologen

Phase angeborene Immunmechanismen wie die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und die Beteiligung des Komplementsystems die entscheidende Rolle spielen, bedarf es für die autologe Phase zunächst der Ausbildung adaptiver Immunantworten mit zentraler Rolle antigenspezifischer T-Zellen. Mit dem Beginn der autologen Phase ist deswegen erst etwa eine Woche nach NTS-Induktion zu rechnen (74).

Liegt der Fokus auf der Untersuchung der autologen bzw. adaptiven Phase der Erkrankung oder sollen Intensität erhöht und der Krankheitsverlauf beschleunigt werden, wird häufig auf eine abgewandelte Durchführung dieses Modells zurückgegriffen. Dabei werden die Versuchstiere wenige Tage vor Applikation des Anti-GBM-Serums gegen IgG der jeweiligen Spezies des Anti-GBM-Serums immunisiert. Dadurch wird nach Injektion des NTS-Serums ein direkter Beginn der autologen Phase erzielt (72-74).

Zu beachten ist jedoch auch, dass solche verwendeten Antiseren keinesfalls ausschließlich gegen die GBM gerichtet sind. Sie sollten eher als unrein betrachtet werden, da auch andere Strukturen im Nierengewebe gebunden werden (74).

### **1.3.2 Die NTS als Modell einer Glomerulonephritis**

Die NTS steht dabei für keine konkrete Krankheitsentität. Je nach Autor oder Autorin wird sie einmal als Modell einer Immunkomplex-Glomerulonephritis (73, 75) oder aber als Modell einer Anti-GBM-Glomerulonephritis beschrieben (76). Ein Streitpunkt zwischen diesen unterschiedlichen Betrachtungsweisen ist die Funktion der heterologen Antikörper in der autologen Phase als fremdes Antigen, während bei humanen Anti-GBM-Glomerulonephritiden echte Autoimmunität in Form von autologen Anti-GBM-Immunglobulinen vorliegt. Odobasic et al. schreiben dagegen lediglich der frühen heterologen Phase eine Pathogenese im Sinne einer (in-situ) Immunkomplex-GN zu, während die autologe Phase einer RPGN entspricht, in der heterologe Antikörper als „planted antigen“ fungieren (73).

In Hinblick einerseits auf die oben beschriebenen Betrachtungsweisen, andererseits auf Grund ihres rapid-progressiven klinischen Verlaufs mit häufig beschriebener histologischer Halbmondbildung, wird hier die NTS in weiterer Folge als Modell einer Immunkomplex-vermittelten rapid-progressive Glomerulonephritis bezeichnet (75, 77).

### **1.3.3 Pathohistologie und Klinik**

Der Phänotyp der NTS ist variabel und neben der Konzentration bzw. Qualität der Antiseren auch von den jeweils verwendeten Spezies und Zuchtstämmen, sowohl auf Serum-Spendenden als auch Serum-Empfangenden bezogen, abhängig. Dies führt bereits in der frühen heterologen Phase zu einem vielfältigen Bild zwischen kaum histologischen Veränderungen bis hin zur Halbmondbildung und Glomerulosklerose. Weitere beschriebene histologische Veränderungen sind die glomeruläre Thrombosierung und Nekrotisierung, Mesangiumproliferation, tubuläre Schäden sowie Schäden des Kapillarendothels. Gleichzeitig kommt es zu zunehmender Infiltration von Leukozyten. In der autologen Phase verändert sich dieses Infiltrat von einer überwiegenden Ansammlung neutrophiler Granulozyten in Richtung einer zunehmenden Migration von Monozyten sowie einer periglomerulären und interstitiellen Rekrutierung von T-Zellen (72, 74).

Dieselbe Variabilität, die für das histologische Bild dieses Krankheitsmodells gilt, gilt auch für dessen klinischen Verlauf. Typischerweise zeigen die Versuchstiere relativ bald eine Proteinurie bis hin zum nephrotischen Syndrom mit Hyperlipoproteinämie, der Ausbildung von Ödemen und Aszites, sowie einer abnehmenden Nierenfunktion mit Anstieg harnpflichtiger Substanzen. Die Erkrankung kann bis hin zum terminalen Nierenversagen und Versterben der Tiere fortschreiten (72, 74).

### **1.3.4 Die immunologischen Mechanismen der NTS**

Die NTS ist ein weit etabliertes und im Laufe der Zeit sehr gut untersuchtes Tiermodell. Viele wesentliche Abläufe sind bereits beschrieben und verstanden. Die aus diesem Krankheitsmodell gewonnenen Erkenntnisse haben einen wesentlichen Beitrag für das Verständnis humaner Glomerulonephritiden und anderer immunologisch-vermittelten Erkrankungen geleistet. Im Folgenden sollen zunächst die heute für die NTS bekannten Vorgänge grob skizziert werden. Die genauen immunologischen Mechanismen werden anschließend im Detail beschrieben. Da bei den hier beschriebenen Experimenten ebenfalls die „beschleunigte“ Durchführung in Mäusen mit vorausgehender Immunisierung gewählt wurde, soll der Fokus dabei neben der NTS in der Maus auf den adaptiven Vorgängen liegen. Nach der Injektion besagter heterologer Antikörper, binden diese Strukturen der glomerulären Basalmembran und des Endothels. Hier führen die Immunglobuline zur Aktivierung angeborener Immunmechanismen und des Komplementsystems. Phagozyten des angeborenen Immunsystems wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) spielen hier eine zentrale Rolle. Einerseits verstärken sie die

proinflammatorischen Signale innerhalb der Niere, andererseits führen sie zur Schädigung des Gewebes (74, 78). Von besonderer Bedeutung sind ihre Funktionen als Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Allen voran die dendritischen Zellen fungieren als wichtiges Verbindungsglied zum adaptiven Immunsystem. Wahrscheinlich wandern diese Zellen, nachdem sie fremde Antigene in Form der heterologen Antikörper phagozytiert haben, in drainierende Lymphknoten, um sie dort auf ihrer Oberfläche antigenspezifischen T-Zellen zu präsentieren (75, 79, 80). Dadurch aktivierte  $CD4^+$  Zellen wandern in die entzündlichen Gewebe und treffen dort auf Makrophagen, neutrophile Granulozyten und DCs, die alle über MHC-II Moleküle phagozytierte Antigene präsentieren. Die Lymphozyten treten nun mit solchen APCs, vorausgesetzt sie tragen das zum T-Zell-Rezeptor (TCR) passende Antigen, in Wechselwirkung. Von  $CD4^+$  Zellen ausgehende Signale verstärken die Aktivität der Phagozyten. Außerdem kommt es zur Rekrutierung weiterer neutrophiler Granulozyten und Makrophagen in das entzündliche Gewebe (75, 81). Von  $CD4^+$  Zellen unterscheidet man mehrere Subpopulationen. Ihre Unterschiede in Funktion und Bedeutung für die NTS werden, genauso wie die weiterer T-Zellen, im Detail weiter unten beschrieben.

Gleichzeitig kommt es auch durch Stimulation von B-Zellen zur Differenzierung zu Plasmazellen und damit zur Produktion autologer und gegen die Kaninchen-Immunglobuline gerichteter Antikörper. Möglicherweise verstärken diese die Ausbildung von Immunkomplexen entlang der GBM und tragen dadurch zum glomerulären Schaden bei (74).

Wie schnell diese adaptiven Immunmechanismen anlaufen, ist von der Art der Durchführung abhängig. Bei vorausgehender Immunisierung haben die antigenspezifischen Lymphozyten bereits einige Tage Zeit heranzureifen und können nach Injektion der Anti-GBM-Antikörper relativ schnell ihren Funktionen nachgehen. Bei Durchführungen ohne vorausgehende Immunisierung treten die adaptiven Mechanismen erst über Tage langsam zu den angeborenen Immunreaktionen hinzu (74). Im Weiteren werden die einzelnen Vorgänge und beteiligten Zellen im Detail beschrieben.

#### **1.3.4.1 Renale Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen sind mit die wichtigsten heute bekannten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen. Gleichzeitig bilden sie eine in sich recht heterogene Gruppe unterschiedlicher Phänotypen und können auch in ihrer Funktion stark variieren. Am bekanntesten sind DCs für ihre herausragende Fähigkeit zur Aktivierung naiver T-Zellen in den sekundär lymphatischen Geweben (82, 83). Ihre Potenz in Hinblick auf letzteres hängt

von ihrem Reifegrad ab, dieser wiederum von aktivierenden Signalen über PRRs wie z. B. Toll-like-Rezeptoren (TLRs) oder auch in Form von Cytokinen (84, 85). Konkret bedeutet dies, dass mit zunehmendem Reifegrad der DCs diese zunehmend die Phagozytose aus ihrer Umgebung einstellen und den Phänotyp hin zu APCs verändern, z. B. durch vermehrte Expression von MHC-Molekülen und costimulierenden Signalen wie CD80 und CD86 (83, 84). Schließlich verändern reife DCs auch das Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren, um in die lymphatischen Gewebe wandern zu können. Beispielsweise der Chemokinrezeptor CCR7, der mit dem in lymphatischen Geweben vermehrt vorkommenden Chemokin CCL21 interagiert, ermöglicht den nun hocheffizienten APCs sich in den T-Zell-Zonen der sekundär lymphatischen Gewebe niederzulassen und dort naive Lymphozyten zu aktivieren (85).

Dong et al. konnten in ihren Experimenten die Rolle der DCs konkret für Entzündungsreaktionen in Mausnieren demonstrieren. Dafür erzeugten sie durch das Abklemmen der Nierenarterie einen ischämischen Gewebeschaden mit Entzündungsreaktionen. Die DCs der Mausniere, die sich im Vergleich zu anderen Geweben durch eine besonders starke phagozytotische Aktivität auszeichnen, zeigten dabei eine in gesunden Nieren nicht auftretende Wanderung in die lokalen Lymphknoten, um dort im Nierenparenchym aufgenommene Antigene den spezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen zu präsentieren (86). Es ist naheliegend, dass ähnliche Schritte auch in der NTS ablaufen. Einige Autorinnen und Autoren vermuten, dass die heterologen Antikörper im Nierenparenchym durch DCs aufgenommen und von diesen in die drainierenden Lymphknoten transportiert werden um dort das adaptive Immunsystem zu sensibilisieren und spezifische Lymphozyten zu aktivieren (75, 79, 80). Man sollte jedoch berücksichtigen, dass bei der beschleunigten NTS mit vorausgehender Immunisierung der Erstkontakt der DCs mit den heterologen Antikörpern als Antigen nicht in der Niere, sondern am Ort der Präimmunisierung stattfindet. Wahrscheinlich werden die ersten antigenspezifischen T-Zellen also auch in den lymphatischen Geweben dieser Regionen mit ihrem Antigen in Kontakt gebracht, von wo aus sie schließlich als Effektorzellen ihren Weg in das renale Parenchym finden.

Die Funktionen als APCs im lymphatischen Gewebe sind jedoch nicht die einzigen relevanten Aufgaben dendritischer Zellen. Ortsständige renale DCs (rDC) scheinen wesentliche immunregulierende Funktionen zu besitzen. Je nach Krankheitsphase lassen sich ihnen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften zuordnen (87). Die Expression von Oberflächenproteinen auf Monozyten, DCs und Makrophagen, die alle eine enge Verwandtschaft besitzen, ist kompliziert und variabel. Cytokinrezeptoren auf DCs, die deren Einwanderung in die spezifischen Gewebe vermitteln, sind je nach Gewebe

unterschiedlich. Auf den rDCs findet man CX3-Chemokinrezeptor-1 (CX3CR-1) und CCR2. Diese beiden Rezeptoren scheinen entscheidend für die Immigration der DCs in die Niere zu sein (88). CX3CR-1 besitzt einen spezifischen Liganden, CX3CL1, dessen Expression in großen Mengen in Nieren und Intestinaltrakt von Mäusen nachgewiesen werden konnte. Auch auf den eng verwandten Makrophagen in der Niere findet man CX3CR-1. Die Bedeutung dieser Rezeptoren scheint sich aber zwischen DCs und Makrophagen zu unterscheiden und für die Makrophagenrekrutierung, wie Experimente mit CX3CR-1-defizienten Mäusen zeigten, nicht die gleiche Rolle zu spielen (89). Grundsätzlich konnten im Modell der NTS sowohl inflammatorische als auch immunsupprimierende regulatorische Effekte der DCs beobachtet werden. Insbesondere in der frühen Phase der NTS zeigten sich die protektiven Wirkungen der rDCs. Riedel et al. zeigten, dass die Depletion von unreifen DCs die Zahl der eingewanderten invarianten natürlichen Killer-T-Zellen (iNKT-Zellen) reduzierte und dabei das klinische Bild im Mausmodell verschlechterte. Eigentlich zählen iNKT-Zellen zwar zu den Lymphozyten, übernehmen aber Funktionen in den frühen angeborenen Immunreaktionen (81). Diese iNKT-Zellen zeigten in der NTS jedoch eine erhöhte Expression von antiinflammatorischen Cytokinen wie Interleukin (IL)-4 und IL-10. Vermittelt wurde die Interaktion zwischen DCs und iNKT-Zellen durch ihren Rezeptor CXCR6 und dem auf unreifen DCs exprimierten Liganden CXCL16, eine Achse die interessanterweise auch inflammatorische T-Zellen vermittelt (90). Auch eine Rolle des auf DCs vermehrt exprimierten ICOS Liganden, dem u. a. T-Zell supprimierende Eigenschaften zugeschrieben werden, wird diskutiert (91, 92).

Während die DCs in den frühen Phasen der NTS begünstigend auf den Krankheitsverlauf einwirken, werden sie in späteren Phasen bzw. chronisch verlaufenden Nierenerkrankungen proinflammatorisch. In früheren Experimenten wurde diese Veränderung im Verhalten der dendritischen Zellen zeitlich zwischen dem 4. und 7. Tag nach NTS Induktion eingeordnet (92). Die inflammatorische Wirkungsweise dieser „gereiften“ renalen DCs ist vielseitig. Schlussendlich kommt es zu einer Stimulation von T-Zellen, welche die wesentlichen Vermittler von Gewebeschäden darstellen (77). Der proinflammatorische Einfluss von DCs lässt sich in Experimenten mit Mäusen erahnen, die den bereits oben beschriebenen Rezeptor CX3CR1 nicht exprimieren. Dadurch waren DCs auch nicht in der Lage das Niereninterstitium zu erreichen. Der Krankheitsverlauf war signifikant besser als in Wildtyp (WT) Mäusen, Entzündungszeichen wie zum Beispiel die Anzahl an CD4<sup>+</sup> Zellen reduziert (89).

DCs sind wie in den sekundären Lymphorganen auch in ihrer geweberesidenten Form APCs. Als diese präsentieren sie im weiteren Verlauf den T-Zellen deren spezifische Antigene und schaffen ein Umfeld der Stimulation. DCs sind dabei nicht in den Glomeruli selber zu finden, sondern bilden periglomeruläre Infiltrate (79). Es kommt zur vermehrten Expression costimulierender Signale (z. B. CD80 und CD86) und proinflammatorischer Moleküle wie Tumornekrosefaktor (TNF) - $\alpha$ , IL-23 und IL-12. Interessanterweise nehmen in dieser Phase der Erkrankung auch die Expression des supprimierenden ICOS Liganden ab während die Level an IL-10 weiterhin steigen (92). Ein weiterer von manchen Autorinnen und Autoren vermuteter Zusammenhang ist die Rolle von dendritischen Zellen für die Rekrutierung von T<sub>H1</sub>-Zellen. Die Einwanderung dieser wird über den Cytokinrezeptor CXCR3 vermittelt, einer seiner Liganden CXCL9 vermehrt im entzündlich veränderten Nierengewebe exprimiert (77, 93).

Ein proinflammatorisches und für die Kommunikation zwischen DCs und T-Zellen wichtiges Molekül ist auch Interleukin-1b. Dieses wirkt u.a. positiv auf die Expansion und Differenzierung von CD4<sup>+</sup> Zellen zu T<sub>H17</sub> Zellen. Für die Produktion von IL-1b scheint ein Asc-abhängiges Inflammasom in den DCs bedeutend zu sein, mit dessen Hilfe es aus Pro-IL-1b gewonnen wird (94). Schließlich muss auch bedacht werden, dass DCs eine besondere Rolle als APCs innerhalb der Niere zukommt. Der glomeruläre Filter lässt mit heranschreitender glomerulärer Schädigung immer größere Proteine passieren. Auch diese werden von den phagozytierenden DCs aufgenommen, prozessiert und präsentiert. T-Zellen reagieren auf dieses größere und vielfältigere Angebot an Antigenen mit entsprechenden entzündlichen Cytokinen, ein Vorgang der die erst mit zunehmendem Schaden einsetzende inflammatorischen Effekte der DCs erklären könnte (92).

### **1.3.4.2 Das adaptives Immunsystem in der NTS**

#### ***1.3.4.2.1 CD4<sup>+</sup> Zellen***

T-Zellen, allen voran die sogenannten T-Helferzellen, spielen eine wesentliche pathogenetische Rolle im Mausmodell der experimentellen GN. Die klassischen T-Zellen, die schon relativ früh in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen vermutet wurden, sind die T<sub>H1</sub>-Zellen. Diese durch die Produktion von Interferon (IFN)- $\gamma$  charakterisierten Lymphozyten, galten als wesentliche Effektoren der zellulären Gewebeerstörung im Sinne einer Typ-4-Hypersensibilitätsreaktion in Autoimmunerkrankungen (95). Mit zunehmenden Erkenntnissen über die molekularen und zellulären Mechanismen, zeichnete sich auch ein viel komplexeres Bild der tatsächlichen Vorgänge ab. Nach und nach wurden mehr adaptive

und angeborene Zellen in der Entstehung der NTS als relevant identifiziert. Allen voran eine CD4<sup>+</sup> Zell-Subpopulation namens T<sub>H</sub>17 Zellen (96). Beobachtungen in anderen Autoimmunmodellen wie der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) zeigten einen schweren Verlauf in IFN- $\gamma$ -defizienten Mäusen (97). IFN- $\gamma$  stellt eines der wesentlichen Effektormoleküle der T<sub>H</sub>1-Zellen dar. Die scheinbare Abwesenheit von IFN- $\gamma$  in besagten Autoimmunmodellen führte zur Suche nach alternativen Effektoren. Heute lässt sich diese Lücke im Verständnis solcher Erkrankungen mit den später entdeckten T<sub>H</sub>17-Zellen füllen (98). Lange wurde diskutiert, welche dieser beiden T-Zell Gruppen schlussendlich für die Gewebedestruktion im Modell der NTS verantwortlich ist. Inzwischen lässt sich aber gut nachvollziehen, dass beide wesentliche proinflammatorische Rollen spielen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten aber unterschiedliche Relevanz haben (96).

Während T<sub>H</sub>17-Zellen bereits relativ früh nach NTS-Induktion in das Nierenparenchym einwandern und ihren quantitativen Höhepunkt je nach Studie ungefähr um das Ende der ersten Woche haben, lassen sich die T<sub>H</sub>1-Zellen erst einige Tage später nachweisen. Zu dieser Zeit hat sich die Zahl an T<sub>H</sub>17-Zellen schon wieder wesentlich verringert. Die Zahl an T<sub>H</sub>1-Zellen dagegen steigt auch deutlich nach zwei Wochen weiter an (77). Panzer et al. untersuchten neben der zeitlichen Abfolge auch die molekularen Mechanismen hinter diesen Abläufen, welche auf irgendeine Art zeitlich gesteuert werden müssen. Ihre Vermutung war, dass ein Zusammenspiel aus den T-Zell-Effektormolekülen IL-17 bzw. IFN- $\gamma$  und bestimmten Chemokinen für die zeitlichen Abläufe verantwortlich ist. T<sub>H</sub>17-Zellen tragen den Chemokinrezeptor CCR6 auf ihrer Oberfläche während T<sub>H</sub>1-Zellen CXCR3 exprimieren. Die jeweiligen Liganden zu diesen Rezeptoren CCL20 (für CCR6/T<sub>H</sub>17-Zellen) bzw. CXCL9 (für CXCR3/T<sub>H</sub>1-Zellen) vermitteln die Invasion der genannten Zellen über ihre Expression auf intrinsischen renalen Zellen. Folglich führt die „frühe“ Expression von CCL20 zur Rekrutierung von T<sub>H</sub>17-Zellen und damit zur vermehrten Sekretion von IL-17. Dieses wiederum hat positiven Einfluss auf die Expression von CXCL9 und damit auf die Invasion von IFN- $\gamma$  produzierenden T<sub>H</sub>1-Zellen. IFN- $\gamma$  schließt schlussendlich einen negativen Rückkopplungsmechanismus und hemmt die Expression von CCL20, was wiederum den Rückgang von T<sub>H</sub>17-Zellen unter zunehmender T<sub>H</sub>1-Präsenz erklären würde (93, 99, 100).

#### ***1.3.4.2.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen***

T<sub>H</sub>17-Zellen kommt also eine entscheidende Bedeutung in der noch relativ frühen aber bereits adaptiven und antigenspezifischen Phase zu. Adaptive Immunantworten brauchen jedoch Zeit und im Modell der NTS finden auch lange vor der T<sub>H</sub>17-Rekrutierung eine

Vielzahl an Vorgängen statt. IL-17 lässt sich ebenfalls sehr früh im Nierenparenchym nachweisen, da auch andere Zellen zur Produktion dieses Cytokins befähigt sind. In der experimentellen Glomerulonephritis sind diese wohl in erster Linie eine bestimmte Art von T-Zellen, die sogenannten  $\gamma\delta$ -T-Zellen (101). Dabei handelt es sich um eine Untergruppe von Lymphozyten, die sich durch einen alternativen und wesentlich weniger divergenten T-Zell-Rezeptor auszeichnen. Funktionell werden sie ähnlich den NKT-Zellen zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem eingeordnet (102).  $\gamma\delta$ -T-Zellen wird eine „Wächter“-Funktion im gesunden Nierengewebe zugeschrieben. Bereits wenige Tage nach NTS-Induktion beginnt eine Gruppe von ihnen unter dem Einfluss von IL-23, möglicherweise sezerniert von DCs, und dem Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t (engl. RAR-related orphan receptor  $\gamma$ t) mit der Ausschüttung von IL-17. Blockiert man diese Zellen im Mausmodell, kommt es in der frühen Krankheitsphase zu einer reduzierten Infiltration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (103). Zusammengefasst scheint es so, als würden nicht-adaptive Zellen wie  $\gamma\delta$ -T-Zellen die Mediation der Entzündungsvorgänge überbrücken, bis schließlich CD4<sup>+</sup> Zellen diese Aufgaben zunehmend übernehmen (103). Inwiefern das durch  $\gamma\delta$ -T-Zellen produzierte IL-17 auch einen Einfluss auf die Rekrutierung von T<sub>H</sub>17-Zellen hat, bleibt unklar. Sowohl ein stimulierender Effekt auf die Expression von CCL20 (99) als auch ein positiver Rückkopplungsmechanismus auf die T<sub>H</sub>17-Differenzierung (104) ist für IL-17 bereits beschrieben. Dieser mögliche Mechanismus ist jedoch insbesondere für die NTS noch nicht belegt worden.

#### ***1.3.4.2.3 Die Rekrutierung angeborener Immunzellen durch T-Zellen***

Die hier beschriebenen Mechanismen der T-Zell-Rekrutierung erklären noch nicht wie CD4<sup>+</sup> Zellen schlussendlich zum Phänotyp der NTS beitragen. T-Zellen fungieren als Stimulatoren angeborener Immunreaktionen und können als Verstärker innerhalb ihrer Effektormodule verstanden werden. Der Begriff der Effektormodule bezieht sich dabei auf das Zusammenspiel angeborener und adaptiver Reaktionen, die gemeinsam den verschiedenen Arten von Pathogenen angepasst werden können (81, 105). Je nach Art eines Erregers werden unterschiedliche Immunantworten des angeborenen Immunsystems aktiviert, an deren Ende schließlich auch die Aktivierung unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen steht. Diese adaptiven und antigenspezifischen T-Zellen erhöhen schließlich die Effizienz angeborener Immunzellen. So vermitteln z. B. ihre Cytokine die weitere Rekrutierung und Aktivierung von Phagozyten (81, 105). Diese Mechanismen spielen jedoch nicht nur bei der

Bekämpfung von Pathogenen eine Rolle, sondern finden auf ähnliche Weise auch in autoinflammatorischen Prozessen statt.

Interleukin-17A ist zum Beispiel bekannt die Expression von Chemokinen wie CXCL1, CXCL2 und CXCL5 zu vermitteln (106, 107), welche eine Rolle bei der Invasion von neutrophilen Granulozyten über deren Chemokinrezeptor CXCR2 spielen. Disteldorf et al. untersuchten diesen Zusammenhang im Mausmodell der experimentellen Glomerulonephritis. Hier zeigte sich, dass IL-17A die Expression von CXCL5 auf Tubuluszellen induziert und T<sub>H</sub>17-Zellen auf diese Weise, sobald sie sich im Nierengewebe angesammelt haben, die Rekrutierung von gewebeschädigenden neutrophilen Granulozyten vermitteln. TNF- $\alpha$  wirkt dabei synergistisch und verstärkt diese Wirkung noch weiter. Das Chemokin CXCL1 vermittelte dagegen die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in der früheren und T-Zell unabhängigen Phase der NTS und erwies sich in den Experimenten von Disteldorf et al. als IL-17A unabhängig (108). Wie oben bereits beschrieben, stehen auch  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Verdacht, die frühe Rekrutierung von Neutrophilen über IL-17 zu vermitteln. Glaubt man jedoch den beschriebenen Experimenten zu CXCL1 und IL-17, müssen andere Moleküle als IL-17 für die Rekrutierung von Neutrophilen durch  $\gamma\delta$ -T-Zellen verantwortlich sein.

Bei der Rekrutierung von Makrophagen spielen andere Chemokine eine Rolle als bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch T<sub>H</sub>17-Zellen. Wie oben bereits beschrieben exprimieren Monozyten die das Nierengewebe erreichen die Rezeptoren CCR2 und CX3CR1, wobei letzterer in der NTS eher eine Rolle für die Invasion dendritischer Zellen und weniger bei der Makrophagenrekrutierung spielt (88, 89). Insofern scheint hier besonders CCR2 und sein Ligand CCL2, auch als MCP-1 bezeichnet, von Bedeutung zu sein und als Werkzeug für die Rekrutierung von Makrophagen durch T-Zellen in Frage zu kommen. Die Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen ist ein wesentlicher Bestandteil der durch T<sub>H</sub>1-Zellen vermittelten Immunantworten auf „körperfremde“ Antigene. Entsprechend erwies sich die Rekrutierung von Makrophagen auch in der experimentellen Anti-GBM-GN als T<sub>H</sub>1 abhängig (95, 109). Nichtsdestotrotz gibt es von den genauen Mechanismen der Makrophagenrekrutierung unterschiedliche Vorstellungen. Als Tesch et al. bereits Ende der 90er Jahre die Rolle von CCL2 im NTS Modell untersuchten, zeigte sich damals vor allem auf kortikalen Tubuluszellen eine hohe Expression dieses Proteins. Die Bedeutung für die Invasion von Makrophagen in die Glomeruli und damit für den glomerulären Schaden war damals eher untergeordnet (110). Paust et al. wiederum vermuteten in ihren etwas jüngeren Studien in der NTS sowohl CCL2

als auch CCL5 für wesentliche Vermittler einer T<sub>H</sub>1-induzierten Makrophagen-Invasion (111). Andere Experimente, allerdings in Form eines LPS-Modells an Ratten, zeigten unter inflammatorischen Bedingungen auch in den Glomeruli eine hohe Expression von CCL2 mit resultierender Invasion von Makrophagen. Die Autorinnen und Autoren vermuteten dort, dass es sich bei der erhöhten CCL5 Expression um eine direkte Folge der Makrophagenrekrutierung handelte, nicht aber, wie von Paust et al. beschrieben, um deren Ursache (112). Diese widersprüchlichen Daten sind möglicherweise auf unterschiedliche experimentelle Modelle in unterschiedlichen Spezies zurückzuführen. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass CCL2 eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen in der NTS spielen könnte, womöglich aber auch andere Chemokine Einfluss haben.

Die andere Frage ist, wie T-Zellen nun Einfluss auf diese Mechanismen nehmen können. Favorisiert wird von vielen Autorinnen und Autoren das T<sub>H</sub>1-Effektormolekül IFN- $\gamma$ , welches eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen im NTS Modell zu haben scheint (75, 113). IFN- $\gamma$  ist grundsätzlich in der Lage die Expression von MCP-Molekülen (engl. Monocyte chemoattractant protein) wie CCL2 im Gewebe zu erhöhen und gleichzeitig die Produktion von Granulozyten rekrutierenden Chemokinen zu hemmen (114). Dennoch brachten Versuche mit IFN- $\gamma$  negativen MRL/lpr Mäusen, die eine der Lupus-Nephritis ähnelnden Erkrankung entwickeln, Zweifel an dieser Vorstellung in der Mausniere. Es bestätigte sich zwar der Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Makrophagenrekrutierung, die Mechanismen aber die man dahinter vermutete, waren von CCL2 unabhängig. Die Autorinnen und Autoren vermuteten eher einen Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (engl. intercellular adhesion molecule 1) und VCAM-1 (engl. vascular cell adhesion molecule 1) und damit CCL2 und IFN- $\gamma$  als zwei voneinander unabhängige Faktoren (115). Auch wenn die Details noch nicht im vollen Umfang aufgedeckt sind, lässt sich zusammenfassend feststellen, dass ein durch T<sub>H</sub>1-Zellen verstärktes proinflammatorisches Milieu zur Rekrutierung von weiteren Makrophagen führt. In-vitro Experimente an Ratten zeigten, dass auch intrinsische renale Zellen wie z. B. Mesangiumzellen an diesen Mechanismen beteiligt sein könnten. Diese produzierten stimuliert mit IL-1 nämlich ebenfalls CCL2 (116).

#### **1.3.4.2.4 CD8<sup>+</sup> Zellen**

Eine andere Gruppe von T-Zellen sind die sogenannten zytotoxischen CD8<sup>+</sup> Lymphozyten. Diese Zellpopulation ist in der Lage pathologische körpereigene Zellen, zum Beispiel wenn solche durch einen Virus befallen sind, durch die Aktivierung apoptotischer Signalwege

abzutöten. Auf diese Weise können Erreger, die durch herkömmliche Effektoren nicht erreicht werden können, ebenfalls in ihrer pathologischen Aktivität eingedämmt werden. Für diese zytotoxische Aktivität muss eine aktivierte CD8<sup>+</sup> Zelle mit dem MHC-Klasse-I Molekül einer infizierten Zelle interagieren. Über diese Strukturen präsentieren körpereigene Zellen Antigene aus ihrem Inneren und ermöglichen es dadurch den antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> Zellen eine infizierte Zelle zu identifizieren. In Folge dessen kommt es schließlich zur Induktion der Apoptose (85).

Die Durchführung der NTS in TAP-1-defizienten Mäusen, die sich durch eine massiv eingeschränkte Antigenpräsentation über MHC-I auszeichnen, konnte zeigen, dass diese Art der T-Zell vermittelten Zytotoxizität keine besondere Rolle in diesem Mausmodell zu haben scheint (117). Nicht auszuschließen ist dagegen ein Einfluss auf den Krankheitsverlauf durch proinflammatorische Helferfunktionen. Zytotoxische T-Zellen sind grundsätzlich in der Lage über IFN- $\gamma$  die Invasion von Makrophagen zu verstärken (85) und eine ähnliche Funktion wurde für die NTS in Ratten vermutet (109).

#### ***1.3.4.2.5 Regulation der immunologischen Abläufe***

Dem Immunsystem stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, um Entzündungsreaktionen entgegenzuwirken und regulatorisch auf die potentiell tödlichen Mechanismen Einfluss zu nehmen. Dabei ist die Balance zwischen Inflammation und Regulation in Autoimmunerkrankungen häufig verschoben (85, 118). Wesentlich sind eine Gruppe von CD4<sup>+</sup> Zellen, deren Aufgaben sich von denen proinflammatorischer Lymphozyten unterscheiden. Diese werden als regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen) bezeichnet. Grundsätzlich können naive T-Zellen unter entsprechendem Cytokin-Milieu zu solchen regulatorischen Zellen differenzieren und werden dann als induzierte T<sub>reg</sub>-Zellen (iT<sub>reg</sub>) bezeichnet. Andererseits entstehen sogenannte natürliche regulatorische T-Zellen (nT<sub>reg</sub>) im Thymus aus autoreaktiven T-Zellen (85). Regulatorische T-Zellen haben die zentrale Bedeutung des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) gemeinsam. Ihre regulatorische Aktivität ergibt sich einerseits aus der hohen Expression von CTLA-4 und CD25, andererseits aus der Ausschüttung regulatorischer Cytokine (85, 119). CTLA-4 (engl. cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) konkurriert wahrscheinlich um die CD28 Liganden B7.1 und B7.2 und nimmt anderen T-Zellen dadurch wichtige costimulierende Signale (siehe auch Kapitel 1.4). Auf ähnliche Weise konkurriert der relativ stark affine Rezeptor CD25 um IL-2 mit der Umgebung. Die wichtigsten Cytokine regulatorische T-Zellen sind TGF- $\beta$  und IL-10. Diese hemmen z. B. die Proliferation und

Differenzierung von T-Zellen und reduzieren die Expression von MHC-Molekülen und costimulierenden Signalen auf APCs (85).

Um die Rolle regulatorischer T-Zellen in der NTS zu verstehen, führten Wolf et al. ein Transferexperiment durch. Dazu wurden immunisierten Mäusen einen Tag vor Injektion des NTS-Serums  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen transferiert und mit Mäusen, denen  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen transferiert wurden, verglichen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikant gebessertes Bild der Erkrankung. Interessanterweise ließen sich die transferierten regulatorischen T-Zellen nicht in den Nieren selber vermehrt nachweisen, sondern sammelten sich in den sekundär lymphatischen Geweben an. Dennoch kam es zu einer wesentlichen Reduktion der Invasion immunologischer Zellen in das Nierenparenchym und einem verringerten inflammatorischen Bild (120). Dass diese Mechanismen tatsächlich eine Rolle in der NTS spielen, zeigte sich in Experimenten mit CCR7-negativen Mäusen. CCR7 spielt eine zentrale Rolle für die Migration einiger Immunzellen in die sekundär lymphatischen Gewebe. Zu diesen gehören auch die regulatorischen T-Zellen. Wird CCR7 von nephritischen Mäusen nicht exprimiert, verschlechtert sich das Erkrankungsbild. Die Experimente von Eller et al. konnten zeigen, dass die Effekte in solchen Knockout (KO) Mäusen durch den Transfer CCR7 exprimierender regulatorischer T-Zellen aufgehoben werden (121). Die beschriebenen Studien beweisen einerseits, dass regulatorische T-Zellen dem Bild der NTS in nephritischen Mäusen entgegenwirken und andererseits, dass sie ihre immunsupprimierenden Effekte von den sekundär lymphatischen Geweben aus vermitteln. CCR7 muss also in diesem GN-Modell besonders für die Migration regulatorischer T-Zellen in die lymphatischen Gewebe bedeutend sein.

Auch Mastzellen scheinen protektive Effekte in der NTS zu haben. Mastzell-defiziente Mäuse entwickelten einen schwereren Phänotyp als Kontrollgruppen, welche mit Mastzellen rekonstituiert wurden (122). Auch wenn Mastzellen in erster Linie für ihre Beteiligung an IgE-vermittelten allergischen Reaktionen bekannt sind, scheinen sie in vielen Immunantworten modulierende Einflüsse auf angeborene und adaptive Mechanismen zu haben (123). Die protektiven Effekte regulatorischer T-Zellen sowie die der Mastzellen scheinen, zumindest in der experimentellen GN, zusammenzuhängen. Anscheinend vermitteln regulatorische T-Zellen die Rekrutierung von Mastzellen in sekundär lymphatische Gewebe, wo diese ihre protektiven Funktionen ausführen. Darauf hinweisend ist, dass regulatorische T-Zellen in Abwesenheit von Mastzellen ihre begünstigenden Eigenschaften für das Bild der NTS verlieren (124).

#### ***1.3.4.2.6 B-Lymphozyten***

B-Lymphozyten sind in ihrer Form als Plasmazellen die wichtigen Antikörperproduzenten humoraler Immunantworten. Vermittelt durch ihren spezifischen B-Zell-Rezeptor (BCR) kommt es zur Aufnahme von Antigenen. Anschließend werden diese prozessiert auf MHC-Klasse-II Molekülen auf ihrer Oberfläche präsentiert und von den TCRs bereits differenzierter T-Helferzellen erkannt (sogenannte folliculäre T-Helferzellen). Diese Interaktion ist notwendig, um B-Zellen zu aktivieren und damit die Antikörper-Produktion in Gang zu setzen. Der Kontakt von T- und B-Lymphozyten findet dabei im Grenzgebiet zwischen T-Zell-Zone und den B-Zell-Follikeln der lymphatischen Gewebe statt (125).

Ähnlich der Kommunikation zwischen dendritischen Zellen und naiven T-Zellen, spielen auch zwischen folliculären T-Zellen und B-Zellen costimulierende Moleküle und Cytokine eine wesentliche Rolle. Aktivierte folliculäre T-Helferzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche zum Beispiel den CD40 Liganden, der über CD40-Rezeptoren auf B-Zellen wichtige Überlebenssignale vermittelt. Auf ähnliche Weise verstärkt auch der CD30 Ligand (CD30L) die Aktivierung von B-Zellen. Als Beispiel für die an dieser Stelle relevanten Cytokine sei das von folliculären T-Zellen sezernierte IL-21 genannt, das ebenfalls positiven Einfluss auf die Proliferation von B-Zellen zu haben scheint (125).

Diese Vorgänge stellen die Grundlage für eine Vielzahl weiterer Schritte dar, an deren Ende aktivierte reife Plasmazellen die lymphatischen Gewebe verlassen um antigenspezifische Antikörper zu produzieren (125). B-Zellen und Autoantikörper haben eine zentrale Rolle in einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen. Der Klassiker bezogen auf die Niere ist wohl die Anti-GBM-Glomerulonephritis, bei der gegen Bestandteile der glomerulären Basalmembran gerichtete Antikörper zu einer schweren Nierenschädigung führen (32). Bezogen auf die NTS ist die Rolle der B-Zellen jedoch nicht ganz eindeutig. Es ist zu erwarten, dass im Rahmen der Immunantwort auf die heterologen Antikörper auch humorale adaptive Komponenten eine Rolle spielen. Gegen die vom Kaninchen stammenden Antikörper gerichtete autologe Immunglobuline könnten eine wesentliche Rolle bei der Bildung von Immunkomplexen im Bereich der GBM spielen (74). Allerdings konnten Li et al. bereits Ende der 90er Jahre zeigen, dass sich auch ohne die Ablagerung autologer Antikörper bzw. ohne die Anwesenheit funktionstüchtiger B-Lymphozyten der Schweregrad und histologische Phänotyp der Erkrankung nicht änderten (126). Auch umgekehrt zeigte sich in Ratten, dass die Ablagerung von autologen Antikörpern entlang der GBM ohne die Anwesenheit von Lymphozyten nicht ausreichte, um einen akuten Nierenschaden hervorzubringen (109). Ergänzend sei angemerkt, dass auch in anderen Glomerulonephritis-

Modellen eine gewissen Unabhängigkeit von humoralen Immunantworten beobachtet werden konnte (127, 128).

### **1.3.4.3 Das angeborene Immunsystem**

T-Zellen verstärken, wie bereits besprochen, Effektoren des angeborenen Immunsystems und tragen auf diese Weise wesentlich zu Gewebeschäden in Autoimmunerkrankungen bei. Trotz ihrer großen Bedeutung für Erkrankungen wie den Glomerulonephritiden, lassen sich pathologische Mechanismen nicht ausreichend verstehen, wenn man nicht auch die Funktionsweisen angeborener Immunantworten berücksichtigt. Wie bereits oben beschrieben, führen die unterschiedlich differenzierten T-Zell-Subtypen zu einer Veränderung von Chemokinexpressionsmustern im Gewebe und damit zur vermehrten Rekrutierung von Neutrophilen und Makophagen (vgl. Kapitel 1.3.4.2.3).

#### ***1.3.4.3.1 Die Initiierung der Entzündungsreaktion***

Das angeborene Immunsystem ist dabei aber nicht unbedingt auf antigenspezifische adaptive Zellen angewiesen. Vielmehr sind es die Neutrophilen, Makrophagen und dendritischen Zellen, die einerseits als Sensorzellen Entzündungsreaktionen überhaupt erst losstreten und andererseits in die Gewebe eingedrungene Pathogene beseitigen (129). Antigenspezifische T-Zellen brauchen Zeit um zu differenzieren und in die Gewebe zu gelangen, wohingegen Makrophagen und dendritische Zellen bereits unter physiologischen Umständen in der Niere zu finden sind (130). Die Induktion einer Entzündungsreaktion angeborener Immunmechanismen erfolgt über unterschiedliche Rezeptoren, die nicht nur auf den Immunzellen, sondern teilweise auch einer Vielzahl intrinsischer renaler Zellen exprimiert werden. Zu diesen Rezeptoren zählt man in erster Linie Fc-Rezeptoren, Komplementfaktorrezeptoren sowie die PRRs. Während Fc-Rezeptoren die konstante Fc-Region von Antikörpern bzw. Immunkomplexen binden und Phagozyten zur Phagozytose anregen (129), scheinen sie auch auf Mesangiumzellen in murinen Anti-GBM-Modellen eine entzündungsmediierende Rolle zu haben (131). Das Komplementsystem nimmt mit seinen Bestandteilen ebenfalls Einfluss auf die Phagozytose. Auf Neutrophilen, Makrophagen und DCs exprimierte Komplement-Rezeptoren verstärken die Aktivität dieser phagozytierenden Zellen und ermöglichen die Registrierung von komplementgebundenen Strukturen und Pathogenen (132). Die wesentliche Bedeutung für das Komplementsystem in experimentellen GN Modellen, insbesondere seine Rolle für die Aktivität und Rekrutierung von Neutrophilen, konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden (133-135).

Besonders starke Signale, welche zur Produktion proinflammatorischer Cytokine führen, sind das Auftreten sogenannter Damage-associated molecular patterns (DAMPs), welche durch PRRs erkannt werden können. Treten durch Zelluntergang im interstitiellen Gewebe vermehrt Moleküle wie DNA, RNA, ATP etc. auf, werden diese durch z. B. TLRs gebunden und Entzündungsreaktionen ausgelöst (129). PRRs werden ähnlich den Fc-Rezeptoren nicht ausschließlich von Phagozyten und anderen Immunzellen exprimiert, sondern treten in der Mauslinie in großer Zahl auch auf intrinsischen Zellen auf (136).

Im Modell der NTS kommt es nach Induktion zur Ablagerung heterologer Antikörper an der glomerulären Basalmembran. Diese artfremden Antikörper werden vom murinen Immunsystem als „fremd“ erkannt, was früher oder später, je nachdem ob die Mäuse vorher immunisiert wurden, zur Ablagerung homologer Antikörper und Komplementaktivierung führt (75, 77). Es folgt die Rekrutierung von Immunzellen mit resultierendem Gewebeschaden. Damit ist die Grundlage für die Aktivierung von Fc-, Komplement- und Pattern-Recognition-Rezeptoren gegeben und die Expression proinflammatorischer Botenstoffe im Gewebe steigt massiv an. Fu et al. führten genauere Untersuchungen zum Thema Fc- und Pattern-Recognition-Rezeptoren im NTS Modell durch und konnten so die wesentlichen Rollen einer Vielzahl von TLRs für den Schweregrad der Erkrankung beweisen (137). Unter Verabreichung zusätzlicher TLR Liganden bei NTS-Induktion, kam es zu einem synergistischen costimulierenden Effekt, der bereits in den ersten Stunden nach Induktion zu einer erhöhten Expression von proinflammatorischen Molekülen wie IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und CCL2 führte. Erhöhte Expressionsmuster ließen sich dabei nicht nur für Makrophagen, sondern auch Mesangiumzellen nachweisen. Letztere waren dabei jedoch besonders auf die Anwesenheit costimulierender Signale wie LPS angewiesen und zeigten unter isolierter Stimulation mit Antikörpern und ihren Fc-Regionen kaum Reaktion. Möglicherweise erklärt dies die widersprüchlichen Ergebnisse anderer Studien, aus denen eine untergeordnete Rolle der Fc-Rezeptoren auf Mesangiumzellen für den Krankheitsverlauf der NTS hervorgingen (138). Fu et al. heben außerdem hervor, dass zirkulierende Leukozyten wie neutrophile Granulozyten in dieser frühen und für die Entzündung weichenstellenden Phase noch nicht im Gewebe anzutreffen waren. Als Folge der vermehrten Expression von Cytokinen und Chemokinen kommt es zur Rekrutierung und Invasion zirkulierender Immunzellen, allen voran von neutrophilen Granulozyten (129, 139). Diese stellen eine für den Organismus besonders wichtige Zellpopulation dar, die nach Registrierung von Pathogenen schnell ins entzündliche Gewebe immigrieren können, um dort Krankheitserreger effizient zu beseitigen. Dem entsprechend spielen sie in vielen

Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle und tragen auch im Glomerulum wesentlich zur Pathogenese bei (78).

Eine besondere Rolle unter den Phagozyten des angeborenen Immunsystems haben auch die dendritischen Zellen. Ihre Funktionen im Nierengewebe sind vielfältig (siehe oben) und ihre Rolle in Bezug auf entzündliche Erkrankungen komplex. Wie auch andere Phagozyten tragen sie wesentlich zu einem inflammatorischen Umfeld sowie zur direkten als auch indirekten Rekrutierung von Neutrophilen (z. B. im Rahmen bakterieller Infektionen) bei (77, 103). Ihre Funktionen wurden bereits an früherer Stelle beschrieben.

#### ***1.3.4.3.2 Die „Waffen“ des angeborenen Immunsystems und Gewebeschäden***

Die komplizierten Mechanismen der Phagozytenrekrutierung zwischen angeborenen Immunzellen und T-Zellen ist für adäquate Immunantworten entscheidend. Diese Abläufe sind aber auch diejenigen, welche in Autoimmunerkrankungen zu massiven Gewebeschäden führen können. Die bloße Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen erklärt noch nicht die im Verlauf der NTS entstehenden Schäden an den Glomeruli. Im Folgenden sollen deswegen genau jene „Waffen“ der Immunzellen beschrieben werden, die einerseits die Beseitigung von Erregern bzw. Fremdanigenen im physiologischen Umfeld, andererseits den Untergang des körpereigenen Gewebes im Rahmen von Autoimmunerkrankungen herbeiführen.

Für gewöhnlich kommt es nach der Phagozytose durch Neutrophile oder Makrophagen zur intrazellulären Beseitigung des Erregers. Dies geschieht unter Zuhilfenahme von antimikrobiellen Peptiden und anderen Enzymen wie z. B. sauren Hydrolasen, toxischen Sauerstoffmetaboliten und Stickstoffmonoxid. Kontakt zwischen toxischen Molekülen und Erreger findet dabei innerhalb der Phagolysosomen statt (129). Allerdings kann es unter bestimmten Bedingungen, z. B. bei starker Stimulation oder bei für die Phagozytose zu großen Erregern (140), auch zur Ausschüttung dieser Moleküle nach extrazellulär kommen und dadurch der Untergang von körpereigenen Zellen verursacht werden. Kommen Phagozyten mit Immunkomplexen oder Komplementfaktoren wie C5a in Kontakt, verstärken sie ihre toxische Aktivität und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Liegen also zum Beispiel komplementgebundene Pathogene vor und werden diese phagozytiert, resultiert eine stärkere toxische Aktivität der Phagozyten als beim Nachkommen ihrer Scavenger-Funktionen (129).

#### 1.3.4.3.2.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten gelten dabei als die Immunzellen mit der stärksten gewebetoxischen Aktivität (141). Körpereigene Gewebe sind grundsätzlich durch Anti-Proteinasen und Antioxidantien vor der Sekretion der in Granula gespeicherten Moleküle geschützt. Gelangen jedoch so hohe Level an Proteasen, Nukleasen und Hydrolasen sowie den reaktiven Sauerstoffspezies in die Umgebung, sodass diese Schutzmechanismen nicht mehr ausreichen, kommt es zum Untergang von körpereigenen Zellen (141, 142). Weiss und Stephen stellten bereits Ende der 80er Jahre die Theorie auf, dass vor allem die Kombination aus Sauerstoffmetaboliten und toxischen Enzymen einen potenten gewebeschädigenden Mechanismus darstellen (143). Dabei führen die durch NADPH erzeugten ROS zu einem Umfeld, in dem Anti-Proteinasen gehemmt werden und toxische, durch neutrophile Granulozyten sezernierte Enzyme ihre Aktivität steigern. Auf diese Weise werden umliegende Strukturen angegriffen und sind den bakteriziden Enzymen schutzlos ausgeliefert. Inwiefern sich dieses Erklärungsmodell auch auf in-vivo Mausmodelle und die Glomerulonephritis übertragen lassen, lässt sich nicht abschließend beantworten. ROS, Stickoxide und die vielfältigen Enzyme der neutrophilen Granulozyten tragen aber auf alle Fälle wesentlich zur Schädigung der GBM und des Endothels bei (78, 140).

Ein weiterer diskutierter Mechanismus glomerulären Schadens ist der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf das durch Neutrophile sezernierte Enzym Myeloperoxidase. Dieses Enzym katalysiert eine Reaktion mit Halogenen und führt zur Entstehung von hypohalogenigen Säuren sowie weiteren Halogenverbindungen (144). Solche sind hoch bakterizid, im Setting einer glomerulären Autoimmunerkrankung jedoch auch fatal für die GBM und Zellmembranen von Endothel und Epithelzellen (78, 145). Die Induktion einer NTS in MPO-negativen Mäusen bewies den Einfluss auf den glomerulären Schaden in den frühen Phasen des Krankheitsmodells. Die Funktionen der MPO scheinen dabei jedoch wesentlich weitreichender und komplexer zu sein und sind insbesondere für den späteren Krankheitsverlauf und in Bezug auf ihren supprimierenden Effekt auf T-Zellen noch nicht vollständig verstanden (146).

So lässt sich nachvollziehen inwiefern  $T_H17$ -Zellen den Krankheitsverlauf der NTS beeinflussen. Nachdem nicht-adaptive Mechanismen bereits sehr früh zu einer ersten Welle der Neutrophilenrekrutierung führen, kommt es nach Invasion von  $T_H17$ -Zellen zu einer quantitativ hochrelevanten zweiten Welle an einwandernden Neutrophilen (108). Angemerkt sei, dass diese zwei unterschiedlichen Wellen der Neutrophilen-Invasion anscheinend räumliche Differenzen aufweisen, denn während die ersten Neutrophilen direkt

in die Glomeruli einwandern, sammeln sich die der zweiten Welle eher im Interstitium (75, 108).

#### **1.3.4.3.2.2 Makrophagen**

Genauso wie Neutrophile sind auch Makrophagen für die volle Ausprägung des Krankheitsbildes der NTS absolut notwendig (147, 148). Ihre Bedeutung in dieser experimentellen Form deckt sich mit ihrer Rolle in humanen Glomerulonephritiden. So korrelierte die Anzahl der Makrophagen in einer Biopsiestudie zur Lupus-Nephritis signifikant mit dem Outcome der Erkrankung (149). Auch in diesen Phagozyten tragen proteolytische Enzyme, ROS und NO zur Toxizität gegenüber eingedrungenen Erregern bei und führen bei Sekretion in die Umgebung zu Gewebeschäden (78, 150). Duffield et al. konnten jedoch auch andere Mechanismen für die NTS identifizieren, an denen Makrophagen beteiligt sind. Die Depletion dieser Phagozyten ab Tag 15 nach NTS-Induktion verringert nicht nur die glomeruläre Halbmondbildung und den tubulären Schaden, sondern auch die interstitielle Fibrosierung der Mäusen (148). Die Autorinnen und Autoren konnten dabei zeigen, dass die Anwesenheit aktivierter entzündlicher Makrophagen mit der Zahl an Myelofibroblasten sowohl periglomerulär (-> Halbmondbildung) als auch interstitiell (-> interstitielle Fibrose) korrelierte und möglicherweise auch direkten Einfluss auf deren Matrixsynthese nehmen. Dass Makrophagen Einfluss auf die Fibrosierung von Glomeruli und Interstitium nehmen können ist bereits einige Jahre bekannt (78), doch die genauen Vorgänge werden bis heute scharf diskutiert (151). Auch in Ratten führt die Inhibition von Makrophagen in der späteren fibrotischen Phase (zwischen Tag 14 und 35) zur signifikanten Reduktion der glomerulären und interstitiellen Fibrose. In diesen Untersuchungen zeigte sich außerdem, dass während in der akuten NTS der M1 Phänotyp der Makrophagen dominierte, während der chronischen fibrotischen Phase ein Switch zum alternativ aktivierten M2 Phänotyp zu beobachten war (152). Trägt man Beobachtungen aus dieser aber auch weiteren tierexperimentellen oder human Studien zusammen, könnten neben TGF- $\beta$ 1 auch die Produktion von zum Beispiel CTGF (engl. Connective tissue growth factor), PDGF (engl. Platelet-derived growth factor) und FGF (engl. fibroblast growth factor) durch diese speziellen Makrophagen und deren Einfluss auf Myelofibroblasten eine Rolle bei der Fibrosierung spielen (151-154). Bezogen auf die NTS in Mäusen bleiben diese Mechanismen jedoch vorerst spekulativ.

Die während der akuten Phase der Erkrankung überwiegenden M1 Makrophagen werden im Rahmen von Typ 1 Immunantworten durch T<sub>H</sub>1 Zellen auf „klassische Weise“ aktiviert (105). Diese antigenspezifische Regulation durch das adaptive Immunsystem ermöglicht

dabei genau dort die Toxizität zu erhöhen, wo sie auch wirklich benötigt wird und schützt dadurch vor unnötigen Kollateralschäden. Makrophagen präsentieren über MHC-II-Moleküle ihre intrazellulären phagozytierten Antigene und kommen dadurch mit den entsprechenden spezifischen T<sub>H1</sub> Zellen in Kontakt. Das durch diese wiederum sezernierte IFN- $\gamma$  in Kombination mit dem membrangebundenen CD40 Liganden aktiviert die Makrophagen. M1-Makrophagen erhöhen daraufhin die TNF- $\alpha$  und IL-12 Sekretion. Ihre toxische Aktivität steigt, Moleküle wie NO und O<sub>2</sub><sup>-</sup> werden vermehrt produziert, die Makrophagen selber sensibler für die weitere Aktivierung (105). Auf Grund dieser Zusammenhänge sprechen manche Autorinnen und Autoren auch von den Makrophagen als „Fußsoldaten“ der T-Zellen, die auf deren Signale hin als hochtoxische Exekutive agieren (155).

Das Verständnis der M2-Makrophagen ist dagegen stark im Wandel. Der „alternative“ Aktivierungsweg durch T<sub>H2</sub>-Zellen über IL-4 und IL-13, der vor einigen Jahren noch als definierend für diese spezielle Subpopulation galt, ist heute nicht mehr ausreichend, um der Komplexität der Makrophagenpolarisierung gerecht zu werden. Zahlreiche mögliche Signalwege sind heute identifiziert und auch die Reduktion der M2-Makrophagen auf Reparaturfunktionen im Nierengewebe entspricht, wie die oben beschriebenen Experimente zeigen, nicht der Realität (105, 156). Was also im Detail zum Shift von einer M1- zu einer M2-Dominanz in der späteren Phase der chronischen NTS führt, ist noch nicht ausreichend verstanden.

## **1.4 Costimulation**

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch eine beispiellose Präzision aus. Unmengen an antigenspezifischen Rezeptoren ermöglichen es den Lymphozyten exakt dort zu wirken wo sie auch benötigt werden und mit viel höherer Effektivität zuzuschlagen als es dem angeborenen Immunsystem alleine möglich wäre.

Ein Lymphozyt ist also hochspezifisch für ein bestimmtes, im Idealfall pathologisches, Antigen bzw. molekulares Strukturmerkmal eines Erregers. T-Zellen erkennen ihre spezifischen Antigene über den sogenannten T-Zell-Rezeptor (TCR), B-Lymphozyten entsprechend über den B-Zell-Rezeptor. Die Signale, die durch diese Rezeptoren vermittelt werden, reichen alleine jedoch nicht aus, um einen Lymphozyten zu aktivieren. Es bedarf weiterer Kommunikation zwischen Lymphozyten und anderen Immunzellen, um adaptive Immunantworten loszutreten. Die Rezeptoren und Liganden, die solche zusätzlichen Signale vermitteln, werden unter dem Begriff der Costimulation zusammengefasst. Die Komplexität

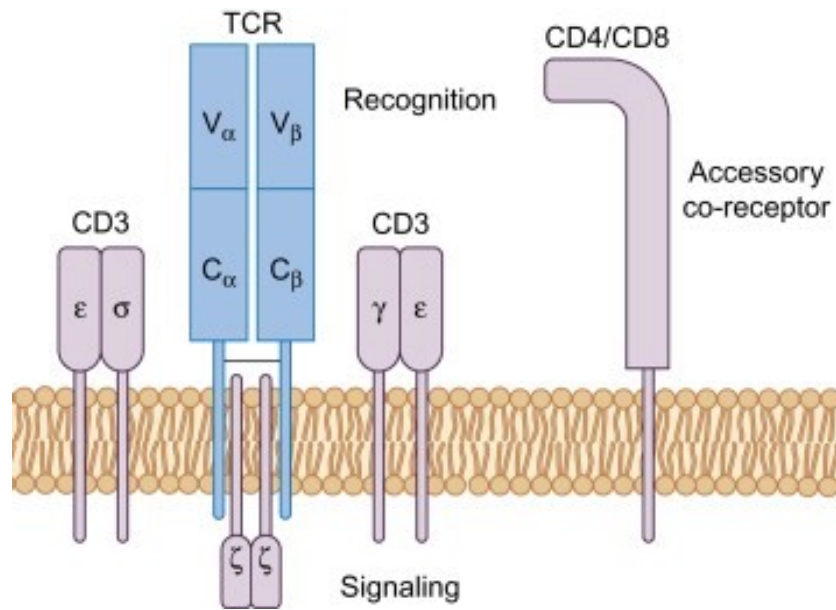
und Vielfältigkeit dieser großen Gruppe von Rezeptoren und Liganden stellt im Verständnis immunologischer Prozesse eine große Herausforderung dar. Gleichzeitig jedoch sehen im Verständnis dieser komplexen Kommunikations-Achsen viele ein großes Potential für die Therapie von z. B. Autoimmunität oder Malignomen. Die hier in einem murinen Modell der Glomerulonephritis untersuchten Rezeptoren CD30 und Ox40 gehören ebenfalls zu dieser heterogenen Gruppe. Im Folgenden soll der Schwerpunkt auf der Bedeutung costimulierender Signale für T-Zell-Antworten, insbesondere auf denen der CD4<sup>+</sup> Zellen, liegen.

#### **1.4.1 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex und seine Signalwege**

Der T-Zell-Rezeptor (und auf ähnliche Weise auch B-Zell-Rezeptor) benötigt für die Erkennung seines spezifischen Antigens und die anschließende Umwandlung dieser Information in intrazelluläre Signale mehr als seine hochvariablen Proteinketten, die zur Erkennung von spezifischen Antigenen befähigt sind (157).

Zusätzlich notwendige Strukturen sind einerseits wichtig, um die Interaktion mit Antigen-MHC-Komplexen zu stabilisieren, andererseits um Signalkaskaden auf molekularer Ebene loszutreten. Solche Proteine sind zum Beispiel der CD3-Komplex sowie die Corezeptoren CD4 und CD8. Spricht man vom TCR, meint man jedoch meist die gesamte funktionelle Einheit (157). Diese ist folgendermaßen aufgebaut:

Die extrazelluläre und antigenspezifische Struktur des TCR besteht aus zwei Anteilen, die man gemeinsam als TCR- $\alpha\beta$ -Heterodimer bezeichnet. Hinzu kommen invariante Proteine, die in erster Linie der Signaltransduktion dienen. Diejenigen von ihnen, die ebenfalls einen größeren extrazellulären Anteil haben, werden als CD3-Komplex zusammengefasst. Hinzu kommt noch ein zum größten Teil intrazelluläres Homodimer aus Signalproteinketten, bezeichnet als  $\zeta$ -Dimer (158). CD3-Komplex und  $\zeta$ -Dimer besitzen sogenannte ITAMS (engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), die durch Phosphorylierung ihrer Tyrosin-Anteile den Beginn der Signaltransduktion ermöglichen (159).



**Abbildung 3: T-Zell-Rezeptor-Komplex.**

Dargestellt ist das  $\alpha\beta$ -Heterodimer und  $\zeta$ -Dimer. Die extrazellulären Proteine  $\gamma$ ,  $\delta$  und zweimal  $\epsilon$  bilden gemeinsam den CD3-Komplex. Ebenfalls dargestellt ist der für T-Zellen namensgebende Corezeptor CD4 bzw. CD8.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Dimer des TCR besitzen jeweils eine variable (V) und eine konstante (C) Region. Die variablen Regionen ermöglichen gemeinsam das Erkennen spezifischer Antigene.

Quelle: Abbildung übernommen aus Actor JK *Introductory Immunology. Chapter 4 - T Lymphocytes: Ringleaders of Adaptive Immune Function* (160) mit Erlaubnis von Elsevier.

Die Bindung zwischen MHC-Antigen-Komplexen und dem TCR-Komplex bedarf jedoch noch weiterer Unterstützung. Man vermutet, dass die Bindung zwischen Antigen und dem hochvariablen TCR-Heterodimer eine zusätzliche Stabilisierung durch MHC-Moleküle und Corezeptoren benötigt (157). T-Helferzellen sind dabei für den CD4-Corezeptor positiv, welcher mit dem MHC-II-Komplex der APCs interagiert. Im Gegensatz dazu sind  $CD8^+$  zytotoxische Lymphozyten von MHC-I-Komplexen abhängig. Außerdem sind diese Corezeptoren durch intrazellulär-assoziierte Kinasen für die Phosphorylierung der ITAMs mitverantwortlich (161). Die genauen Abläufe dieser Mechanismen sind noch Gegenstand aktueller Forschung.

Als Folge auf die phosphorylierten ITAM-Sequenzen kommt es zur Rekrutierung weiterer Tyrosin-Kinasen (in T-Zellen ZAP-70, in B-Zellen auf ähnliche Weise Syk) und damit zu einer Kettenreaktion an Aktivierungen unterschiedlicher Proteine, Second Messenger und Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NFAT und  $NF\kappa B$  (engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells). Dafür besonders bedeutend ist die durch ZAP-70 vermittelte Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K), die zur Produktion des Second Messengers Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat ( $PIP_3$ ) führt (157). Die für die costimulierenden Rezeptoren Ox40 und CD30 relevanten Signalwege, die teilweise mit

denen der T-Zell-Rezeptoren synergistisch geteilt werden, sollen weiter unten im Detail besprochen werden (vgl. Kapitel 1.4.4.2).

### **1.4.2 Costimulation und die CD28-Familie**

Signale der TCR-Komplexe reichen nicht aus, um naive T-Zellen zu aktivieren und in Effektorzellen zu differenzieren. Weitere Rezeptoren werden benötigt, um die Signale, die durch Bindung des passenden MHC-II-Antigen-Komplexes losgetreten werden, zu verstärken (162). Diese zusätzlich notwendigen Rezeptoren und ihre Liganden werden unter dem Begriff der Costimulation zusammengefasst. Costimulation kann dabei als Hürde gesehen werden, welche zum Beispiel sicherstellt, dass nur aktivierte APCs auch entsprechende T-Zellen aktivieren können. Der Prototyp dieser Rezeptoren ist CD28 mit seinen vor allem auf APCs exprimierten Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Die durch CD28 verstärkten Signale beeinflussen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die Expression von Cytokinen sowie Chemokinen und kontrollieren den Zellzyklus. Zusammengefasst bedeutet dies Einfluss auf Proliferation, Überleben, Tod und Differenzierung der Zellen (157).

Genauso wie bei den TCR-Signalen spielt auch bei den CD28-Signalen die Aktivierung der PI3-Kinase eine zentrale Rolle. Das dadurch vermehrt produzierte PIP<sub>3</sub> führt über den Akt-Signalweg schließlich zur erhöhten Stoffwechselaktivität der Lymphozyten, zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und NFκB über den Phosphoinositid-Phospholipase C (PLC)-γ-Signalweg und zur Umstrukturierung des Zytoskeletts über den Vav-Signalweg (157, 163). Alle diese Signalwege werden mit dem TCR-Rezeptor geteilt, wobei für die Aktivierung dieser die Bildung von Microclustern aus TCR und CD28 entscheidend ist (164, 165). Signalwege werden genauer im Kapitel 1.4.4.2 besprochen.

Nicht alle mit CD28 verwandten Rezeptoren wirken stimulierend auf T-Zellen. CTLA-4 zählt zu solchen co-inhibitorischen Molekülen und teilt sich mit CD28 die Liganden B7.1 und B7.2. Ob für die inhibitorischen Eigenschaften von CTLA-4 durch dieses induzierte Signalwege verantwortlich sind oder ob die Konkurrenz durch CTLA-4 um B7.1 und B7.2 die ausschlaggebende Komponente darstellt, ist nicht abschließend geklärt (85, 166). Weitere inhibierende Vertreter der CD28-Superfamilie sind PD-1 (engl. Programmed cell death protein 1) und BTLA (engl. B- and T-lymphocyte attenuator).

### 1.4.3 Die TNF-Rezeptor-Superfamilie

Neben der CD28-Proteinfamilie wird auch noch die Superfamilie der TNF-Rezeptoren (TNFRSF) zur Costimulation gezählt. Diese Gruppe besteht aus mindestens 29 bekannten Vertretern von enger struktureller Verwandtschaft (167). Nicht alle Liganden dieser Rezeptor-Familie sind auch spezifisch für einen einzelnen Rezeptor. Manche von ihnen binden auch zwei oder mehr verschiedene TNF-Rezeptoren, was sich durch die enge strukturelle Verwandtschaft erklären lässt. Andererseits scheint es auch zu Interaktionen mit anderen Rezeptorfamilien wie die der Immunglobulin-Superfamilie zu kommen (162, 168). Grundsätzlich gibt es viele Ähnlichkeiten in der Funktion dieser beiden Rezeptorfamilien. Die Signalwege der TNFR-Familie sind dabei teilweise jedoch andere als die der Antigen-Rezeptoren und der CD28-Familie.

Das am längsten bekannte Mitglied der TNFRSF ist CD40 mit seinem Liganden CD154. Dieser Rezeptor besitzt in B-Lymphozyten ähnliche Funktionen wie CD28 auf T-Zellen (157, 164). Rezeptoren der TNFRSF sind elementar für die Funktionen verschiedener T-Zell-Subpopulationen. In naiven T-Helferzellen spielen sie zwar nicht so bedeutende Rollen für die Aktivierung bei Antigenkontakt wie CD28, dafür sind sie aber absolut wesentlich was die nachfolgenden Abläufe angeht. So werden Proliferationsvermögen, Zellüberleben und Effektorfunktionen durch die TNFRSF beeinflusst, wobei sowohl T-Helferzellen, Gedächtnis-T-Zellen als auch regulatorische und zytotoxische T-Zellen auf diese Weise direkt reguliert werden können (169). Viele dieser für T-Zellen wichtigen Rezeptoren befinden sich an einem gemeinsamen Genlocus. Chromosom 1p36 enthält die genetischen Informationen sowohl für die hier untersuchten Rezeptoren CD30 und Ox40 als auch für 4-1BB, HVEM, TNFR2, GITR und DR3 (162, 168, 170).

Die extreme Vielfalt an Rezeptoren dieser Familie und ihre Expression auf einer Vielzahl unterschiedlicher immunologischer und nicht-immunologischer Zellen erschweren das Verständnis der Funktionen einzelner dieser Rezeptoren und ihrer Liganden. Stellvertretend werden weiter unten die Vertreter CD30 und Ox40 im Detail besprochen. Diese Vielfalt liefert gleichzeitig eine große Anzahl potentieller therapeutischer Angriffspunkte in einem zentralen immunologischen Kommunikationssystem. Dadurch wird die TNFRSF zu einem attraktiven Forschungsfeld. Tabelle 3 gibt einen Überblick über eine kleine Auswahl von Rezeptoren und ihren Liganden aus dieser Familie.

Rezeptor	Andere Bezeichnung	Eigenschaft auf T-Zellen	Ligand
GITR	CD357	stimulierend	GITRL
Ox40	CD134	stimulierend	Ox40L
HVEM	CD270	stimulierend	LIGHT, LT $\alpha$ 3, BTLA, CD160
DR3		stimulierend	TL1A
4-1BB	CD137	stimulierend	4-1BBL
CD30		stimulierend	CD30L
TNFR2	CD120b	stimulierend	TNF $\alpha$ , LT $\alpha$ 3
CD27		stimulierend	CD27L (CD70)
TNFR1	CD120a	beides	TNF $\alpha$
Fas	CD95	inhibierend	Fas Ligand
TRAILR1	DR4/CD261	inhibierend	TRAIL
TRAILR2	DR5/CD262	inhibierend	TRAIL

**Tabelle 3: Ausgewählte Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie.**

*Aufgelistet sind eine Auswahl von auf T-Zellen regelmäßig exprimierten Rezeptoren und ihren Liganden. Insgesamt sind mindestens 29 Rezeptoren der TNFRSF bekannt.*

*Zusammengefasst aus Croft et al. *The TNF family in T cell differentiation and function--unanswered questions and future directions* sowie Ward-Kavanagh et al. *The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses* (162, 170).*

Nicht alle Rezeptoren der TNFRSF werden auf T-Zellen exprimiert und umgekehrt scheinen viele von ihnen auch in verschiedenen Geweben unabhängig von den immunologischen Funktionen physiologische Aufgaben zu besitzen. Auch die Liganden der TNFRSF werden nicht nur auf APCs, sondern auch auf einer Vielzahl anderer teilweise nicht-immunologischer Zellen exprimiert. Naheliegend ist also auch eine Bedeutung für die Kommunikation zwischen Immunzellen und zahlreichen anderen Geweben, die für die Regulation immunologischer Prozesse bedeutsam sein könnte (168, 169). Ebenfalls bemerkenswert ist die Expression von Liganden der TNFRSF auf T-Zellen sowie die Exkretion löslicher TNFR Liganden in ihre Umgebung. Inwiefern diese Mechanismen der Kommunikation der Lymphozyten untereinander, andererseits der Aktivierung anderer Leukozyten durch T-Zellen dienen, ist nicht abschließend geklärt (170). Die Expression löslicher Liganden deutet außerdem auf einen komplexen systemischen Einfluss entsprechender Immunantworten hin (162).

Viele der auf T-Zellen möglichen TNFRSF-Rezeptoren werden nicht konstitutiv exprimiert. Typischerweise folgt eine vermehrte Expression dieser Rezeptoren erst wenn eine T-Zelle bereits aktiviert wurde. Es gibt jedoch, abhängig von T-Zell-Subpopulation und beobachteter Spezies, auch Ausnahmen. Besonders murine regulatorische T-Zellen und Gedächtniszellen

haben die Tendenz viele dieser Rezeptoren, die sonst erst etwa 24h nach Antigenkontakt detektiert werden können, konstitutiv zu exprimieren. Aus dieser Beobachtung lässt sich folgern, dass Rezeptoren der TNFRSF weniger an der Aktivierung von Immunzellen beteiligt sind, als eher bei der Aufrechterhaltung von Immunantworten eine entscheidende Rolle spielen (164, 169). Dennoch auch auf naiven T-Zellen häufig konstitutiv exprimierte Rezeptoren sind CD27, DR3, GITR, HVEM und TNFR2 (170).

TNFRSF-Rezeptoren und ihre Liganden besitzen eine Trimer-Struktur. Kommt es zur Interaktion zwischen passendem Liganden und Rezeptor, führen die Wechselwirkungen zur Zusammenlagerung und Konformationsänderung (162, 168). Durch TNF-Rezeptoren ausgelöste Signalkaskaden werden durch die Rekrutierung sogenannter TNF-Rezeptor-assoziiierter-Faktor (TRAF) Adaptorproteine losgetreten. Mit proinflammatorischen TNF-Rezeptoren assoziierte Adaptorproteine vermitteln wahrscheinlich sowohl die Aktivierung von Proteinkinasen wie PI-3- und MAP-Kinasen als auch den NFκB-Signalweg (157, 170). Diese NFκB-Signalwege unterscheiden sich dabei von den durch TCR- bzw. CD28-vermittelten, als „kanonisch“ bezeichneten, NFκB-Signalwegen. Letztere spielen besonders bei der Aktivierung naiver T-Zellen eine Rolle, während der „nicht-kanonische“ Signalweg besonders für Effektorfunktionen differenzierter T-Zellen von Bedeutung zu sein scheint. Rezeptoren der TNF-Familie aktivieren nach Bindung ihrer Liganden jedoch häufig sowohl den kanonischen als auch den nicht-kanonischen NFκB-Weg (169, 171).

Bis heute sind mindestens sechs eng verwandte TRAF-Adaptorproteine bekannt. Einerseits vermitteln diese den Zusammenschluss großer Multiproteinkomplexe, andererseits wirken die meisten der TRAFs auch als E3-Ubiquitin-Ligasen. Sowohl die Organisation von Multiproteinkomplexen als auch die Ubiquitinierung von Proteinen der Signalkaskaden vermitteln die Transduktion und Weiterleitung von oben genannten Signalwegen (PI-3K, NFκB, etc.). Bedacht werden sollte jedoch auch, dass die TRAF-Adaptorproteine nicht exklusiv mit Rezeptoren der TNF-Superfamilie assoziiert sind. Auch der TCR, verschiedene TLRs (168) sowie einige Cytokin-Rezeptoren transduzieren ihre Signale mit Hilfe bestimmter TRAF-Adaptorproteine (172). Welche Rolle die verschiedenen TRAF-Moleküle schließlich für die Heterogenität der TNFRSF spielen und inwiefern für einzelne Rezeptoren spezifische TRAF-Kombinationen für deren Funktion ausschlaggebend sind, ist nicht abschließend geklärt. Klar ist aber, dass unterschiedliche TNFRSF-Rezeptoren auch unterschiedliche TRAF-Kombinationen rekrutieren und diese auch Einfluss auf ihre Funktionen zu haben scheinen. Bedacht werden müssen jedoch damit verbundene komplexere Effekte wie die Konkurrenz um TRAFs und Synergismus (170).

Nicht alle Rezeptoren der TNFRSF haben einen primär aktivierenden Effekt auf Lymphozyten. Genauso existieren auch in dieser Gruppe inhibitorische „Todesrezeptoren“, die zur Apoptose oder programmierten Nekrose führen können. TNFRSF-Rezeptoren, die inhibitorisch auf T-Zellen wirken, sind Fas, TRAILR1, TRAILR2 und TNFR1 (170). Durch Mitglieder wie Fas vermittelte apoptotische Signale werden ebenfalls durch Adaptorproteine ausgelöst. Nach Bindung eines passenden Liganden kommt es zur Rekrutierung von FADD (engl. Fas-associated protein with death domain) und dadurch in weiterer Folge zur Rekrutierung von Caspasen. Ein weiteres Protein, das an der Signaltransduktion apoptotischer Signale beteiligt ist, ist das mit dem TNFR1 assoziierte TRADD (engl. Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein). TNFR1 kann jedoch über TRADD-abhängige Signale auch proinflammatorischen Einfluss auf Zellen nehmen und unterscheidet sich in diesem Sinn etwas von seinen verwandten Rezeptoren (167, 170, 172).

#### **1.4.4 Ox40**

##### **1.4.4.1 Ox40-Expression**

Ox40 kann auf einer Vielzahl immunologischer Zellen wie z. B. neutrophilen Granulozyten exprimiert werden (173, 174). Entscheidend scheint dieser Rezeptor jedoch besonders auf T-Zellen zu sein. Dabei stellt er auf solchen einen Marker für Aktivität dar. Auf naiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen ist Ox40 dagegen nicht zu finden. Erst wenn es zur Aktivierung und in weiterer Folge zur Differenzierung in Effektorzellen kommt, wird dieser Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimiert (173). Besonders zahlreich ist er neben aktivierten CD4<sup>+</sup> Zellen auf regulatorischen T-Zellen und CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen zu finden. Die Expression folgt etwa 48h nach den TCR-Signalen, auf Gedächtniszellen bereits nach wenigen Stunden (174).

Der zugehörige Ox40 Ligand (Ox40L) wird im klassischen Verständnis dieser Interaktion auf APCs exprimiert. Zu diesen gehören neben dendritischen Zellen auch Makrophagen und B-Zellen. Auch Ox40L wird erst nach Aktivierung dieser Zellen exprimiert (173). Davon abgesehen sind auch eine Vielzahl anderer, teilweise nicht-immunologischer Zellen und Gewebe in der Lage, diesen Liganden zu exprimieren. Dazu gehören Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Mastzellen, natürliche Killerzellen sowie T-Zellen selbst (173-175).

Die genetischen Informationen dieses Rezeptor-Liganden-Paares findet man in Genen auf dem Chromosom 1 (1p36) mit den Bezeichnungen TNFRSF4 und TNFSF4 (174). Der Ox40L besitzt, wie andere Mitglieder der TNFR-Superfamilie, eine Trimer-Struktur. Kommt es zur Interaktion mit seinem Rezeptor, bindet ein Ox40L-Molekül drei Ox40-

Moleküle (173, 176). Auf den meisten Zellen werden Ox40 und Ox40L wie bereits erwähnt nicht konstitutiv exprimiert. Die Expression von Ox40 auf herkömmlichen T-Zellen benötigt zunächst Signale durch den TCR, sobald dieser ein passendes Antigen gebunden hat. Verstärkt werden diese Signale von zum Beispiel CD28 und dem IL-2-Rezeptor. Besonders letzterer nimmt nach Meinung mancher Autorinnen und Autoren eine entscheidende Rolle ein (177). Einfluss können auch andere Moleküle wie IL-1 sowie weitere costimulierende Signale nehmen (174). Der Ox40L auf APCs wird ebenfalls durch stimulierende Signale wie die durch CD40 und TLRs verstärkt exprimiert. Zusammenfassend lässt sich daher festhalten, dass die Kommunikation über Ox40 und seinen Liganden zwischen T-Zellen und APCs zunächst ein entsprechendes inflammatorisches Umfeld benötigt, um die Expression dieser Proteine überhaupt erst zu ermöglichen (173, 174).

#### **1.4.4.2 Signalwege durch die Ox40-Achse**

Die Effekte der Ox40-Achse auf unterschiedliche Zellpopulationen sind variabel. Dennoch sind es häufig ähnliche Signalkaskaden, welche für die Beeinflussung unterschiedlicher Zellen durch Ox40 verantwortlich sind. Wie bereits weiter oben beschrieben, rekrutieren Rezeptoren der TNFRSF sogenannte TRAF-Proteine. Im Falle von Ox40 sind diese TRAF2, TRAF5 und TRAF6. Die bei Aktivierung aus diesen Molekülen gebildeten Multiproteinkomplexe starten Signalwege, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führen (174). Bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B unterscheidet man grundsätzlich einen kanonischen von einem nicht-kanonischen Signalweg (171). Während die Signale des T-Zell-Rezeptors NF- $\kappa$ B über den kanonischen Signalweg aktivieren, können durch Ox40 rekrutierte TRAFs auch den nicht-kanonischen Weg nutzen (172, 178). Signale durch Ox40 können also einerseits die NF- $\kappa$ B Aktivierung durch TCR-Signale verstärken, andererseits durch andere Signalwege diesen Transkriptionsfaktor ganz eigenständig aktivieren. Die Funktion der NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren in T-Zellen ist wiederum vielfältig. Gelangen die aktiven Untereinheiten aus dem Zytoplasma in den Zellkern, kommt es zum Beispiel zur Expression von Cytokinen und damit zur erhöhten Aktivität und verstärkten Effektorfunktionen. Andererseits kommt es durch den Einfluss dieser Transkriptionsfaktoren auch zur vermehrten Expression antiapoptotischer Proteine wie solcher aus der Bcl-2-Familie (171, 173, 178). Wie auch der TCR ist Ox40 in der Lage die PI-3-Kinase zu rekrutieren, die über PIP<sub>3</sub> zur Aktivierung von Akt führt. Hier scheinen also die Signale durch Antigenerkennung und die Signale durch Ox40/Ox40L-Costimulation zusammenzulaufen und einander zu verstärken (173, 179). Bei Akt handelt es sich um eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die vereinfacht gesprochen die Stoffwechselaktivität der

Zellen erhöht (157). Akt wirkt wahrscheinlich zusätzlich über seinen Einfluss auf die Proteine Survivin, mTOR (engl. mammalian target of rapamycin) und die Aurorakinase B, welche positive Effekte auf die Zellzyklusprogression haben (178, 180). Durch Akt stimulierte mTOR-Signalwege haben noch weiteren Einfluss auf den Zellstoffwechsel und unterstützen die Synthese von mRNA und Ribosomen sowie die Proteintranslation in T-Zellen allgemein (157). Die hier beschriebenen Signalwege der TRAFs und der Akt-Aktivierung über die PI-3-Kinase sind jedoch nicht als vollkommen unabhängig voneinander zu betrachten. Eher ist es vermutlich so, dass z. B. TRAF2 als Adaptorprotein auch eine Rolle bei der Aktivierung der PI-3-Kinase bzw. Akt spielt (181).

Ein dritter wichtiger Signalweg, der durch Ox40 beeinflusst werden kann, ist die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie. Die Signalkaskade, die zur Aktivierung von NFAT führt, beginnt mit dem vermehrten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ . Die erhöhte Konzentration dieser Ionen im Cytoplasma führt zu strukturellen Veränderungen im Protein Calmodulin, was wiederum zur Aktivierung von Calcineurin führt. Calcineurin ermöglicht schließlich durch die Dephosphorylierung von NFAT dessen Translokation in den Zellkern (157). Der TCR erreicht diesen vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom durch den PLC- $\gamma$ /Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) Signalweg. Auch an dieser Stelle scheint Ox40 die Signalwege bei Antigenerkennung zu verstärken und den Einstrom an  $\text{Ca}^{2+}$  zu erhöhen (178, 182). NFAT spielt schließlich, wie sein Name *nuclear factor of activated T cells* bereits sagt, eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen (183). Dafür ausschlaggebend sind die durch diese Transkriptionsfaktoren verstärkte Proliferation und Cytokinproduktion, insbesondere die von IL-2 (178).

Die hier aufgelisteten Signalwege sind sicher nicht die einzigen, die mit der Ox40/Ox40L Achse assoziiert sind. Dennoch verdeutlichen sie einerseits, auf welche Art die Kommunikation zwischen Leukozyten über diese Rezeptoren und Liganden die Immunantwort beeinflussen können, andererseits wo Signale des TCR mit denen von Ox40 zusammenfließen.

#### **1.4.4.3 Effekte der Ox40-Achse**

Im Folgenden sollen die tatsächlichen Effekte der Ox40-Achse auf die einzelnen Lymphozyten-Subgruppen beschrieben werden. Im Hinterkopf sollte man dabei jedoch haben, dass der Einfluss durch Ox40-Signale sehr komplex zu sein scheint und die genauen Mechanismen noch nicht in allen Details verstanden sind. Diese Defizite im Verständnis spiegeln sich auch in den häufig widersprüchlichen Ergebnissen experimenteller Studien wider.

Wie bereits weiter oben beschrieben, wird Ox40 auf naiven CD4<sup>+</sup> Zellen nicht konstitutiv exprimiert. Erst einige Stunden nach Stimulation mit einem passenden Antigen durch APCs wird dieser Rezeptor vermehrt auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert und ist für seinen Liganden erreichbar (174). Diese Beobachtung impliziert, dass die Ox40/Ox40L-Achse nicht an der frühen Aktivierung naiver T-Zellen beteiligt zu sein scheint, dafür aber entscheidend die Aufrechterhaltung primärer T-Zell-Antworten beeinflusst (174, 184). Damit dies effizient geschehen kann, muss natürlich auch die Expression des Ox40L auf APCs vermehrt erfolgen. Erst dann kann eine bereits durch ihr Antigen stimulierte T-Zelle in weiterer Folge durch Ox40 zusätzlich stimuliert werden und damit die Proliferation und Differenzierung entsprechender Lymphozyten aufrechterhalten und verstärkt werden (173, 174). Die Ox40-Achse vermittelt außerdem auf bereits aktivierten bzw. differenzierten CD4<sup>+</sup> Zellen das langfristige Überleben. Dabei könnten, neben der Ox40L-Expression durch APCs, besonders Interaktionen zwischen T-Zellen untereinander eine wichtige Rolle spielen (185). Solche T-Zell-T-Zell-Interaktionen sind naheliegend, da sowohl Rezeptor als auch Ligand auf T-Zellen exprimiert werden. Die Details dieser Achse sind jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Eine weitere Frage, die beantwortet werden muss, ist inwiefern die Ox40-Achse Immunreaktionen in eine bestimmte Effektoren-Richtung lenken kann. Die Effekte von Ox40 scheinen dabei jedoch unspezifisch zu sein und die T-Zell-Differenzierung nicht in Richtung einer bestimmten Subpopulation zu manipulieren (174). Der positive Effekt auf Überleben und Proliferation von CD4<sup>+</sup> Zellen ist also möglicherweise eher als quantitativer Faktor zu werten und bedarf zusätzlicher Signale durch z. B. Cytokine, um zusätzlich auch bestimmte Effektor-Differenzierungen zu dirigieren (173, 174, 177).

Die Ox40-Achse kann jedoch auch auf andere Weise zur Inflammation beitragen. Es gibt experimentelle Studien, die eine Rolle für Ox40 bei der Migration von T-Zellen in entzündliche Gewebe nahelegen. Dass der Ox40L unter anderem auch auf Endothel exprimiert werden kann, wurde bereits erwähnt. Auch wenn die Adhäsion am Endothel nicht einzig und alleine durch die Ox40-Achse vermittelt wird, so ist dies doch ein möglicher Mechanismus, der die positiven Effekte auf die Proliferation der Lymphozyten ergänzen könnte (186). Manche Autorinnen und Autoren vermuten auch einen Einfluss der Ox40-Achse auf die Expression von Chemokinrezeptoren wie z. B. CXCR5, was ebenfalls eine verstärkte Invasion Ox40-costimulierter T-Zellen erklären würde (174, 187).

Gedächtnis-T-Zellen, welche nach durchgemachten Immunantworten als adaptives Gedächtnis Immunität ermöglichen, exprimieren Ox40 nach erneutem Kontakt mit ihrem

Antigen wesentlich schneller als T-Zellen während primären Immunantworten. Bereits nach wenigen Stunden werden Ox40-Rezeptoren deutlich hochreguliert und vermehrt auf der T-Zell-Oberfläche exprimiert (184). Damit übereinstimmend sind experimentelle Studien, in denen Ox40-Agonisten zum vermehrten Auftreten von Gedächtnis-T-Zellen führten und die Abwesenheit von Ox40 Gedächtniszellen quantitativ reduzierte (174, 188, 189). Dieser Effekt wird möglicherweise nicht ausschließlich durch Ox40-Signale auf Gedächtniszellen verursacht. Genauso könnte auch die initial verringerte klonale Expansion der Effektorzellen für eine resultierende Reduktion des immunologischen Gedächtnisses verantwortlich sein (189, 190).

Auch die Proliferation bzw. das Überleben von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> Zellen können durch Ox40 beeinflusst werden und ähneln in diesem Sinne den CD4<sup>+</sup> Zellen (173). Interessanterweise wurden dabei große Unterschiede in der Bedeutung der Ox40-Achse für Immunantworten gegen verschiedene virale Erreger festgestellt. Mit anderen Worten bedeutet dies, dass Ox40 für die Aktivierung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> Zellen gegen die einen viralen Erreger bedeutsam ist, für die CD8<sup>+</sup> Zell Antworten gegen andere Viren aber keine Rolle spielt (191). Auch bei der Bekämpfung von entarteten Zellen scheint Ox40 auf zytotoxischen T-Zellen wichtig zu sein. In experimentellen Studien zeigte sich die Notwendigkeit von Ox40-Signalen sowohl für das Priming als auch für die zytotoxischen Funktionen Tumor-spezifischer CD8<sup>+</sup> Zellen. Ähnlich wie bei den aktivierten CD4<sup>+</sup> Zellen scheint die Ox40-Achse auch für das Überleben der geprimten CD8<sup>+</sup> Zellen entscheidend zu sein (192, 193).

Ox40 scheint nicht nur auf herkömmliche T-Zellen massiven Einfluss zu haben, sondern auch auf die sogenannten regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) (173). Interessanterweise exprimieren in Mäusen nT<sub>reg</sub> den Rezeptor Ox40 sogar konstitutiv (177, 178). Vieles deutet jedoch darauf hin, dass Ox40 auf nT<sub>reg</sub> nicht das Überleben und die Proliferation unterstützt, sondern deren regulatorischen Funktionen hemmt (173). Auch bei der Induktion von iT<sub>reg</sub> kann Ox40 eine Rolle spielen. In experimentellen Studien konnte man zeigen, dass durch die Ox40-Achse ausgehende Signale die Expression von FoxP3 hemmen und dadurch die Entstehung von regulatorischen T-Zellen verhindern (194). Viele Fragen zum Thema T<sub>reg</sub> und Ox40 sind jedoch noch ungeklärt. So gibt es zum Beispiel auch Hinweise, dass Ox40 unter gewissen Bedingungen die Proliferation regulatorischer T-Zellen verstärken kann (177). Möglicherweise kann Ox40 also einerseits positiven Einfluss auf regulatorische T-Zellen nehmen indem Proliferation und Überleben gefördert werden, andererseits aber die Konversion neuer regulatorischer T-Zellen verhindern und gleichzeitig die Empfindlichkeit

herkömmlicher T-Zellen gegenüber regulatorischen T<sub>reg</sub>-Signalen verringern. Ebenfalls bedacht werden sollte, dass das durch Ox40 rekrutierte Adaptorprotein TRAF6 im Verdacht steht, diese periphere Toleranz herkömmlicher T-Zellen durch Signale regulatorischer T-Zellen zu vermitteln (195).

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die Ox40-Achse in der Mehrzahl der Fälle als proinflammatorisch gewertet werden kann. Es unterstützt Proliferation und Überleben von sowohl T-Helferzellen als auch zytotoxischen CD8<sup>+</sup> Zellen und stellt damit einen wichtigen quantitativen Faktor für das adaptive Immunsystem dar. Gleichzeitig haben Ox40/Ox40L auch positiven Einfluss auf das immunologische Gedächtnis und wirken der Induktion und Funktion regulatorischer T-Zellen entgegen. Andererseits gibt es immer wieder gegenteilige Beobachtungen, was sich möglicherweise durch zeitliche Faktoren und gewebe- bzw. erregerspezifische Unterschiede erklären lässt.

#### **1.4.4.4 Ox40 in Krankheit und experimentellen Tiermodellen**

Die Ox40-Achse wurde bereits in zahlreichen experimentellen Krankheitsmodellen untersucht. Von besonderem Interesse sind dabei autoimmunologische Erkrankungen, die Auskunft über einen potentiellen therapeutischen Nutzen geben können. Besonders viele Daten zur Ox40-Achse gibt es bereits zur experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Dieses Modell erwies sich in Experimenten von Lishomwa et al. als Ox40L-abhängig. Knockout-Mäuse zeigten dabei eine verringerte T-Zell-Proliferation und reduzierte Cytokinexpression (196). Ähnliches bestätigte sich auch in einem Experiment mit neutralisierenden Ox40L-Antikörpern, wobei in diesem Fall der therapeutische Effekt laut den Autorinnen und Autoren nicht durch verringerte T-Zell-Proliferation bzw. Cytokinexpression zustande kam, sondern die reduzierte Migration der CD4<sup>+</sup> Zellen in die inflammatorischen Gewebe ausschlaggebend war (197). Zusätzlich gehen andere Autorinnen und Autoren davon aus, dass die Expression von Ox40 auf CD4<sup>+</sup> Zellen im EAE-Modell ausschließlich antigenspezifische und damit Krankheit-mediierende T-Zellen betrifft, was die Attraktivität dieser costimulierenden Achse für eine gezielte therapeutische Blockierung noch bestärkt (198).

Andere Forschungsteams untersuchten eine potentielle Rolle für Ox40/Ox40L in weiteren Geweben. Totsuka et al. konnten in einem Mb. Crohn Modell zeigen, dass die Applikation neutralisierender Ox40L-Antikörper zu einer deutlichen Verbesserung der Klinik führte, was unter anderem als Folge weniger Kolon-infiltrierender CD4<sup>+</sup> Zellen geschah (199).

Im Modell der experimentellen Autoimmunuveitis arbeiteten Wu et al. mit einem agonistischen Ox40-Antikörper und verstärkten auf diese Weise die Signalgebung der Ox40-

Achse. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein wesentlich verstärktpathologischer Phänotyp (200).

Auch aus nephro-immunologischen Krankheitsmodellen gibt es bereits Daten. Odobasic et al. (201) arbeiteten mit einem Mausmodell einer Glomerulonephritis, in welchem die Versuchstiere 10 Tage vor Applikation eines nephritischen Anti-GBM-Serums gegen die Immunglobuline der Serum-Spezies (Schaf-IgG) immunisiert wurden. Das Team applizierte erkrankten C57Bl/6J Mäusen ab Tag 10 täglich Ox40L-Antikörper und evaluierte die Tiere auf mögliche Auswirkungen einer solchen Therapie. Hierbei zeigte sich entgegen vorpublizierter Daten ein unerwartetes Ergebnis: Diejenigen Mäuse, welche mit dem Antikörper behandelt wurden, zeigten eine schwerere Erkrankung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich zeigte sich eine vermehrte Proliferation der CD4<sup>+</sup> Zellen bei reduzierten Apoptoseraten. Davon ausgenommen waren die regulatorischen T-Zellen im lymphatischen Gewebe. In der Ox40L-Antikörper-Gruppe zeigten diese im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Proliferation und eine geringere regulatorische Aktivität (201). Wie bereits eingangs erwähnt, ist dieser positive Effekt der Ox40-Achse auf die Proliferation regulatorischer T-Zellen bereits in früheren Studien beschrieben worden (177). Anzumerken ist, dass dieselbe Gruppe bereits in einer früheren Versuchsreihe im selben GN-Modell diesen negativen Effekt der Ox40L-Antikörper hat zeigen können. Interessanterweise wurde dabei jedoch auch beschrieben, dass die Applikation derselben Antikörper in CD80<sup>-/-</sup> / CD86<sup>-/-</sup> Mäusen einen positiven Effekt auf die Erkrankung zu haben scheint (202). Daraus folgerte man, dass die Ox40-Achse in dieser Durchführung eines GN-Modells erst unter Abwesenheit der anderen costimulierenden Signale via B7.1 und B7.2 pathologisch wird und ansonsten einen protektiven Effekt haben könnte (202). Zusätzlich sollte nochmals erwähnt werden, dass die Ox40-Achse eine komplexe Dynamik zu haben scheint und im zeitlichen Verlauf eine variable Rolle in Erkrankungen spielen könnte. So beschreiben z. B. Ruby et al. variable Effekte einer Therapie mit Ox40-Agonisten im EAE Modell, abhängig davon, zu welchem Zeitpunkt der Erkrankung die Therapie erfolgte (203). Gaspal et al. untersuchten ebenfalls den Einfluss der kombinierten Blockade costimulierender Signale in einem Autoimmunmodell an FoxP3-defizienten Mäusen. Diese entwickeln ohne regulatorische T-Zellen innerhalb kürzester Zeit eine schwerwiegende und multisystemische letale Autoimmunerkrankung. In diesem eindrucksvollen Tierexperiment reicht die Blockade der Ox40- bzw. CD30-Achse alleine nicht aus, um die Mäuse vollständig zu schützen. Auch wenn Ox40 die größere Rolle zu spielen scheint, sind nur bei kombinierter Blockade von CD30 und Ox40 die Mäuse vor der Erkrankung geschützt (204).

Wie auch in den Tiermodellen ist die Expression von Ox40 im Menschen auf inflammatorische Regionen beschränkt (174). Ox40 ist dabei nicht krankheitsspezifisch. Es gibt eine große Reihe autoinflammatorischer Erkrankungen, in denen die Expression dieses Rezeptors auf Immunzellen identifiziert werden kann. Zu diesen gehören zum Beispiel SLE (205), Asthma bronchiale (206) und systemische Sklerose (207, 208). Besonders Lupus ist in verschiedener Hinsicht mit der Ox40-Achse assoziiert. Zunächst einmal konnten Cunningham Graham et al. haploide Genotypen des Ox40L (TNFSF4) identifizieren, welche mit einem erhöhten SLE Risiko vergesellschaftet waren (209). Dabei kommt es wahrscheinlich zu einer erhöhten Expressionsneigung des Ox40L. Auf ähnliche Weise konnte auch ein Zusammenhang solcher genetischen Polymorphismen mit dem Risiko einer systemischen Sklerose hergestellt werden (210). Auch in der Pathogenese des SLE spielen CD4<sup>+</sup> Zellen eine zentrale Rolle. Obwohl in älteren Studien keine signifikanten Unterschiede in der Ox40-Expression peripherer T-Zellen oder anderer Leukozyten identifiziert wurden (205), konnten Dolff et al. in SLE-Patienten und SLE-Patientinnen eine signifikant häufigere Expression auf mit der Krankheitsaktivität korrelierenden T<sub>H</sub>17 Zellen zeigen (211). Patientinnen und Patienten mit einer Lupus-Nephritis zeigen darüber hinaus in Nierenbiopsien eine deutliche perivaskuläre und tubulointerstitielle Infiltration Ox40-exprimierender Lymphozyten sowie eine Expression von Ox40L entlang der glomerulären Kapillarwände (205, 211). Die Korrelation zwischen Erkrankungsaktivität und Ox40-Expression auf CD4<sup>+</sup> Zellen konnte in weiteren Studien bestätigt werden. Zusätzlich zeigt sich eine höhere Expression von Ox40 auf CD4<sup>+</sup> Zellen in Patientinnen und Patienten mit Lupus-Nephritis im Vergleich zu Patientinnen und Patienten ohne Nierenbeteiligung (212).

#### **1.4.4.5 Ox40-Defizienz im Menschen**

Byun et al. gelang es einen menschlichen Phänotyp genetischer Ox40-Defizienz zu beschreiben. Es handelte sich dabei um ein junges Mädchen, das bereits im Alter von 14 Jahren an einem Kaposi-Sarkom erkrankte. Diese Art von Humanes Herpesvirus 8 assoziiertem Tumor ist in Kindern ohne HIV oder immunsuppressiver Therapie extrem selten. Auf der Suche nach einer Ursache für das Auftreten dieser Erkrankung entdeckte man bei der Patientin eine homozygote Missense-Mutation des TNFRSF4 Gens. Dies führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zur reduzierten Expression von Ox40 auf aktivierten T-Zellen. Generell zeigte die Patientin keine veränderten Leukozytenzahlen, der Anteil naiver T-Zellen war jedoch aufgrund reduzierter Effektorzellzahlen höher. Insbesondere CD4<sup>+</sup> Effektor-Memory-Zellen (T<sub>em</sub>) zeigten eine reduzierte Zahl sowie reduzierte Aktivität auf

erneute Stimulation mit ihren spezifischen Antigenen. Auch B-Gedächtniszellen kamen reduziert in der Patientin vor, zeigten jedoch eine normale Antikörper-Reaktion auf Stimulation (213). Bedenkt man, dass die zum Zeitpunkt der Publikation 19 Jahre alte Patientin außer dem Kaposi-Sarkom und einer Leishmaniose keine weiteren schweren und auf eine massive Immundefizienz hinweisende Erkrankung aufwies, lässt sich schlussfolgern, dass eine reduzierte Ox40-Interaktion im Menschen nicht zwangsläufig mit schweren unkontrollierten Nebenwirkungen einhergehen muss (213, 214). Die Rolle der Ox40-Expression in Hinblick auf die Entstehung der Kaposi-Sarkome könnte außerdem mit der Expression des Ox40L auf Endothelzellen in Zusammenhang stehen. Möglicherweise begünstigt die fehlende Ox40-Ox40L-Interaktion zwischen Lymphozyten und Endothelzellen Infektionen mit HHV-8 und schließlich auch der Entstehung dieser Malignome (213).

#### **1.4.4.6 Therapeutische Nutzung**

Es wurde bereits eine Phase II Studie zur Therapie von Asthma bronchiale mit einem Anti-Ox40L-Antikörper durchgeführt (215). Die dabei verwendeten Antikörper wurden über drei Monate in 4 intravenösen Applikationen verabreicht. An zwei Zeitpunkten wurde ein Provokationstest der allergischen Asthma-PatientInnen durchgeführt. Dabei zeigte sich keine Verbesserung der Klinik im Vergleich zur Kontrollgruppe. Lediglich IgE-Level im Serum und die Anzahl eosinophiler Granulozyten im Sputum konnten dabei reduziert werden. Auch wenn die Ergebnisse dieser Studie äußerst ernüchternd waren, zeigten sich zumindest keine Nebenwirkungen der Therapie. Außerdem lassen sich möglicherweise die Ergebnisse dieser Studie mit angepasster Dosierung und modifizierten Verabreichungsintervallen verbessern.

Mit GBR 830 existiert inzwischen auch ein gegen den Ox40-Rezeptor gerichteter Antikörper in klinischen Studien. Dieser wird bereits in einer Phase II Studie zur Behandlung der atopischen Dermatitis getestet, wobei sich in einer ersten Studie bereits eine gute Verträglichkeit der Therapie und eine deutliche klinische Verbesserung der Dermatitis im Vergleich zum Placebo zeigten (216, 217). Ein anderer Ox40-Antikörper wurde in Patientinnen und Patienten mit Colitis Ulcerosa erprobt. Ergebnisse dazu stehen im Januar 2020 noch aus (218).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Blockierung der Ox40-Achse einen vielversprechenden Therapieansatz in der Behandlung unterschiedlicher T-Zell assoziierter immunologischer Erkrankungen darstellen könnte. Die vielversprechenden Ergebnisse

tierexperimenteller Studien und die ersten Erfahrungen im Menschen machen diesen costimulierenden Rezeptor zu einem attraktiven Forschungsgebiet.

### **1.4.5 CD30**

Genauso wie Ox40 gehört CD30 (auch als Ki-1-Antigen bezeichnet) zur Gruppe der TNFRSF. Entsprechend gibt es große Parallelen zwischen diesen beiden costimulierenden Rezeptoren. Das Gen zu CD30, TNFRSF8, liegt in der gleichen chromosomalen Region wie Ox40 und weitere Rezeptoren aus dieser Familie: Chromosom 1p36 (162).

#### **1.4.5.1 Die CD30-Achse und ihre Signalwege**

Auch die über CD30 aktivierten Signalwege sind denen durch Ox40 sehr ähnlich. Dies betrifft sowohl die kanonische als auch nicht-kanonische Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, Signalwege über MAP-Kinasen inklusive der Aktivierung von AP-1, sowie die Aktivierung von Akt über die PI-3-Kinase (162, 219-221). Auf die Details dieser wahrscheinlich sehr ähnlichen Signalkaskaden wurde bereits weiter oben eingegangen (s. Kapitel 1.4.4.2). Durch CD30 rekrutierte TRAF-Adaptorproteine sind TRAF2 und TRAF3 (162, 219). Andere Autorinnen und Autoren vermuten dagegen, dass auch TRAF1 und TRAF5 durch CD30 rekrutiert werden können, womit möglicherweise TRAF6 (rekrutiert durch Ox40, aber nicht durch CD30) eine entscheidende Rolle für die Unterschiede zwischen diesen Rezeptoren spielen könnte (172). Ergänzend sei jedoch erwähnt, dass die CD30-Achse wie auch die Ox40-Achse Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B auch unabhängig von TRAFs aktivieren kann (221).

#### **1.4.5.2 CD30-Expression**

Eine weitere Parallele zu Ox40 ist die Expression auf aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen. Auch Virus-infizierte oder entartete Lymphozyten können CD30 aufweisen. Zusätzlich zeigen aber auch proliferierende B- und T-Zellblasten in lymphatischen Geweben eine CD30-Expression. Hinzu kommen NK-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und eosinophile Granulozyten (221-223).

Der CD30L wird als costimulierendes Signal ebenfalls auf APCs wie dendritischen Zellen exprimiert. Hinzu kommt eine Expression auf aktivierten T-Zellen, was auch für die CD30-Achse die Frage nach T-Zell-T-Zell-Interaktionen in den Raum wirft. Auch B-Zellen können den CD30L auf ihrer Oberfläche tragen. Eine vermehrte Expression findet man zusätzlich auf nicht-immunologischen Zellen in entzündeten Geweben. Ein Beispiel dafür sind Kardiomyozyten (162, 219, 221-223).

Wie auch für Ox40 ist die inflammatorische Umgebung entscheidend für die Expression von CD30. Lymphozyten neigen erst nach Aktivierung durch ihren TCR zur Hochregulation dieses Rezeptors auf ihrer Oberfläche. Cytokine wie IL-2 und IL-4, sowie Signale über CD28 und CD40, verstärken die Expression noch weiter. Die maximale Expression erfolgt in vitro erst 3 bis 6 Tage nach Stimulation (221-223).

#### **1.4.5.3 Effekte der CD30-Achse**

Die CD30-Achse hat als costimulierendes Signal zunächst einen wichtigen Einfluss auf Proliferation und Effektorfunktionen von CD4<sup>+</sup> Zellen (162, 219, 223). CD30 wurde längere Zeit stark mit T<sub>H</sub>2-Antworten assoziiert, da sich in einigen Studien eine vermehrte Expression auf T<sub>H</sub>2-Zellen im Vergleich zu anderen CD4<sup>+</sup> Subtypen zeigte (224). Es existieren zwar ähnliche Ergebnisse für Ox40, allerdings sprechen auch die IL-4-abhängige Expression sowie die Abhängigkeit von STAT6 für eine relevantere T<sub>H</sub>2-Assoziation als es für Ox40 der Fall ist (223). Heute zeigt sich jedoch zunehmend, dass auch CD30 unabhängig von der Subpopulation auf sämtlichen CD4<sup>+</sup> Zellen exprimiert wird und die Assoziation mit Immunreaktion vom Typ II (vgl. (85)) möglicherweise überschätzt wurde (162, 219, 225). Auch Shinoda et al. vermuteten nach zahlreichen Studien in diesem Forschungsfeld, dass die CD30-Achse nicht an der Differenzierung naiver T-Zellen in eine bestimmte Subpopulationsrichtung verantwortlich ist, sondern generell das Überleben solcher aktivierter T-Zellen sicherstellt. Konkret konnten sie zeigen, dass sowohl T<sub>H</sub>1- als auch T<sub>H</sub>17-Antworten in CD30L<sup>-/-</sup> Mäusen massiv reduziert wurden und sich entsprechend keinesfalls sagen lässt, dass die CD30-Achse spezifisch für T<sub>H</sub>2 Antworten ist (226).

Nishimura et al. konnten auch eine Rolle für den CD30L in der Generierung von CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen zeigen. Dabei zeigten sich in CD30L<sup>-/-</sup> Mäusen nach einer Infektion mit Listerien eine verringerte Bildung langlebiger CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> (engl. central memory) Zellen bei zunächst normaler Ausbildung von CD8<sup>+</sup> Effektorzellen. Ein dabei vermuteter Mechanismus war die fehlende Induktion der CCR7-Expression, welche von der CD30-Achse abhängig zu sein scheint (227). Ähnlich wie auch bei der Ox40-Achse existieren eine Vielzahl widersprüchlicher Studien über CD30 und seinen Liganden. Während Nishimura et al. die CD30-Achse als ausschlaggebend für die Ausbildung eines effizienten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Gedächtnisses beschreiben, konnten andere Gruppen gegenteiliges beobachten: Bei der Abstoßungsreaktion transplanteder Organe spielen ebenfalls CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen eine entscheidende Rolle. Regulatorische T-Zellen sind in der Lage diesen CD8<sup>+</sup> Zellen entgegenzuwirken und deren Apoptose zu induzieren. Die Suppression durch T<sub>reg</sub> Zellen ist dabei ebenfalls von der CD30-Achse abhängig (228).

Auch Arbeiten an Psoriasis-Modellen konnten eine protektive Rolle der CD30-Achse zeigen. Dabei scheint CD30L die Expression von CCR6 auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu unterdrücken und die Expression von IL-17 zu reduzieren. Dies bestätigte sich in einem therapeutischen Effekt agonistischer CD30-Antikörper (229). In anderen Mausmodellen zeigten  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine Abhängigkeit von der CD30-Achse. So kommt es in Infektionen mit *Mycobacterium bovis* ohne Beteiligung der CD30-Achse zu einer reduzierten IL-17 Expression besagter Zellen (230).

B-Zellen sind grundsätzlich in der Lage sowohl CD30 als auch den CD30L zu exprimieren. Über die genaue Rolle der CD30-Achse für B-Zellen ist dagegen weniger bekannt. Knockout-Mäuse zeigen zwar eine Beeinträchtigung humoraler Immunantworten sowie eine verringerte Aktivität lymphatischer Keimzentren. Die genauen Mechanismen, die zu dieser Beeinträchtigung führen, sowie die Frage, ob es sich dabei um direkte Auswirkungen von CD30-Signalen handelt oder die veränderten T-Zell-Umgebungen sekundär verantwortlich sind, ist jedoch nicht abschließend geklärt (231).

#### **1.4.5.4 CD30 in Krankheit und experimentellen Tiermodellen**

Die CD30-Achse wurde in einer großen Zahl weiterer Krankheitsmodelle untersucht. Wie auch die Ox40-Achse, scheint die CD30-Achse eine Rolle in murinen Asthma-Modellen zu spielen. CD30<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten dabei im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich reduzierte inflammatorische Prozesse in den Atemwegen. Zusätzlich ist die Antikörper-Blockade der CD30-Achse in diesem Modell in der Lage die Krankheit zu verhindern (232).

Genetische Studien wiesen außerdem auf eine mögliche Assoziation der CD30-Achse mit sogenannten Non-Obese Diabetic (NOD) Mäusen hin (233). NOD-Mäuse entwickeln auf Basis autoimmunologischer Prozesse einen dem humanen Typ 1 Diabetes ähnelnden Phänotyp. CD30 und sein Ligand werden in diesem Modell vermehrt auf T-Zellen der pankreatischen lymphatischen Gewebe exprimiert. Die Blockade von CD30L mit neutralisierenden Antikörpern erwies sich dagegen als präventiv und konnte die Ausbildung der Erkrankung verhindern (234).

Von besonderem Interesse sind die bereits erwähnten Arbeiten von Gaspal et al. an FoxP3-defizienten Mäusen (siehe Kapitel 1.4.4.4). Erst unter zusätzlichem Wegfall der CD30-Achse waren die Tiere ausreichend vor den schweren autoimmunologischen Verläufen geschützt, auch wenn Ox40 in diesem Fall die wichtigere Rolle zu spielen scheint (204).

Ursprünglich wurde CD30 auf Hodgkin-Lymphomen entdeckt und auch heute noch ist CD30 vor allem für seine Rolle in hämatologischen Erkrankungen bekannt (235, 236). Neben Hodgkin-Lymphomen zeigen auch Burkitt-Lymphome und andere non-Hodgkin-

Lymphome regelmäßig eine übermäßige CD30 Expression. Außerdem zeigen manche malignen B-Lymphozyten eine Expression des CD30L (221). Zusätzlich zur CD30/CD30L-Expression auf malignen Zellen, stellt die lösliche Form des Rezeptors sCD30 einen möglichen Aktivitäts- und Prognosefaktor dar (237, 238). Seit einigen Jahren existiert in der Lymphomtherapie ein Antikörper, der gegen den CD30-Rezeptor gerichtet ist. Dieser ist als Brentuximab Vedotin auf dem Markt und mit einem antimitotischen Konjugat versehen. Brentuximab Vedotin wird in einigen Studien zur Therapie CD30-positiver Lymphome erprobt und ist durch seine hohe toxische Spezifität ein vielversprechender Zugang (239). Der lösliche sCD30 Rezeptor spielt, wie oben bereits für Lymphome beschrieben, auch bei anderen Erkrankungen als prognostischer Marker bzw. Verlaufparameter eine Rolle. Zu diesen gehören neben weiteren Malignomen auch rheumatologische und immunologische Erkrankungen sowie Infektionen und Abstoßungsreaktionen (221, 231). Cabrera et al. untersuchten die Expression von CD30 auf T-Zellen von SLE-Patienten und -Patientinnen. Auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Lupus-Erkrankten und der gesunden Kontrollgruppe. Die Expression korrelierte mit der Erkrankung und zeigte ihren quantitativen Höhepunkt auf CD8<sup>+</sup> Zellen erkrankter Personen. Im Gegensatz zu den Konzentrationen der löslichen Form des Rezeptors, zeigten sich dabei keine Unterschiede zwischen Patientinnen und Patienten mit einem aktiven bzw. inaktiven SLE (240).

#### **1.4.5.5 Therapeutische Nutzung**

Die vielfältige Beteiligung der CD30-Achse an inflammatorischen Erkrankungen macht CD30 und seinen Liganden in einer Vielzahl verschiedener Erkrankungen zu einem vielversprechenden Therapieansatz. Mit Brentuximab Vedotin existiert ein potenter toxischer Antikörper gegen CD30 und CD30-exprimierende Zellen. Auch wenn dieses Medikament aus der Lymphomforschung stammt, laufen bereits erste Studien in anderen Erkrankungen. Solche sind Systemische Sklerose, Graft-versus-Host-Reaktionen und SLE (241-243). Ein gegen den Rezeptor gerichteter und mit einem toxischen Molekül konjugierter Antikörper ist jedoch nicht die einzige denkbare Option in die CD30-Achse einzugreifen. Insbesondere die hier beschriebenen Studien in Tiermodellen zeigen, dass auch eine Therapie mit neutralisierenden anti-CD30L Antikörpern eine Option darstellen könnten. Denn auch wenn Brentuximab im Vergleich zu herkömmlichen Chemotherapien relativ gut vertragen wird, so kommt es in der bei Lymphomen verabreichten Dosis zu relevanten Nebenwirkungen. Am häufigsten treten dabei Neuropathie sowie Neutropenie auf (239).

### **1.4.6 Therapeutische Anwendung costimulierender Signale**

Nicht nur CD30 und Ox40 sind interessante Rezeptoren für zielgerichtete Therapien.

Einige Wirkstoffe, die costimulierende Signalwege manipulieren, sind bereit in Verwendung bzw. in klinischen Studien erprobt. Im Folgenden sind Beispiele solcher Signalwege aufgelistet, die bereits klinische Anwendung finden. Es ist zu erwarten, dass die Liste solcher Wirkstoffe in den nächsten Jahren zunehmen wird.

#### **1.4.6.1 TNF- $\alpha$ Blockade**

TNF- $\alpha$  ist wohl der bekannteste Vertreter aus der Gruppe der TNFRSF Liganden. Es existieren bereits einige Medikamente, die seine Beteiligung an inflammatorischen Prozessen einzudämmen versuchen und zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen zum Einsatz kommen. TNF- $\alpha$  besitzt gleich zwei Rezeptoren an die es binden kann: TNFR1 und TNFR2. Die Signale, die aus der Interaktion zwischen Liganden und seinem Rezeptor resultieren, können dabei sowohl stimulierend als auch inhibierend sein. Besonders TNFR2 ist ganz im Sinne eines costimulierenden Rezeptors wichtig für die Proliferation, Differenzierung sowie das Überleben von T-Zellen. TNFR1 wird dagegen auch auf einer Vielzahl nicht-immunologischer Gewebe exprimiert (162). TNF- $\alpha$  existiert in zwei Formen. Einmal als membrangebundenes Protein, das Zell-Zell-Interaktionen ermöglicht, und in seiner löslichen Form (sTNF- $\alpha$ ). Aus diesen Faktoren resultiert eine besonders komplexe Achse innerhalb der TNFR-Superfamilie. Gegen TNF- $\alpha$  gerichtete Wirkstoffe konnten in zahlreichen Autoimmunerkrankungen Wirkung zeigen, wobei die Effekte in erster Linie auf die Neutralisierung der löslichen Form zurückzuführen sind (244).

Es existieren inzwischen eine ganze Reihe von Antikörpern gegen TNF- $\alpha$ . Zu diesen gehören Adalimumab, Infliximab oder Golimumab. Ebenfalls an TNF- $\alpha$  wirkt das Fusionsprotein Etanercept. Hinzu kommen eine Reihe immer neuer Biosimilars. Auch wenn es Unterschiede in z. B. Affinität und Pharmakokinetik gibt, so zeigen doch alle dieser Wirkstoffe in einigen Erkrankungen vergleichbare Ergebnisse. Erfolgreich eingesetzt werden sie bereits in der rheumatoiden Arthritis und anderen rheumatologischen Erkrankungen, chronischen Darmerkrankungen sowie Psoriasis (244-246).

Die relevantesten Nebenwirkungen dieser Anti-TNF-Therapien sind ein erhöhtes Infektionsrisiko, insbesondere für chronische Infektionen wie Tuberkulose, und ein erhöhtes Risiko für Malignome (247). Alleine für Adalimumab sind auf [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) im Januar 2020 über 600 aktuelle Studien gelistet.

#### **1.4.6.2 CTLA-4-Immunglobuline**

Die Gruppe der unterschiedlichen costimulierenden Rezeptoren und Liganden sind groß. Einige dieser Signale werden bereits therapeutisch manipuliert, um auf diese Weise das Immunsystem den Bedürfnissen der Patientinnen und Patienten anzupassen.

Eines dieser zum Zwecke einer Immunsuppression blockierten Signale ist die CD28-B7 Achse. Das Medikament Abatacept bindet die CD28 Liganden B7.1 und B7.2. Dabei entspricht Abatacept strukturell im Prinzip dem inhibitorischen Rezeptor CTLA-4, welcher durch seine höhere Affinität zu den B7 Liganden mit CD28 in Konkurrenz tritt (157). Diese kompetitive Hemmung führt zur Blockade der CD28-Achse. Sogenannte CTLA-4-Immunglobuline wie Abatacept oder auch Belatacept wurden in Studien bereits in der Therapie zahlreicher Erkrankungen erprobt. Positive Ergebnisse stammen aus Studien zu Psoriasis (248), Riesenzellerarthritis (249) und rheumatoider Arthritis (250). Außerdem scheinen sie Effizienz in der Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation zu besitzen. Im Langzeitverlauf zeigte sich die Belatacept-basierte Immunsuppression sogar den Cyclosporin-basierten Regimen in Hinblick auf Transplantat- und PatientInnenüberleben überlegen (251, 252). Keine oder sogar negative Wirkungen zeigten sich in der Therapie von SLE-Erkrankten, Multipler Sklerose, chronischen Darmerkrankungen und Lebertransplantationen (253, 254). Außerdem zeigten sich unter CTLA-4-Ig Therapie im Vergleich zu Calcineurin-Inhibitoren vermehrt Fälle von lymphoproliferativen Erkrankungen und akuten Abstoßungen nach Nierentransplantation. Dafür zeigen Abatacept und Belatacept im Vergleich zu Tacrolimus weniger nephrotoxischen Charakter (254). Es ist zu erwarten, dass in den nächsten Jahren noch viele weitere Ergebnisse aus CTLA-4-Immunglobulin-Studien folgen werden. Die Seite [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) listet im Januar 2020 für Abatacept 256 und für Belatacept 62 laufende bzw. geplante Studien.

#### **1.4.6.3 CD40-Blockade**

Die CD40-Achse stellt ein weiteres costimulierendes Signal aus der TNFR-Superfamilie dar. Neben der Aktivierung von T-Zellen und Verstärkung von CD28-Signalen spielt CD40 eine besondere Rolle für die Aktivierung von B-Zellen und humoralen Immunantworten (157). Es existieren verschiedene Ansätze zur Manipulation dieser Achse. Eine davon ist die Neutralisierung des CD40L (CD154) mit Antikörpern. Studien mit solchen Antikörpern führten jedoch zu vermehrten thromboembolischen Ereignissen aufgrund der Expression von CD40L auf aktivierten Thrombozyten (255). Neuere CD40L-Antikörper sind

möglicherweise von diesen Nebenwirkungen ausgenommen und könnten in Zukunft in klinischen Studien zum Einsatz kommen.

Der zweite Ansatz ist die Blockade des CD40-Rezeptors mit hemmenden Antikörpern. Solche sind z. B. ASKP1240 (Bleselumab), CFZ533 und einige weitere Antikörper unterschiedlicher Affinität gegen CD40. Erste Studien zeigen keine thromboembolischen Nebenwirkungen. Außerdem konnten CD40-Antikörper in TransplantationspatientInnen und Autoimmunerkrankungen bereits Wirkung zeigen (255, 256).

Bleselumab konnte in einer randomisierten Placebo-kontrollierten Studie an Psoriasis Patientinnen und Patienten keine klinische Verbesserung bewirken. Dafür wurde die Therapie insgesamt gut vertragen (257). Vielversprechendere Ergebnisse stammen dafür aus einer sehr jungen randomisierten Phase II Studie nach Nierentransplantation (258). Zu diesem Zeitpunkt (Januar 2020) sind auf [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) mindestens 12 Studien zu CFZ533 gelistet, davon zwei an SLE-PatientInnen (259, 260).

## **1.5 Vorbestehende Daten (unpublizierte Daten von Artinger et al.)**

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit einem Telexperiment eines größeren Forschungsprojekts der klinischen Abteilung für Nephrologie am Universitätsklinikum Graz. Im Folgenden sollen die vorhandenen Daten dieses Rahmenprojekts erläutert werden, um ein besseres Verständnis der Daten zu erzielen und in einen entsprechenden Kontext einzuordnen. Alle im Folgenden genannten Ergebnisse sind unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe um Frau Prof.<sup>in</sup> Priv.-Doz.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup>med. univ. Kathrin Eller. Hauptverantwortlich für dieses Projekt ist Frau Dr.<sup>in</sup>med.univ. Katharina Artinger, PhD.

### **1.5.1 Nephritische Mäuse exprimieren vermehrt CD30, Ox40 und deren Liganden auf CD4<sup>+</sup> Zellen**

Mäuse in denen die NTS induziert wurde, zeigten nach 14 Tagen einen signifikant höheren Anteil Ox40 bzw. Ox40L exprimierender CD4<sup>+</sup> Splenozyten im Vergleich zu gesunden Mäusen ( $p < 0,05$ ). Auch CD30 und CD30L wurden vermehrt exprimiert, die Unterschiede zu den gesunden Mäusen waren jedoch nicht signifikant.

### **1.5.2 CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Mäuse sind vor der NTS geschützt**

In Knockout-Mäusen, die weder CD30 noch Ox40 auf ihren Zellen exprimieren können, wurde die NTS induziert. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse mit nephritischen Wildtyp-Mäusen verglichen. Während letztere das volle Krankheitsbild der NTS ausbildeten, waren

die Knockout-Mäuse geschützt. Eine signifikante Verbesserung zeigte sich sowohl in der histologischen Auswertung der Nieren als auch in der Konzentration harnpflichtiger Substanzen (Blut-Harnstoff-Stickstoff-Level). Knockout-Mäuse zeigten außerdem eine geringere Albuminurie. Die Durchführung einer Realtime-PCR zeigte in den Lymphknoten der Mäuse außerdem am Tag 14 nach NTS-Induktion signifikante Unterschiede in der IFN- $\gamma$  Expression, während die Expression von IL-17 keine signifikanten Unterschiede zwischen Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen zeigte. Es wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenz-Färbung für CD4 sowie den Proliferationsmarker Ki-67 in den Lymphknoten der Versuchstiere durchgeführt. Dabei zeigten sich wesentliche Unterschiede zwischen nephritischen Knockoutmäusen und der Kontrollgruppe. CD4<sup>+</sup> Zellen in sekundär lymphatischen Geweben der CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten weniger dieses Proliferationsmarkers im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

### **1.5.3 Die kombinierte therapeutische Antikörperblockade von CD30L und Ox40L verbessern den Phänotyp der NTS**

Mäuse wurden der NTS unterzogen und ab Tag 3 nach Induktion mit Anti-Ox40L- und Anti-CD30L-Antikörpern therapiert. Eine Kontrollgruppe nephritischer Mäuse erhielt unspezifische Antikörper in der gleichen Dosis. Es wurde in beiden Gruppen intraperitoneal appliziert. Eine Wiederholung der Dosis erfolgte dreimal pro Woche.

14 Tage nach Induktion wurden die Mäuse evaluiert. Auch hier zeigte sich eine Reduktion der Albuminurie und weniger glomerulärer Schaden in der Anti-CD30L/Anti-Ox40L therapierten Gruppe. Nieren der therapierten Mäuse zeigten signifikant weniger infiltrierende CD4<sup>+</sup> Zellen und neutrophile Granulozyten.

### **1.5.4 Zusammenfassung**

Die grundsätzliche Beobachtung, die diesen Experimenten zugrunde liegt, ist die vermehrte Expression der TNFRSF-Mitglieder CD30 und Ox40 sowie deren Liganden auf CD4<sup>+</sup> Zellen nephritischer Mäuse (siehe Kapitel 1.5.1). Aus dieser Beobachtung ergab sich die Frage nach einer potentiellen Beteiligung der CD30- und Ox40-Achse in den Pathomechanismen der NTS. Experimente in Doppel-Knockout-Mäusen (CD30/Ox40<sup>-/-</sup>) konnten zeigen, dass diese Mäuse vor der NTS geschützt waren (siehe Kapitel 1.5.2). Schließlich konnte in einer weiteren Durchführung der NTS gezeigt werden, dass sich die kombinierte Blockade der Liganden CD30L und Ox40L therapeutisch nutzen lassen und entsprechend behandelte Mäuse im Vergleich zu einer Kontrollgruppe einen milderen Verlauf der Erkrankung zeigten (siehe Kapitel 1.5.3).

Um die Mechanismen hinter den protektiven Effekten der CD30- und Ox40-Blockade besser zu verstehen, wurde ein Transferexperiment durchgeführt. Ziel dabei war die Rolle dieser Rezeptoren für CD4<sup>+</sup> Zellen besser eruieren zu können. Die Hypothese lautete, dass CD30 und Ox40 wesentlich an den pathologischen Immunantworten der CD4<sup>+</sup> Zellen beteiligt sind und auf diese Weise zur Pathogenese der NTS beitragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mäuse

Neben Wildtyp-Mäusen mit C57BL/6J Hintergrund wurden zwei Gruppen von Mäusen mit genetischen Besonderheiten für die hier beschriebenen Experimente verwendet. Alle Mäuse waren männlich. Für die durchgeführten Tierversuche lag eine Genehmigung des österreichischen Ministeriums für Bildung, Wissenschaft und Forschung vor (Tierversuchsgesetz 2012, BGBl. I Nr. 114/2012): BMWF-66.010/0054-WF/V/3b/2015.

Versuchstieren wurden an ausgewählten Tagen Urinproben entnommen. Die Mäuse wurden durch eine zervikale Dislokation getötet. Die den Mäusen entnommenen Nieren wurden halbiert und in Formalin oder *Tissue- Tek OCTTM Compound* (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) eingebettet bzw. schockgefroren.

#### 2.1.1 Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse

Antikörper und T-Zell-Rezeptoren liegen in einer beinahe unendlichen Vielfalt vor. Dabei ist nicht jede erdenkliche Bindungsstelle genetisch an einem bestimmten Ort festgelegt. Erst durch die sogenannte somatische Genumlagerung, in der verschiedene Gene kombiniert werden, kommt es zum vielfältigen Rezeptorrepertoire. Ein wesentliches Protein in diesen komplexen Umlagerungsprozessen ist die V(D)J-Rekombinase (261). Das Gen Rag1 (engl. recombination activation gene) ist, wie der Name bereits vermuten lässt, wesentlich an der Aktivierung dieser Rekombinationsprozesse beteiligt. Ist Rag1 nicht in Mäusen vorhanden, so stoppt der Reifeprozess der Lymphozyten in einer frühen Phase und es werden keine reifen T- oder B-Lymphozyten ausgebildet. Die Generierung solcher Rag1<sup>-/-</sup> homozygoter Mäuse beschrieben erstmals Mombaerts et al. im Jahre 1992 (262). Neben den fehlenden reifen B- und T-Zellen zeigten solche Mäuse wenige Unterschiede im Phänotyp. Mäuse blieben fertil und zeigten keine schwerwiegenden Fehlbildungen. Zellzahlen im Thymus waren massiv reduziert, neurologische Defizite wurden trotz vermehrter Expression des Rag1 Gens auf Neuronen ausgeschlossen. Diese Umstände machen Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse zu interessanten Versuchstieren, in denen die wesentlichen adaptiven Immunmechanismen antigenspezifischer B- und T-Zellen ausgeschaltet sind (262).

14 Mäuse homozygot für die Rag1<sup>tm1Mom</sup> Mutation wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) erworben. Eine der Mäuse starb unmittelbar nach Präimmunisierung (siehe unten). Eine Ursache konnte nicht festgestellt werden. Die Maus gehörte zur Transfergruppe der Wildtyp CD4<sup>+</sup> Zellen.

## 2.1.2 CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse

Die Funktionen und Rollen der Rezeptoren CD30 und Ox40 wurden bereits an früherer Stelle beschrieben. Die hier verwendeten Doppel-Knockout-Mäuse sind genetisch nicht in der Lage CD30 und Ox40 zu exprimieren und stammen aus der Zucht des Labors um Peter J. L. Lane. Die Erzeugung dieser Doppel-Knockoutmäuse wurde von diesem Team bereits beschrieben (263). Grundsätzlich erfolgte die Zucht durch das Kreuzen von CD30<sup>-/-</sup> und Ox40<sup>-/-</sup> Mäusen mit Genotypisierung nachfolgender Generationen. Mäuse mit Allelen beider Mutationen wurden erneut gekreuzt. Über mehrere Generationen entstanden auf diese Weise Tiere, die sowohl für den CD30- als auch den Ox40-Knockout homozygot waren (263). Die hier verwendeten Mäuse waren Nachkommen auf diese Weise gewonnener Mäuse und wurden erneut genotypisiert.

### 2.1.2.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung und damit Identifikation geeigneter Mäuse erfolgte anhand aus der Schwanzspitze isolierter DNA. Dies ist unter Verwendung herkömmlicher Standard-Kits möglich. Die eigentliche Typisierung erfolgte durch die Durchführung einer PCR (engl. polymerase chain reaction) und Gel-Elektrophorese der auf diese Weise vermehrten DNA-Fragmente:

1. Für die PCR wurde ein der Polymerase (*DreamTaq*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) angepasster Mastermix (MM) verwendet (7,57 µl DreamTag MM und 4,69 µl Wasser pro Probe).
2. Vorwärts- und Rückwärts-Primer für die entsprechenden DNA-Abschnitte (CD30KO ,Ox40KO, CD30WT, Ox40WT) werden dem MM hinzugefügt (0,37 µl pro Primer und Probe).

#### Sequenzen der Primer:

Ox40 (KO und WT) 5': 5'-AAG ATG GCT CAG TGC AAC TTC C-3'

Ox40KO 3': 5'-GGC CGC TTT TCT GGA TTC ATC G-3'

Ox40WT 3': 5'-CAA GGT GGG TGG AGA GGG CAA-3'

CD30KO forward: 5'-GAT CAG CCA CGG CTC CCG AC-3'

CD30KO reverse: 5'-TAT CAG GAC ATA GCG TTG GCT AC-3'

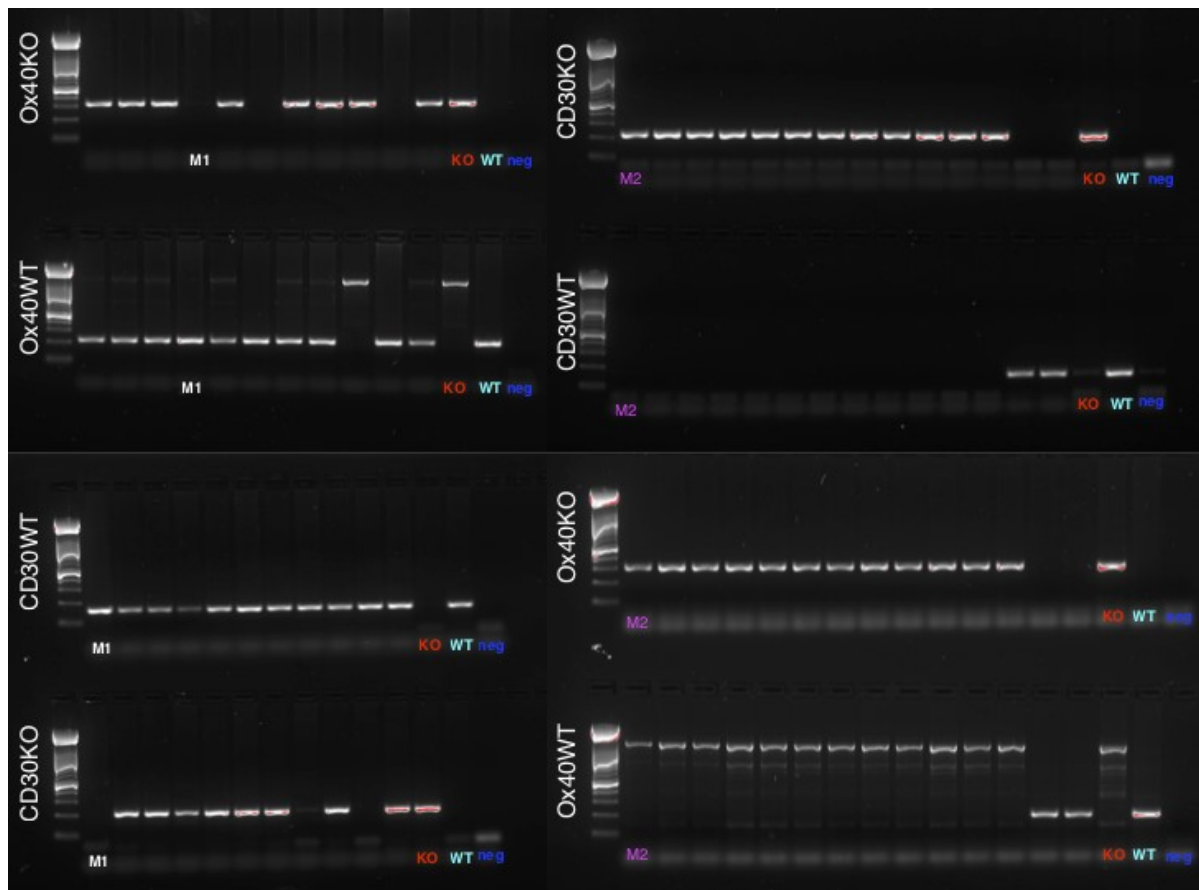
CD30WT forward: 5'-GGA CAC AAG TTG AGC CCA GT-3'

CD30WT reverse: 5'-TGG TGT GTT CCG TGG ATA CC-3'

3. Jeweils 2 µl Proben (isolierte DNA), Positivkontrolle, Negativkontrolle und eine Wildtyp-Probe wurden mit je 13 µl aus obigem Mix inkubiert.

4. Cycling: Mit einem der Polymerase angepassten Programm wird im Thermo-Cycler die PCR durchgeführt.
5. Elektrophorese-Gel-Vorbereitung: aus 2g Agarose und 100 ml *GelRed* (1:10.000 in 0,5% TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) wurde in der Mikrowelle (3 Minuten) ein Gel hergestellt. Dieses wurde flüssig in eine Kammer gefüllt. Ein Kamm formte, während das Gel auskühlte und erstarrte, die Aussparungen für die Proben.
6. Elektrophorese: Das erstarrte Gel wurde nach etwa einer Stunde in eine Elektrophorese-Kammer umgefüllt (0,5% TRIS-Acetat-EDTA-Puffer). 3 µl *DNA Gel Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific) wurde in jeweils 5 µl einer Probe suspendiert und anschließend gemeinsam in die Gel-Aussparungen pipettiert. Ebenfalls in die Aussparung kommen eine Negativkontrolle, Positivkontrolle sowie ein DNA-Marker (DNA-Leiter mit 100 Basenpaaren als Vergleichslänge). Anschließend wurde die Kammer für 45 Minuten bei 80V und 400A unter Strom gesetzt. Danach wurde in einer UV-Kammer via Computer das Ergebnis ausgewertet.

Diese Arbeitsschritte wurden für alle Proben potenzieller Doppelknockout-Mäuse für die möglichen Genotypen durchgeführt (CD30 Wildtyp, CD30 Knockout, Ox40 Wildtyp, Ox40 Knockout). Abhängig von den bei der PCR verwendeten Primern vermehrte sich die Erbinformation für die Rezeptoren falls die entsprechende genetische Information in der Probe vorhanden war. Die Gelelektrophorese trennt die isolierten und evtl. vermehrten DNA-Fragmente nach Größe auf. Dabei demaskieren sich Unterschiede in den DNA-Proben und es kann mit Hilfe der Kontrollen auf das Vorhandensein des Rezeptors (Wildtyp) bzw. auf dessen Fehlen (Knockout) rückgeschlossen werden. Abbildung 4 zeigt repräsentative Auszüge aus einer Gelelektrophorese zur Genotypisierung. Wird dabei die Mutation (Knockout) für CD30 bzw. Ox40 nachgewiesen, ohne den Nachweis der Bande für den Wildtyp dieses Rezeptors, so ist die entsprechende Maus für den Knockout homozygot. Nur Mäuse die homozygot für den Knockout von CD30 und Ox40 waren wurden für die Experimente herangezogen.



**Abbildung 4: Gelelektrophorese zur Genotypisierung.**

Dargestellt sind repräsentative Bandenmuster zur Genotypisierung von Mäusen auf das Vorliegen des CD30- bzw. Ox40-Knockouts. Einzelne Beispiele wurden beschriftet:

**M1** (weiß): Wildtyp-Maus

**M2** (rosa): homozygote Doppelknockout-Maus (CD30/Ox40<sup>-/-</sup>)

**KO** (rot): CD30/Ox40<sup>-/-</sup> als Kontrolle, **WT** (türkis): Wildtyp-Maus als Kontrolle, **neg** (blau): Negativkontrolle.

## 2.2 Gewinnung des NTS-Serums

Von zentraler Bedeutung für das Tiermodell der NTS ist die Gewinnung eines Serums, welches heterologe Anti-GBM-Antikörper enthält und für die Induktion der Immunreaktionen verantwortlich ist. Dieses Serum erhält man grundsätzlich durch die Immunisierung einer fremden Spezies gegen GBM-Bestandteile der Mäuse. In diesem Fall wurde das Serum aus einem Kaninchen gewonnen.

### 2.2.1 Gewinnung der Antigene

Ziel ist zunächst die Gewinnung der GBM-Antigene, die in weiterer Folge für die Immunisierung der Kaninchen verwendet werden sollen. Zu diesem Zweck werden zunächst die Nieren herkömmlicher Mäuse, unabhängig vom Genotyp, gewonnen. Als nächstes muss die Trennung von Cortex und Medulla erfolgen. Dies kann mit Hilfe eines scharfen Skalpell durchgeführt werden, nachdem die Nieren aus ihrer Kapsel gelöst wurden.

Um im nächsten Schritt Glomeruli aus dem Nierencortex zu isolieren, wird eine Siebetechnik verwendet. Dazu wird eine grob homogenisierte Masse der Nierenrinden durch ein feines Sieb gedrückt und in einer Puffer-Lösung gesammelt. Fragmente die im Sieb verbleiben werden verworfen. Für einen solchen ersten Siebevorgang eignet sich eine Netzgröße von etwa 150  $\mu\text{m}$ . Die gewonnene Lösung wird anschließend erneut durch ein Sieb gelassen. Die dabei verwendete Netzgröße ist jedoch kleiner. Die Schritte werden so lange mit immer feineren Sieben wiederholt bis die isolierten Glomeruli auf einem der Siebe hängen bleiben (z. B. zwischen 75 und 45  $\mu\text{m}$ ). Von diesem können sie wieder in eine geeignete Lösung heruntergewaschen und gesammelt werden.

Es folgen mehrere Durchgänge der Zentrifugation an deren Ende das gewonnene Glomeruli-Sediment in einer Pufferlösung gelöst werden kann. Eine Kontrolle unter dem Mikroskop sollte erfolgen, um die Reinheit der Isolation zu bestimmen. Grundsätzlich ist jedoch bei aller Sorgfalt mit einer Kontamination von zum Beispiel Nierentubuli zu rechnen (264-266). Im nächsten Schritt müssen die Glomeruli von ihrer Basalmembran getrennt werden. Um dies zu erreichen kann eine Methode verwendet werden, die in ähnlicher Weise erstmals von Meezan et al. beschrieben wurde (267). Zusätzlich kann eine Behandlung im Ultraschallbad erfolgen (265, 266). Auf diese Weise lysierte Glomeruli werden zentrifugiert und anschließend hintereinander mit verschiedenen Substanzen wie Desoxyribonuklease oder Desoxycholsäure behandelt und wiederholt zentrifugiert. Am Ende erhält man die isolierten Basalmembrananteile der Glomeruli (sowie der kontaminierenden Tubuli).

### **2.2.3 Immunisierung gegen die isolierten Antigene**

Die auf diese Weise isolierten glomerulären Basalmembrananteile werden in weiterer Folge zur Immunisierung eines Kaninchens genutzt. Isolierte Basalmembranen einer Maus sind ohne Weiteres jedoch nicht in der Lage ausreichend starke Immunreaktionen in Kaninchen auszulösen. Aus diesem Grund werden die isolierten Antigene mit einem Adjuvans kombiniert bevor sie den Kaninchen injiziert werden. Dafür eignet sich besonders gut die sogenannte komplette Freund Adjuvans, welche Bestandteile von *Mycobacterium tuberculosis* enthält und dadurch heftige Immunreaktionen in Versuchstieren auslöst.

Die Injektion erfolgt subkutan an mehreren Hautstellen des Kaninchens. Nach zum Beispiel 4 und 6 Wochen folgen Booster-Injektionen. Einige Tage später werden die Versuchstiere auf eine Weise euthanasiert, die die Gewinnung einer ausreichenden Menge Blut der Kaninchen ermöglichen. Auf diese Weise kann anschließend das nephrotoxische Serum gewonnen werden (72).

## **2.3 Isolation der CD4<sup>+</sup> Zellen**

### **2.3.1 Grundprinzipien der Zellisolation**

Für die Isolation der CD4<sup>+</sup> Zellen wurde ein Isolations-Kit der Firma Miltenyi Biotec verwendet (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Das Grundprinzip hinter dieser als *MACS Cell Separation* vermarkteten Technologie ist die Trennung von Zellen mit Hilfe ferromagnetisch-konjugierter Antikörper und einem Magnetfeld. Dabei stehen zur Isolation grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Zunächst lassen sich durch die Verwendung eines bestimmten Antikörpers eine spezifische Gruppe von Zellen markieren. Verwendet man nun ein Magnetfeld, um diese bestimmten markierten Zellen zurückzuhalten, erreicht man die positive Selektion dieser Zellpopulation. Der Nachteil dieser Methode ist, dass isolierte Zellen nun von Antikörpern gebunden und verunreinigt vorliegen. Die zweite Methode umgeht dieses Problem, indem nicht nach einem bestimmten Antigen markiert wird, sondern alle anderen Zellen, die nicht zu der zu isolierenden Gruppe gehören, durch eine Vielzahl konjugierter Antikörper markiert werden. Auf diese Weise werden am Ende möglichst alle Zellen zurückgehalten, die nicht zu der gewünschten Population gehören. Diese Technologie wird in verschiedenen *MACS Cell Isolation Kits* angeboten. Dabei ist ein für die Isolation einer bestimmten Population ausgerichteter Antikörper-Cocktail vorgegeben, der außer den gewünschten Zellen alle anderen ferromagnetisch markiert. Auch in den hier beschriebenen Experimenten wurde ein solches negativ selektierendes Kit verwendet. Der Vorteil gegenüber der positiven Selektion ist, dass nach Transfer keine Antikörper das natürliche Agieren der Zellen manipulieren können. Mit dem *MACS Separator* werden noch sogenannte *MACS Columns* verwendet. Dabei handelt es sich um eine ferromagnetische Matrix, welche die magnetische Separation noch verstärkt. Die Matrix ist dabei so aufgebaut, dass Zellen ungehindert und ohne Schädigung hindurchlaufen können aber bereits bei geringster Markierung mit einem konjugierten Antikörper zurückgehalten werden (268).

Diese Technologie ermöglicht die Gewinnung einer reinen und unbeschädigten Zellsuspension unter den Columns von sehr hoher Spezifität. Im Folgenden wird die Durchführung der CD4<sup>+</sup> Zell Isolation mit Hilfe eines MACS Kits beschrieben.

### **2.3.2 CD4<sup>+</sup> Zell Isolation aus Wildtyp- oder Knockout-Mäusen**

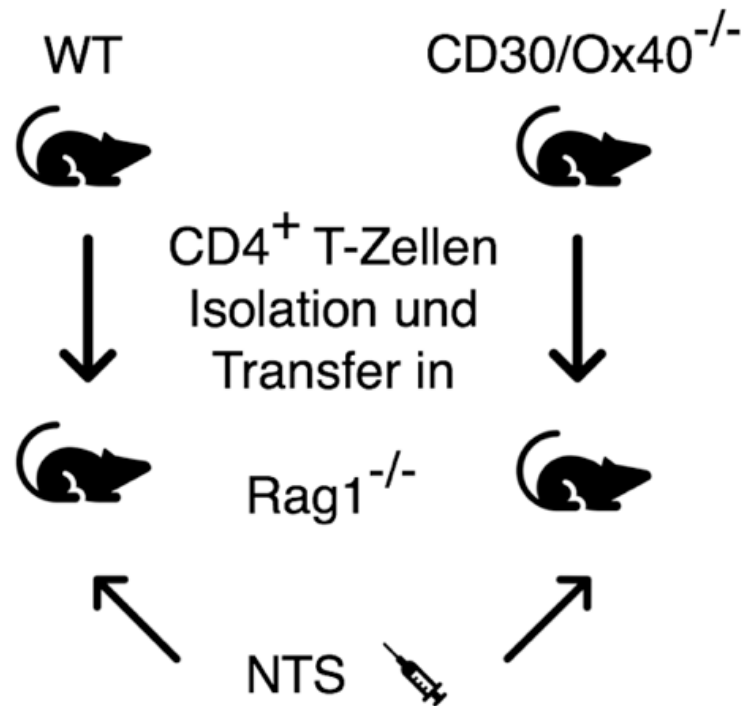
Für die Zellisolation wurde das Miltenyi Biotec *MACS CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit mouse* (Bestellnummer 130-104-454) verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten rasch sowie streng nach Protokoll und wenn notwendig auf Eis. Verwendete Lösungen wurden auf 4°C gekühlt. Für die Separation wurde ein MACS Separator mit geeigneter Column verwendet (269).

1. Herstellung einer Zellsuspension: Zunächst wurden 4 Wildtypmäuse sowie 4 CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Mäuse getötet und deren Milzen unverzüglich explantiert. Mit Hilfe eines Zellsiebs (*Falcon Cell Strainer*, Netzgröße 70 µm) und dem *MACS Puffer* (entspricht PBS (engl. phosphate-buffered saline) mit 0.5% BSA (engl. bovine serum albumin) und 2 mM EDTA) wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Dies geschah in zwei Gruppen für die Wildtyp- sowie Knockout-Mäuse. Anschließend wurden für beide Suspensionen die Zellzahlen mit Hilfe eines Mikroskops und einer Zählkammer bestimmt.
2. Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert und anschließend im *MACS Puffer* resuspendiert. Die verwendeten Volumina der Substanzen wurden den Zellzahlen angepasst.
3. Der Antikörper-Cocktail, der für die Isolation von CD4<sup>+</sup> Zellen angepasst wurde, enthält eine Vielzahl monoklonaler Antikörper, die mit Biotin konjugiert vorliegen. Diese Antikörper sind gegen folgende Antigene gerichtet: CD8a, CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, Anti-MHC Class II, Ter-119, und TCRγ/δ.  
Volumina des Biotin-Antikörper-Cocktails wurden den Zellzahlen angepasst. Die Zellsuspensionen wurden für 5 Minuten im Kühlschrank inkubiert.
4. Eine zweite Gruppe von monoklonalen Antikörpern ist gegen das Biotin der ersten gerichtet und mit den supermagnetischen MicroBeads konjugiert. Es folgte die Inkubation der Zellsuspensionen für 10 Minuten im Kühlschrank. Auch hier wurden die Volumina angepasst.
5. Magnetische Zell-Separation: Die nach Protokoll behandelten Zellsuspensionen wurden anschließend je durch eine Column innerhalb eines MACS Separators laufen gelassen. Anschließend wurde mit einer geeigneten Pufferlösung nachgespült. Die unter den Columns gesammelten Suspensionen entsprechen den isolierten CD4<sup>+</sup> Zellen. Zellen in den Suspensionen wurden abzentrifugiert und in PBS resuspendiert.

## **2.4 Zelltransfer**

14 Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden in zwei Gruppen CD4<sup>+</sup> Zellen aus entweder Wildtyp-Mäusen oder Knockout-Mäusen transferiert. Die Zellsuspensionen wurden auf Eis transportiert und nach möglichst kurzer Verzögerung injiziert.

Pro Maus wurden 1,5x10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen intravenös in die Schwanzvene verabreicht. Dies entspricht etwa Zellen aus 1 Milz aufgeteilt auf 2 Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse.



**Abbildung 5: CD4<sup>+</sup> Zelltransfer in Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse.**

Nach der Isolation von CD4<sup>+</sup> Zellen wurden diese in Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse transferiert. Dabei gab es zwei Gruppen. Der einen Gruppe wurden Zellen aus Wildtyp-Mäusen und der anderen Gruppe Zellen aus Knockout-Mäusen transferiert. Einen Tag später wurde mit der Immunisierung begonnen.

## 2.5 NTS-Induktion

Die Prinzipien und Mechanismen der nephrotoxischen Serum Nephritis wurden bereits in Kapitel 1.3 beschrieben. Die Herstellung des NTS-Serums wurde in Kapitel 2.2 skizziert.

Die hier beschriebene Durchführung entspricht in etwa einer bereits beschriebenen (270).

1. **Immunisierung der Mäuse:** Die Immunisierung gegen Kaninchen-Immunglobuline erfolgte einen Tag nach Transfer der CD4<sup>+</sup> Zellen. Dafür wurde eine Immunisierungs-Mixtur aus 0,01g getrocknetem und nicht vitalem Mycobacterium tuberculosis H37a (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) und 180 µl Kaninchen IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) in 1 ml Freund Adjuvans (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und 820 µl PBS hergestellt. Dies entspricht einer Konzentration von 2 mg/ml Kaninchen IgG.  
Die Immunisierung erfolgte subkutan ins Hinterbein mit jeweils 0,1ml pro Maus.
2. **NTS-Induktion:** Drei Tage nach Immunisierung wurde den Mäusen das NTS-Serum injiziert. Verabreicht wurden 0,15ml intravenös in die Schwanzvene pro Maus.

## **2.6 Bestimmung des Albumin-Kreatinin-Quotienten**

Die Albuminurie ist ein wichtiger Marker glomerulären Schadens. Unter physiologischen Bedingungen verhindert der glomeruläre Filter, dass größere Mengen Albumin diesen überwinden können. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind dabei einerseits die Molekülgröße des Albumins und andererseits die negativen Ladungen der glomerulären Basalmembran. Kleinere Mengen Albumin, die es auch unter physiologischen Bedingungen schaffen den glomerulären Filter zu überwinden, werden normalerweise im proximalen Tubulus resorbiert (271).

Um Albumin im Harn zu bestimmen, sind unterschiedliche Messmethoden möglich. Lange Zeit galt die Sammlung eines 24-Stunden Harns als Goldstandard in der Proteinurie-Diagnostik. Diese Methode hat den Vorteil, dass über den Tag auftretende Schwankungen in der Albumin-Konzentration des Harns weniger Einfluss auf die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Gruppen nehmen können, da sich Schwankungen über den Tag verteilt relativieren. Diese Methode ist jedoch mit einem großen Aufwand verbunden und ist im Falle eines Mausmodells kaum umzusetzen. Die Bestimmung der Albumin-Konzentration zu einem beliebigen Zeitpunkt ist dagegen stark von verschiedenen Faktoren abhängig. Um dennoch eine Aussagekraft der Konzentrationen zu einem bestimmten Zeitpunkt erreichen zu können, ist es notwendig, diese im Kontext der Hydrierung zu relativieren. An dieser Stelle kommt dem Albumin-Kreatinin-Quotienten eine wichtige Rolle zu. Geht man davon aus, dass bei gestörtem glomerulärem Filter der Verlust des Albumins in den Harn zeitlich relativ konstant verläuft, ergibt sich die Möglichkeit als Bezugswert einen zweiten konstant in den Harn abgegebenen Wert hinzuzuziehen. Aus dieser Überlegung ergibt sich die Aussagekraft des Albumin-Kreatinin-Quotienten, der wesentlich besseren Rückschluss auf den Grad der Albuminurie ermöglicht als die Albumin-Konzentration an sich (272).

Zu berücksichtigen ist aber, dass Kreatinin unter anderem ein Stoffwechselprodukt der Muskulatur darstellt und deswegen auch in der Kreatinin-Ausscheidung zwischen Personen große Unterschiede herrschen können. Im Falle einer Studie an Mäusen mit gleichem Geschlecht, genetischem Background und denselben Lebensbedingungen, stellt der Albumin-Kreatinin-Quotient dennoch einen häufig verwendeten und für unsere Zwecke zuverlässigen Marker für den Grad der Proteinurie dar (271).

Unter einem ELISA (engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay) versteht man einen quantitativen Immunoassay, der auf der Verwendung eines Enzyms als Marker basiert. Grundsätzlich werden Antikörper auf einer festen Phase fixiert (sogenanntes Coaten), an

welchen nun ein spezifisches Antigen binden kann. Ein zweiter Antikörper ist mit dem bereits erwähnten Enzym markiert und bindet ebenfalls an das fixierte Antigen. Je höher die Konzentration der Antigene, desto mehr Enzym-markierte Antikörper können sich binden. Schließlich lässt sich anhand des Substratumsatzes dieses Enzyms auf die Konzentration der Antikörper und damit auch auf die Konzentration der Antigene schließen. Die Fixierung über den ersten Antikörper ermöglicht dabei, dass die Antikörper-Antigenkomplexe gewaschen werden können, ohne dass bereits fixierte Moleküle weggespült werden. Die Verwendung zweier Antikörper (einer fixiert in der stationären Phase und ein zweiter gekoppelt an ein Enzym) wird auch als Sandwich-Elisa bezeichnet (273). Um schlussendlich auf die Konzentrationen eines Moleküls schließen zu können, müssen quantitative Unterschiede des Substratumsatzes festgehalten werden. Dies geschieht unter Zuhilfenahme eines Photometers.

Die Photometrie ermöglicht durch die Lichtabsorption einer Lösung Rückschlüsse auf deren Konzentration zu ziehen. Dafür macht man sich das Lambert-Beersche Gesetz zunutze, welches vereinfacht besagt, dass bei gleicher Lichtintensität und Wellenlänge die Absorption (und damit auch die Intensität des transmittierenden Lichts) abhängig von der Stoffmengenkonzentration ist. Diese Gesetzmäßigkeit ermöglicht anhand der nach Durchstrahlung einer Lösung gemessenen Lichtintensität die Stoffkonzentration zu bestimmen. Dies ist auch möglich, wenn sich mehrere Moleküle gelöst vorfinden (wie es z. B. in Urin der Fall ist). In diesem Fall hilft die Verwendung einer bestimmten Wellenlänge, die vom zu bestimmenden Stoff besonders gut absorbiert wird, um auf die Konzentration eines einzelnen Moleküls zu schließen. In der Praxis wird häufig auf Verwendung einer Standardlösung zurückgegriffen, mit deren Hilfe eine Standardkurve angegeben werden kann. Gemessene Optical Density (OD) können mit Hilfe dieser in Konzentrationen umgerechnet werden (274, 275).

In den hier durchgeführten Versuchen wurde ein Sandwich-Elisa durchgeführt, um die Albuminkonzentrationen in Harnproben der Versuchstiere zu bestimmen. Um den Albumin-Kreatinin-Quotienten zu berechnen, wurde außerdem die Kreatininkonzentration photometrisch bestimmt. Verwendet wurde dafür ein Standard Kit der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Die Berechnung des Albumin-Kreatinin-Quotienten erfolgte in  $\mu\text{g}$  pro mg Kreatinin.

### 2.6.1 Albumin-ELISA

Alle durchgeführten Schritte wurden rasch und streng nach vorliegendem Protokoll durchgeführt. Urinproben der Mäuse wurden an Tag 14 nach Injektion des NTS-Serums gesammelt.

1. Coating einer *NUNC-Immuno MicroWell*-Platte (Sigma-Aldrich) mit Anti-Albumin Antikörpern (goat anti-mouse, A90-134A-5, Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA): Die Antikörper wurden auf 1 µg/ml in einem dem Protokoll angepassten Coating-Puffer (1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 2,93 g NaHCO<sub>3</sub> in 1 L destilliertem Wasser) gelöst. 100 µl pro Well wurden pipettiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Platte vorsichtig mit einer geeigneten Pufferlösung (0,05% Tween/PBS-Puffer) gewaschen.
2. Blocken: Nach dem Coating muss die Platte geblockt werden. Dies geschah mit einer Lösung von 0,5% bovinem Serumalbumin (in oben genanntem Tween/PBS-Puffer). Die Block-Lösung wurde pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen.
3. Verdünnungsreihe der Proben und Standard: Aus den vorhandenen Urinproben wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Die Verdünnungen erfolgten ebenfalls in der 0,5% BSA Lösung. Von einer Standardlösung wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe angelegt. Proben, Standard und Negativprobe wurden in geeigneten Konzentrationen in Gruppen aus je drei Wells aufgetragen (100 µl pro Well). Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit anschließendem Waschdurchgang.
4. Auftragung eines zweiten Anti-Albumin Antikörpers mit HRP (Meerrettichperoxidase)-Konjugat (goat anti-mouse, A90-134P-7, Bethyl Laboratories,): Die Antikörper wurden auf 0,02 µg/ml in einem 0,05% Tween/PBS-Puffer verdünnt. 100 µl pro Well wurden aufgetragen und für zwei Stunden inkubiert sowie anschließend gewaschen.
5. Substratzusatz und Stopp-Reaktion: Ein Substrat aus Tetramethylbenzidin-Pufferlösung und Wasserstoffperoxid wurde hinzugefügt (100 µl pro Well) und für 15 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Der Substratumsatz wurde anschließend durch Hinzufügen von Schwefelsäure gestoppt (50 µl pro Well).
6. Die Platte wurde anschließend sofort im Photometer bei 450nm ausgewertet. Mit der aus dem Standard gebildeten Standardkurve (korrigiert durch eine 4-Parameter Regression), ließen sich die Konzentrationen der Proben eruieren (abgelesen im linearen

Bereich der Kurve). Die exakten Werte in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  wurden rechnerisch (bezogen auf die Verdünnung) mit Hilfe der Photometer Software bzw. Kurvenkorrektur bestimmt.

## 2.6.2 Kreatinin-Assay

Zur Bestimmung der Kreatinin-Konzentrationen wurde ein auf der Jaffe-Reaktion basierendes Standard-Kit der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Bei der Jaffe-Reaktion kommt es zu einer chemischen Reaktion von Kreatinin und Pikrinsäure, welche zu einem rötlich-orangen Farbumschlag führt. Dieser Farbumschlag wird zur kolorimetrischen Bestimmung der Kreatininkonzentration genutzt (276).

Alle Schritte wurden streng nach Protokoll durchgeführt.

1. Verdünnung der Proben: Alle Proben wurden 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt.
2. Eine alkalische Lösung auf Pikrinbasis wurde nach Protokoll hergestellt.
3. Negativprobe, Standard (im Kit enthalten) und verdünnte Proben wurden auf eine Microplatte in Dreiergruppen aufgetragen (18  $\mu\text{l}$  pro Well).
4. 176  $\mu\text{l}$  der Lösung pro Well wurden hinzugefügt und für 12 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Platte bei 490nm im Photometer abgelesen.
5. Anschließend wurden 6  $\mu\text{l}$  pro Well einer im Kit enthaltenen Säure pipettiert und resuspendiert sowie 5 Minuten inkubiert.
6. Erneutes Ablesen im Photometer bei 490nm.

Errechnet wurden die endgültigen Konzentrationen aus den ODs nach folgender Formel:

$$c \text{ (mg/dL)} = (Probe_{initial} - Probe_{final}) : (Standard_{initial} - Standard_{final}) \times 3$$

## 2.7 BUN-Level

### 2.7.1 Harnstoff-Stickstoff

Wichtige Rückschlüsse auf die Nierenfunktion geben sogenannte Nierenretentionsparameter. Diese werden physiologisch durch die Niere ausgeschieden und liegen bei eingeschränkter Nierenfunktion in erhöhten Konzentrationen im Serum vor. In der Klinik besonders bedeutsam sind dabei die Kreatinin- sowie Harnstoffkonzentrationen. Diese sind dabei nicht nur rein diagnostisch bedeutsam, sondern fungieren auch als Indikatoren für die Notwendigkeit einer Dialyse (277). Um Harnstoffkonzentrationen aus Blutproben bestimmen zu können, stehen eine Reihe laborchemischer Verfahren zur Verfügung. Häufig kommt die Bestimmung sogenannter Blood-Urea-Nitrogen (BUN) Level zum Einsatz. Grundsätzlich haben BUN-Level und Harnstoffkonzentration die gleiche Aussagekraft, werden aber in unterschiedlichen Regionen unterschiedlich häufig verwendet. Blut-Harnstoff-Stickstoff-Konzentrationen beziehen sich dabei nur auf den im Harnstoff

gebundenen Stickstoffanteil. Während die Stoffmengen also in beiden Bestimmungsmethoden identisch sind (1 Mol Harnstoff enthält genau 1 Mol N<sub>2</sub>), müssen Konzentrationen auf Grund unterschiedlicher molarer Massen ineinander umgerechnet werden (278). Unter physiologischen Bedingungen wird Harnstoff von der Leber aus Ammoniak und Hydrogencarbonat gebildet. Ammoniak ist dabei ein Endprodukt des Proteinstoffwechsels, jedoch bereits in niedrigen Konzentrationen äußerst giftig. In Form des Harnstoffs kann es schließlich über die Nieren ausgeschieden werden (279).

### **2.7.2 Kolorimetrische Bestimmung**

Blutproben getöteter Mäuse wurden zentrifugiert und das Serum bis zur Durchführung der Assays eingefroren.

Für die Bestimmung der BUN-Level wurde ein einfaches kolorimetrisches BUN-Assay Standardkit *Urea Nitrogen (BUN) Colorimetric Detection Kit* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden streng nach Protokoll durchgeführt.

1. Verdünnungsreihen für Standard und Proben: Der mitgelieferte Standard wurde in einer Verdünnungsreihe mit destilliertem Wasser verdünnt (5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3215 und 0.156 mg/dL). Proben wurden ebenfalls in destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Anschließend wurden verdünnte Proben, Standardreihe und eine Negativprobe auf eine 96-Well- Mikrotiterplatte aufgetragen (50 µl pro Well)
2. Reagenzien: Anschließend wurden die beiden Color Reagenzien nacheinander in die Wells hinzugegeben (75 µl pro Reagenz, erst A dann B). Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur.
3. In einem geeigneten Photometer wurde bei 450nm abgelesen. Aus den Werten der Standardreihe wurde eine Standardkurve erstellt (einfache lineare Regression). Kurvenkorrektur und Berechnung der genauen Konzentrationen (bezogen auf die Verdünnung) wurden durch die Photometersoftware bestimmt.

### **2.8 PAS-Färbung**

Die PAS-Färbung basiert auf der sogenannten PAS-Reaktion (engl. Periodic acid-Schiff reaction). Diese dient als histologische Färbemethode zum Nachweis von Glykolgruppen, wie sie in einer Vielzahl von Kohlenhydraten vorkommen. Der chemische Mechanismus hinter dieser Färbemethode ist die Oxidation der Glykolgruppen zu Aldehydgruppen durch Perjodsäure. Die Schiff'sche Reagenz färbt diese Aldehydgruppen schließlich rötlich ein,

wodurch Glykoproteine, Glykolipide und andere für den Aufbau von Geweben zentrale Strukturen gegen ihre Umgebung hervorgehoben werden (280). In der Niere führt die PAS-Färbung zu einer deutlichen Betonung extrazellulärer Strukturen wie der Basalmembran aber z. B. auch von Mesangiumzellen. Mit dieser Färbemethode lassen sich auch glomeruläre Schäden wie eine Glomerulosklerose nachweisen (281). PAS-Positivität in den Glomeruli korreliert demnach mit den Schädigungen der Glomeruli und ermöglicht durch die Verwendung eines PAS-Scoring-Systems den Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen.

In Formalin fixierte Mausnieren wurden in Paraffin eingebettet und in einem Mikrotom zu 4 µm dünnen Querschnitten verarbeitet. Für die Färbung wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Entparaffinierung und Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe mit anschließender Spülung in Aqua destillata.
2. Inkubation in Perjodsäure über 10 Minuten und anschließender Spülvorgang
3. Inkubation in der Schiff'schen Reagenz über 10 Minuten mit anschließendem mehrminütigem Waschvorgang in Leitungswasser
4. Gegenfärbung in einer Hämatoxylinfärbung (*Gill III*, Sigma-Aldrich) mit anschließendem Bläuen in Leitungswasser
5. Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und nach dem Trocknen eindecken

Das semiquantitative PAS-Scoring-System basiert auf der Auszählung von mindestens 50 Glomeruli. Dabei erfolgt eine Einteilung in vier Kategorien: **0-3**

*0: das Glomerulum zeigt keine PAS-Positivität. 1: bis 1/3 des Glomerulums ist PAS-positiv. 2: 1/3 bis 2/3 sind PAS-positiv. 3: mehr als 2/3 des Glomerulums ist PAS-positiv.*

Schnitte der Mausnieren wurden verblindet ausgewertet. Ein Mittelwert der mindestens 50 ausgewerteten Glomeruli wurde bestimmt und als PAS-Score für die entsprechende Probe festgelegt.

## **2.9 Immunhistochemie**

Unter Immunhistochemie versteht man die Verwendung spezifischer Antikörper, um bestimmte Strukturen in histologischen Präparaten hervorzuheben. Werden Gewebeschnitte mit einem bestimmten Antikörper markiert, ermöglicht das farbliche Sichtbarmachen der Antigen-Antikörper-Komplexe festzustellen, wie viele der besagten Antigene sich an welcher Stelle befinden. Unterschieden wird bei dieser Methode zwischen einem direkten

und indirekten Nachweis. Diese Bezeichnungen beziehen sich darauf, ob ein direkt gegen das zu bestimmende Antigen gerichteter Antikörper farblich markiert wurde oder ob ein zweiter „indirekter“ Antikörper, welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, für die farbliche Markierung verantwortlich ist. Konkret sind solche Antikörper häufig mit Enzymen konjugiert, die zu einem farbigen Substratumsatz in ihrer Nähe führen (282). Besagte Antigene, die sich auf eine solche Weise sichtbar machen lassen, werden häufig zu einer Gruppe namens *Cluster of Differentiation* gezählt und ermöglichen zwischen Immunzellen zu unterscheiden. Zu diesen gehören auch CD4, CD8 und CD68. Ebenfalls bei der Differenzierung zwischen Immunzellen helfen kann das Antigen Ly6G.

### **2.9.1 CD4**

CD4 und der T-Zell-Rezeptor wurden bereits in Kapitel 1.4.1 skizziert.

Bei CD4 handelt es sich um einen Corezeptor der Bindung mit MHC-II-Molekülen. Er ist besonders mit T-Helferzellen assoziiert, lässt sich aber auch auf regulatorischen T-Zellen, unreifen Thymozyten und in kleineren Mengen teilweise auch auf weiteren Immunzellen wie Makrophagen nachweisen. In erster Linie dient die immunhistochemische Färbung nach CD4<sup>+</sup> Zellen jedoch dem Nachweis von T-Helferzellen unabhängig von deren Effektor-Differenzierung (282).

### **2.9.2 CD68**

Bei CD68 (oder auch Makrosialin) handelt es sich um ein vor allem intrazellulär membranassoziiertes Glykoprotein aus der LAMP-Familie (engl. lysosomal/endosomal-associated membrane glycoprotein) mit gehäuftem Vorkommen in Monozyten bzw. Makrophagen, wobei es möglicherweise als Scavenger-Rezeptor an der Phagozytose besagter Zellen beteiligt ist (283). CD68 kann in einer geringeren Menge auch auf weiteren Immunzellen wie dendritischen Zellen oder Granulozyten exprimiert werden, dient im Gewebe aber in erster Linie zum Nachweis von Makrophagen (283).

### **2.9.3 Ly6G**

Die Rolle der Ly6-Proteinfamilie ist vielfältig und nicht in allen Details eindeutig geklärt. Während einige Ly6-Proteine auf einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen exprimiert werden, ist Ly6G relativ spezifisch für neutrophile Granulozyten (284). Antikörper gegen Ly6G werden deswegen nicht nur in der Immunhistochemie verwendet, sondern stellen auch ein häufig verwendetes Mittel dar um Neutrophile in experimentellen Studien zu eradizieren (285). Wie für andere Mitglieder dieser Gruppe ist auch die Funktion von Ly6G relativ unbekannt, es scheint jedoch im Menschen kein identisches Protein zu geben (284).

Der immunhistochemische Nachweis ermöglicht die Markierung von neutrophilen Granulozyten. Deswegen ist Ly6G trotz der vielen offenen Fragen ein häufig verwendetes Ziel entsprechender Färbungen.

#### **2.9.4 Durchführung**

Schockgefrorene Nierenpräparate wurden im Kryo-Mikrotom geschnitten (4 µm). Pro Probe und Färbung wurden 2 Schnitte hergestellt. Diese wurden vor der Färbung 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Gefärbt wurde jedes Präparat für CD4, CD68 und Ly6G. Außerdem erfolgte parallel eine Isotyp-Kontrolle, um die Spezifität der Färbungen nachzuweisen.

1. Die Schnitte wurden in Aceton bei 4°C für 8 Minuten fixiert. Die luftgetrockneten Schnitte wurden anschließend mit einem Fettstift umrandet.
2. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, mussten die Schnitte zunächst geblockt werden. Hintergrund der Blockierung sind unspezifische Bindungen, welche unabhängig von der Antikörperspezifität auftreten können. Entsprechende Stellen im Gewebe werden durch die verwendete Lösung für die spezifischen Antikörper unzugänglich gemacht. Avidin bindet im Gewebe vorkommendes endogenes Biotin. Die Blockierung geschah mit einer Lösung aus 20% FCS (fetales Kälberserum), 10% Serum der Spezies des zweiten Antikörpers (Ziege, siehe unten), 70% PBS und wenigen Tropfen Avidin (4 pro mL). Von dieser Lösung wurden 200 µl auf jeden Schnitt aufgetragen und 20 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde zunächst in PBS und anschließend in Gelatine-Lösung gewaschen (jeweils 2 Minuten).
3. Auftragen des ersten Antikörpers: Dieser erste Antikörper stellt den antigenspezifischen Teil der Färbung dar und sollte auf das zu identifizierende Antigen angepasst werden. Die hier verwendeten Antikörper stammen aus Ratten und waren gegen CD4 (clone YTS191.1; Serotec, Oxford, UK), CD68 (clone FA-11; Serotec) und Ly6G (clone 1A8; Abcam, Cambridge, UK) gerichtet. Für jeden Antikörper wurden Lösungen aus 2 µl des Antikörpers pro ml und 4 Tropfen Biotin pro ml angefertigt. Auf jeden Schnitt wurden 200 µl der jeweiligen Lösung aufgetragen und für 60 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde mehrmals für mehrere Minuten in PBS gewaschen.
4. Auftragen des zweiten Antikörpers: Ein Biotin-konjugierter Ziegen Anti-Ratten IgG-Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories) wurde auf alle Schnitte aufgetragen (ebenfalls 200 µl in einer 5 µl /mL Konzentration) und für 45 Minuten

in einer dunklen feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde erneut mehrmals in PBS gewaschen.

5. Verstärkung der Signale mit einem Avidin-Biotin-Komplex: Avidin und mit Peroxidase konjugiertes Biotin binden an den zweiten Antikörper und bilden auf diese Weise stärkere Signale. Verwendet wurden ein Standard-Kit (*VECTASTAIN ELITE ABC HRP KIT*, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) aus welchem nach Protokoll eine ABC-Lösung hergestellt wurde. Von dieser wurden 200 µl pro Schnitt aufgetragen und für weitere 45 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Anschließend Waschen in PBS (mehrmals für wenige Minuten) und 0,1 M Essigsäure-Acetat-Puffer (3 Minuten).
6. Färbung: Die Biotin-gebundene Peroxidase katalysiert einen Substratumsatz und damit Farbumschlag im Bereich der Antigen-Antikörper-Komplexe. Die zur Einfärbung verwendete Lösung bestand aus einer 3-Amino-9-Ethylcarbazol-Lösung (3ml), 0,1 M Essigsäure-Acetat-Puffer (60ml) und Wasserstoffperoxid (30 µl). Diese wurde kurz vor Verwendung in Dunkelheit aus Stocklösungen hergestellt. Die Schnitte wurden für wenige Minuten in diesem Chromogen entwickelt. Der optimale Farbumschlag wurde unter regelmäßigen Kontrollen im Mikroskop abgewartet. Es folgte ein Waschvorgang in Aqua destillata.
7. Als Gegenfärbung folgte eine Hämatoxylinfärbung (*Gill III*, Sigma-Aldrich) wie bereits in Kapitel 2.8 beschrieben. Schnitte wurden eingebettet und ausgewertet.

Für die quantitative Auswertung wurden CD4<sup>+</sup> Zellen und Ly6G<sup>+</sup> Zellen in 6 HPF-Feldern (engl. high power field; 400x Vergrößerung) randomisiert und verblindet sowohl im Bereich der Medulla als auch im Cortex nachgezählt.

Für die semiquantitative Auswertung der CD68<sup>+</sup> Zellen wurde ein Scoring-System verwendet. Dazu wurden CD68<sup>+</sup> Zellen pro LPF (engl. low power field; 200x Vergrößerung) ausgezählt. Dabei erfolgt eine Einteilung in fünf Kategorien:

*0: 0-4 Zellen pro LPF. 1: 5-10 Zellen pro LPF. 2: 11-50 Zellen pro LPF. 3: 50-200 Zellen pro LPF. 4: >200 Zellen pro LPF.*

Ein Mittelwert aus mindestens 6 LPFs wurde für jede Probe bestimmt.

## **2.10 Statistische Auswertung und Darstellung**

Die statistische Auswertung sowie Erstellung der Grafiken erfolgte mit der Software *Prism 8* für Macintosh (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Zu vergleichende Gruppen wurden zunächst auf Normalverteilung geprüft. Dafür wurde in der verwendeten Software

ein Lilliefors-Test (Kolmogorow-Smirnow-Lilliefors-Test) und Shapiro-Wilk-Test herangezogen. Konnte nach diesen von einer Normalverteilung der Stichproben in den zu vergleichenden Gruppen ausgegangen werden, wurde ein zweiseitiger Student-t-Test für zwei unabhängige Stichproben durchgeführt. War dies nicht der Fall, wurde ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Als statistisch signifikant wurde ein  $p < 0,05$  definiert.

Für die Darstellung wurde je nach Datensatz ein Balkendiagramm (Mittelwert und Standardfehler), Boxplot (Standarddarstellung mit Minimum, 1. Quartil, Median, 2. Quartil und Maximum) oder eindimensionaler Scatterplot (Median oder Mittelwert und Standardfehler) gewählt. Alle Grafiken wurden entsprechend beschriftet.

### 3 Ergebnisse – Resultate

#### 3.1 *Rag1*<sup>-/-</sup> Mäuse sind vor der NTS geschützt, wenn transferierte CD4<sup>+</sup> Zellen weder CD30 noch Ox40 exprimieren

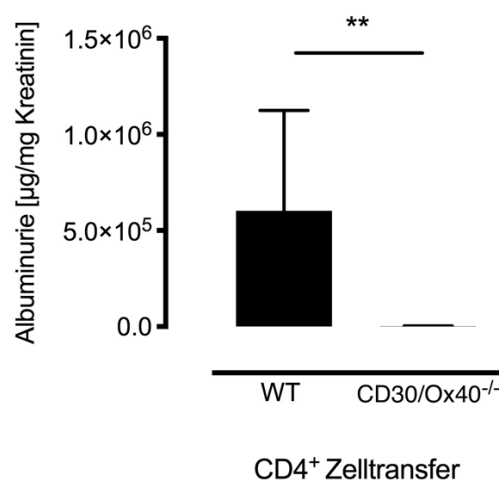
*Rag1*<sup>-/-</sup> Mäuse, denen CD4<sup>+</sup> Zellen aus Wildtyp-Mäusen transferiert wurden, bildeten einen deutlichen Phänotyp der NTS aus. Dies war sowohl an der Albuminurie, den Nierenretentionsparametern als auch am pathohistologischen glomerulären Schaden zu erkennen. Transferierte man dagegen CD4<sup>+</sup> Zellen aus CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Mäusen, waren die *Rag1*<sup>-/-</sup> Mäuse im Wesentlichen vor der Erkrankung geschützt.

##### 3.1.1 Albuminurie

Es wurde die Albuminurie in den beiden zu vergleichenden Gruppen, gemessen am Albumin-Kreatinin-Quotienten, bestimmt. *Rag1*<sup>-/-</sup> Mäuse, welchen CD4<sup>+</sup> Zellen aus den WT-Mäusen (CD30/Ox40<sup>+/+</sup>) transferiert wurden, zeigten an Tag 14 nach NTS Induktion eine massive Albuminurie. Diejenigen *Rag1*<sup>-/-</sup> Mäuse dagegen, denen CD4<sup>+</sup> Zellen aus den CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Mäusen transferiert wurden, zeigten zum selben Zeitpunkt einen signifikant geringeren Albumin-Kreatinin-Quotienten ( $p < 0,01$ ; Abbildung 6).

##### 3.1.2 BUN-Level

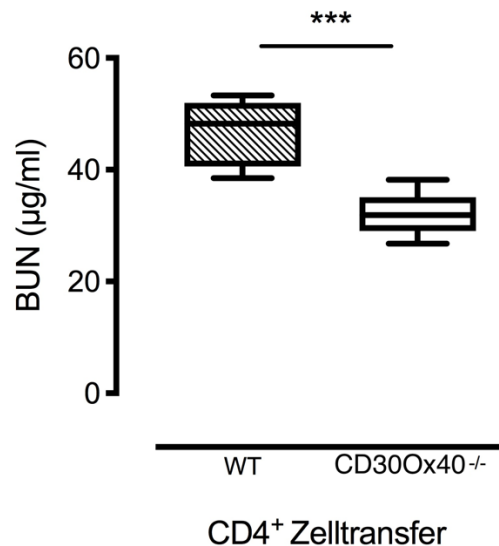
Blut-Harnstoff-Stickstoffkonzentrationen wurden als Nierenretentionsparameter an Tag 14 nach NTS-Induktion bestimmt (Abbildung 7). Auch hier zeigten *Rag1*<sup>-/-</sup> Mäuse, rekonstituiert mit WT CD4<sup>+</sup> Zellen, signifikant höhere Konzentrationen als nach Transfer der Knockout-CD4<sup>+</sup> Zellen ( $p < 0,001$ ). Der Mittelwert betrug dabei 46,85 µg/ml ( $\pm 2,453$ ) bzw. 32 µg/ml ( $\pm 1,428$ ).



**Abbildung 6: Albuminurie (Albumin-Kreatinin-Quotient) an Tag 14 nach NTS-Induktion.**

Dargestellt sind die Gruppen nach CD4<sup>+</sup> Zelltransfer aus Wildtyp-Mäusen (WT, links, n=6) und Knockout-Mäusen (CD30Ox40<sup>-/-</sup>, rechts, n=7).

Mittelwert und Standardfehler. \*\* $p < 0,01$



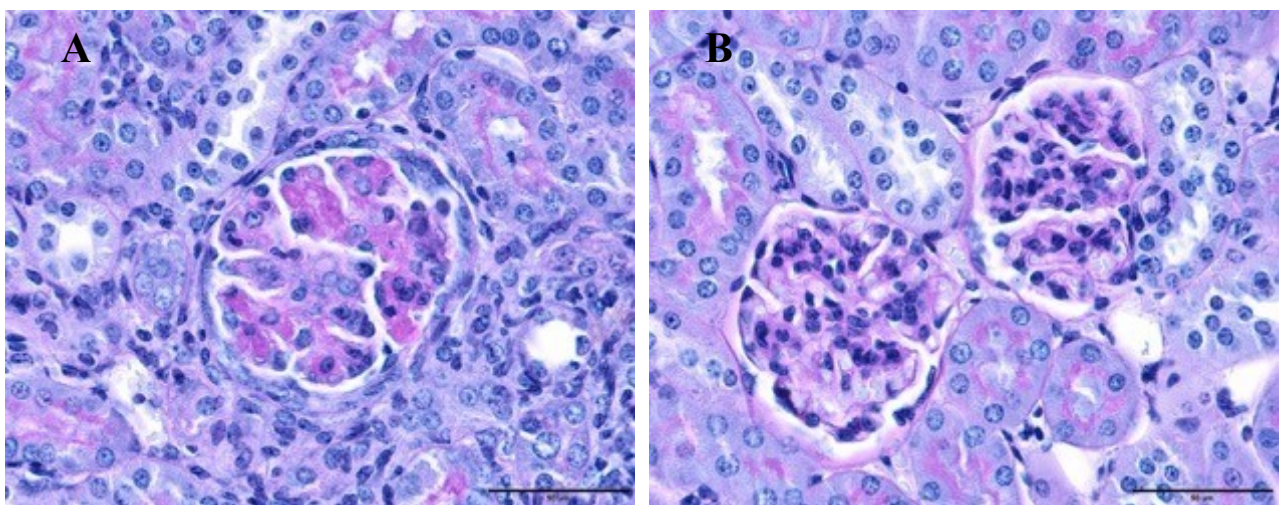
**Abbildung 7: Blut-Harnstoff-Stickstoffkonzentrationen an Tag 14 nach NTS-Induktion.**

Dargestellt sind die Gruppen nach CD4<sup>+</sup> Zelltransfer aus Wildtyp-Mäusen (WT, links, n=6) und Knockout-Mäusen (CD30x40<sup>-/-</sup>, rechts, n=7).

Boxplot mit Median. \*\*\*p<0,001

### 3.1.3 PAS-Score

Zur Evaluierung des histologischen glomerulären Schadens wurde eine PAS-Färbung durchgeführt (Abbildung 8). Verglichen wurden die Nierenpräparate der beiden Gruppen via PAS-Score (Abbildung 9). Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse nach CD4<sup>+</sup> Zelltransfer aus Knockout-Mäusen (PAS-Score Mittelwert von 0,2407 ±0,0423) zeigten ein signifikant (p<0,0001) besseres Bild bezogen auf den glomerulären Schaden als nach Transfer von CD4<sup>+</sup> Wildtyp-Zellen (PAS-Score Mittelwert von 1,449 ±0,1027).

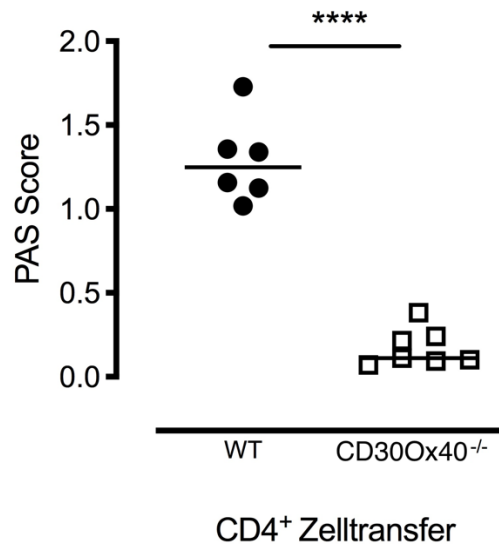


**Abbildung 8: Nierenpräparate in PAS Färbung.**

A: Repräsentatives Glomerulum einer Rag1<sup>-/-</sup> Maus nach WT CD4<sup>+</sup> Zelltransfer.

B: Repräsentative Glomeruli einer Rag1<sup>-/-</sup> Maus nach Transfer CD30x40<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen.

Maßstab entspricht 50 µm bzw. 400x Vergrößerung.



**Abbildung 9: Darstellung des PAS-Score.**

Dargestellt sind die Gruppe nach WT Transfer (WT, links, n=6) und Transfer von CD4<sup>+</sup> Zellen aus Knockout-Mäusen (CD30x40<sup>-/-</sup>, rechts, n=7).

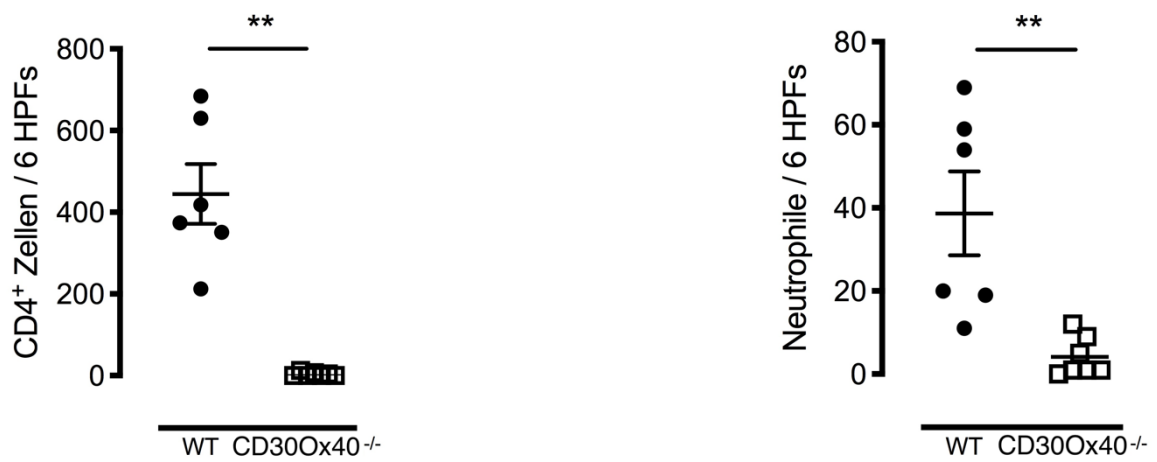
Scatterplot mit Median. \*\*\*\*p<0,0001

### **3.2 Immunhistochemische Färbungen zeigen massive Unterschiede in der Menge infiltrierender Immunzellen in die Niere**

Zusätzlich wurden die Nierenpräparate der Versuchstiere immunhistologisch nach CD4<sup>+</sup> Zellen, CD68<sup>+</sup> Zellen (Makrophagen) und Ly6g<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten eingefärbt (Abbildung 12).

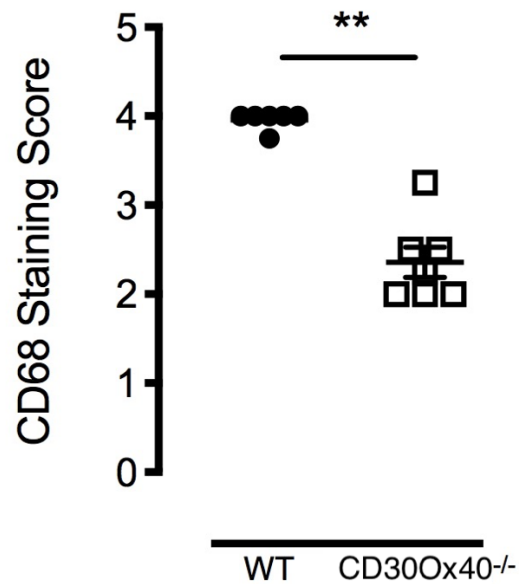
Die Auswertung der Präparate von Tag 14 zeigen in WT-Transfer Mäusen signifikant höhere Zahlen aller untersuchten infiltrierenden Leukozyten.

In Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen, die mit CD30/Ox40<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen rekonstituiert wurden, ließen sich dagegen kaum CD4<sup>+</sup> Zellen in den Nieren nachweisen (p<0,01; Abbildung 10). Ähnlich eindrucksvoll sind die Unterschiede infiltrierender Makrophagen zwischen beiden Gruppen (p<0,01; Abbildung 11). Die evaluierten Präparate zeigten insgesamt wesentlich weniger neutrophile Granulozyten als CD4<sup>+</sup> Zellen oder Makrophagen. Dennoch waren auch in diesem Fall signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festzustellen (p<0,01; Abbildung 10).



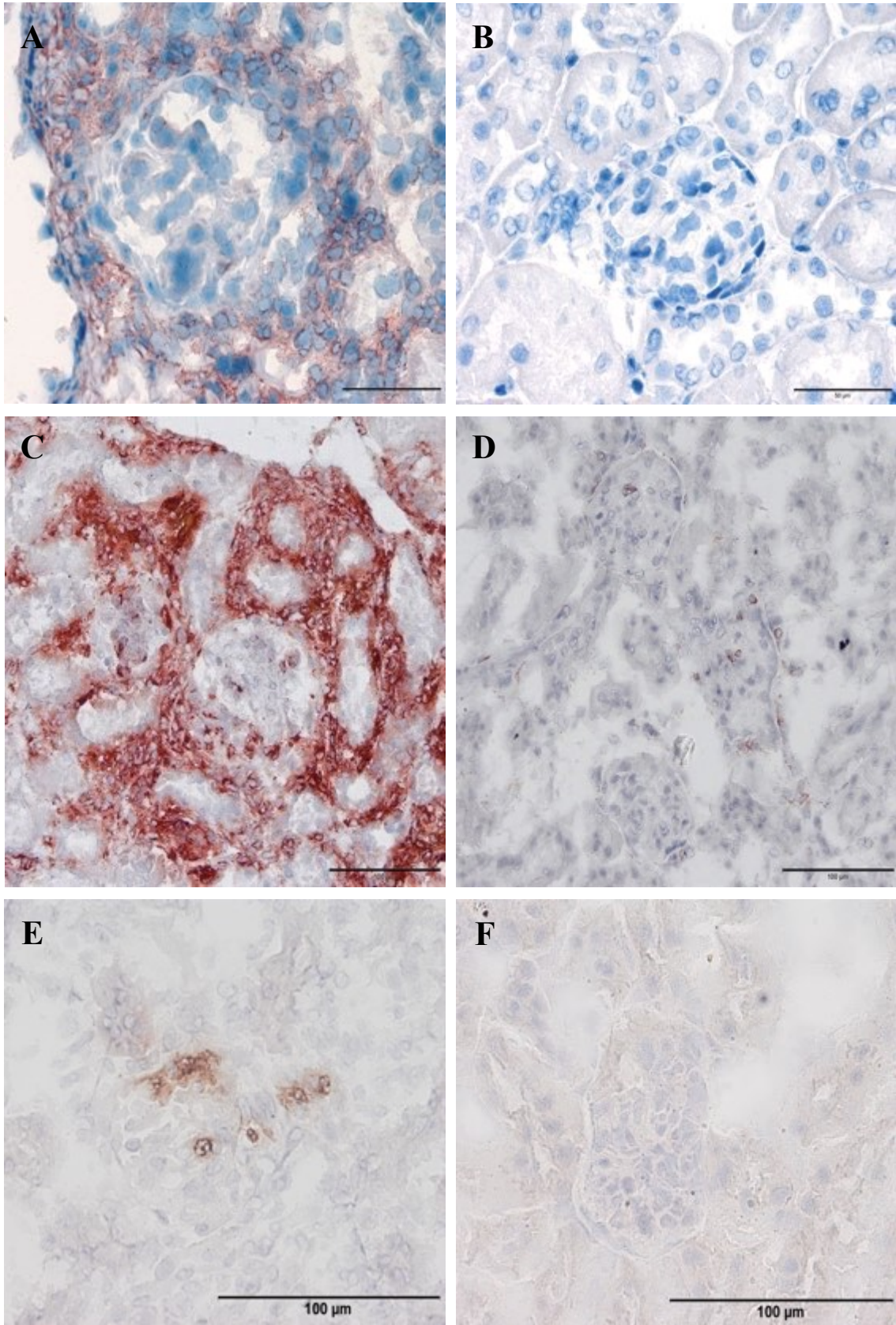
**Abbildung 10: CD4<sup>+</sup> Zellen und Neutrophile pro 6 HPFs.**

Transfer von WT CD4<sup>+</sup> Zellen (WT, jeweils links, n=6) und Knockout CD4<sup>+</sup> Zellen (CD30x40<sup>-/-</sup>, jeweils rechts, n=7). Scatterplot mit Mittelwert und Standardfehler. \*\*p<0,01



**Abbildung 11: CD68-Staining Score.**

Transfer von WT CD4<sup>+</sup> Zellen (WT, links, n=6) und Knockout CD4<sup>+</sup> Zellen (CD30x40<sup>-/-</sup>, rechts, n=7). Scatterplot mit Mittelwert und Standardfehler. \*\*p<0,01



**Abbildung 12: Nierenpräparate nach immunohistochemischer Färbung.**

Repräsentative Ausschnitte nach  $CD4^+$  Transfer aus WT-Mäusen (jeweils links, A,C,E) oder nach  $CD4^+$  Transfer aus Knockout-Mäusen (jeweils rechts, B,D,F).

A und B: CD4 (entspricht  $CD4^+$  Zellen) in 400x Vergrößerung

C und D: CD68 (entspricht Makrophagen) in 200x Vergrößerung

E und F: Ly6G (entspricht neutrophilen Granulozyten) in 400x Vergrößerung

Der Maßstab entspricht  $50\mu\text{m}$  (A,B) bzw.  $100\mu\text{m}$  (C-F)

## 4 Diskussion

T-Zellen sind zentral in der Pathogenese der nephrotoxischen Serum Nephritis. Dieses experimentelle Mausmodell einer Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis ist hochgradig abhängig von adäquaten adaptiven Immunantworten, insbesondere der CD4<sup>+</sup> Effektorzell-Subpopulationen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen. Vorausgehende Arbeiten aus unserem Labor konnten zeigen, dass die TNFRSF-Mitglieder CD30 und Ox40 sowie deren Liganden nach Induktion der NTS vermehrt auf CD4<sup>+</sup> Zellen exprimiert werden. Diese Beobachtung deckt sich mit Forschungsergebnissen aus humanen Glomerulonephritiden (211, 212, 240). Experimente mit CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten eindrucksvolle protektive Effekte durch die Blockade der CD30- und Ox40-Achsen. Knockout-Mäuse entwickelten eine signifikant mildere Form der NTS und waren im Wesentlichen vor der Erkrankung geschützt. Rezeptoren aus der TNFR-Superfamilie stellen wichtige costimulierende Signale für Lymphozyten dar und sind wesentlich an deren Proliferation, Überleben und Effektorfunktionen beteiligt. Einige von ihnen, und so auch CD30 und Ox40, werden aber nicht nur auf T-Zellen exprimiert, sondern scheinen weitreichendere Funktionen in der Kommunikation zwischen immunologischen aber auch nicht-immunologischen Zellen und Geweben zu übernehmen (173-175, 221, 223). Die Beobachtung der induzierten Expression dieser Rezeptoren auf T-Zellen in Erkrankungen wie der experimentellen Glomerulonephritis und die zentrale Rolle von T-Zellen für die Pathogenese der NTS führten zur Hypothese, dass die Expression von CD30 und Ox40 auf CD4<sup>+</sup> Zellen wesentlich den Phänotyp in diesem Mausmodell beeinflussen kann und der Wegfall ihrer costimulierenden Eigenschaften in besagten T-Zellen für die protektiven Effekte in CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen verantwortlich sind. Um diese Hypothese zu beweisen, führten wir ein Transferexperiment durch. Dadurch konnten wir den genetischen Knockout von CD30 und Ox40 auf CD4<sup>+</sup> Zellen beschränken, ohne dass weitere Zellen bzw. Gewebe in den Versuchstieren die Signale dieser Achsen verlieren. Die dabei beobachteten Unterschiede zur Kontrollgruppe waren lediglich durch den Einfluss der beiden Rezeptoren auf CD4<sup>+</sup> Zellen zu erklären. Der Einfluss auf andere Zellen und Gewebe, die an den Pathomechanismen der NTS beteiligt sind, wurde durch den Versuchsaufbau ausgeschlossen.

Die milden Verläufe in CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigten sich in Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen rekonstituiert mit CD30/Ox40<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich nicht nur eine signifikant geringere Albuminurie und signifikant niedrigere Konzentrationen

harnpflichtiger Substanzen, sondern auch ein wesentlich günstigeres histologisches Bild der GN. Der glomeruläre Schaden gemessen an PAS-Positivität war in Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen rekonstituiert mit CD30/Ox40<sup>+/+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen wesentlich schwerwiegender als in den kaum veränderten Glomeruli der Knockout-Transfer-Gruppe. Damit ließ sich die Hypothese beweisen, dass der Wegfall dieser Rezeptoren auf CD4<sup>+</sup> Zellen für die protektiven Effekte in Knockout-Mäusen verantwortlich ist. Gleichzeitig belegen die hier beschriebenen Experimente aber auch die unverzichtbare Bedeutung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen für die Pathogenese der NTS. Trotz Fehlen anderer Lymphozyten wie reifen CD8<sup>+</sup> Zellen oder B-Zellen in Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen (262), zeigte sich der Phänotyp der NTS in vollen Zügen. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studien in ähnlichen Modellen (117, 126). Der glomeruläre Schaden in dieser Form der experimentellen GN ist demnach lediglich von CD4<sup>+</sup> Zellen absolut abhängig, während andere Lymphozyten nur mäßigen Einfluss auf die Schwere der Erkrankung zu haben scheinen.

Die immunhistochemische Auswertung der Nierenpräparate ergab zusätzlich zu den Unterschieden im glomerulären Schaden in der PAS-Färbung eine deutliche Reduktion infiltrierender Zellen in der CD30/Ox40<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> Zell-Transfergruppe. Besonders die Unterschiede in den Zahlen an CD4<sup>+</sup> Zellen und Makrophagen waren immens. Makrophagen und neutrophile Granulozyten sind die eigentlichen Vermittler glomerulären Schadens in der NTS (78, 147, 155). CD4<sup>+</sup> Zellen können je nach Differenzierung in unterschiedliche Effektorzellen die Rekrutierung sowie Aktivität dieser Phagozyten beeinflussen (77, 105). Auch wenn die Unterschiede zwischen den Gruppen für CD4<sup>+</sup> Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten alle signifikant waren, imponiert besonders der Unterschied in der Positivität für CD4 und CD68. Die NTS zeigt klassischerweise eine zeitliche Dynamik, in welcher zunächst T<sub>H</sub>17-Zellen und neutrophile Granulozyten das histologische Bild in den Nieren prägen und später diese zunehmend durch T<sub>H</sub>1-Zellen und Makrophagen ersetzt werden (77). Da die Mäuse hier erst am Tag 14 evaluiert wurden, ist es wenig überraschend, dass zu diesem Zeitpunkt Makrophagen und vermutlich T<sub>H</sub>1-Zellen das immunhistochemische Bild prägen und neutrophile Granulozyten deutlich seltener vorkommen. Diese Erklärung deckt sich mit den Ergebnissen aus den vorausgehenden Knockout-Experimenten. Dort wurden zum gleichen Zeitpunkt in den Lymphknoten der nephritischen Mäuse signifikante Unterschiede in der Realtime-PCR-Auswertung für IFN- $\gamma$  gefunden, während für IL-17 keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten (siehe Kapitel 1.5.2). Demnach überwiegen in den sekundär lymphatischen Geweben die

T<sub>H</sub>1-Zellen mit ihrem charakteristischen Effektormolekül IFN- $\gamma$ , was auch für das hier beschriebene Transferexperiment eine naheliegende Erklärung darstellt.

Eine wichtige Frage ist auf welche Weise die Signale via CD30 und Ox40 in CD4<sup>+</sup> Zellen zur Pathogenese dieser Erkrankung beitragen. Die deutlich reduzierten Zahlen an CD4<sup>+</sup> Zellen im Nierenparenchym weisen auf einen quantitativen Effekt hin. In der Literatur werden unterschiedliche und teilweise widersprüchliche Effekte dieser costimulierenden Achsen auf CD4<sup>+</sup> Zellen beschrieben. Es gibt jedoch deutliche Hinweise darauf, dass CD30 und Ox40 positiven Einfluss auf die Proliferation und das Überleben von T-Zellen besitzen und weniger die Differenzierung in Richtung bestimmter Subpopulationen beeinflussen (162, 174, 177, 226). Angemerkt sei, dass In-vitro-Experimente an aus CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Mäusen isolierten CD4<sup>+</sup> Zellen unter T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>17-Stimulationsbedingungen keine Hinweise auf wesentliche Unterschiede in Richtung einer der beiden Effektor-Subpopulationen zeigten (Daten hier nicht gezeigt). Die Hypothese wäre demnach, dass aufgrund einer allgemein reduzierten Proliferationskapazität der CD4<sup>+</sup> Zellen im Verlauf der NTS-Pathogenese die klonale Expansion entsprechender antigenspezifischer Zellen ausbleibt und dadurch die inflammatorischen Prozesse im Nierenparenchym im Wesentlichen verhindert werden. Für diese Hypothese sprechen unsere Ergebnisse, dass der Proliferationsmarker Ki-67 in Lymphknoten nephritischer Knockoutmäuse deutlich weniger in CD4<sup>+</sup> Zellen nachweisbar ist als in der Kontrollgruppe.

Weitere Faktoren, die das Bild der reduzierten CD4<sup>+</sup> Zahlen zusätzlich begünstigen könnten, sind eine beeinflusste Migration von CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Lymphozyten in die Nieren. Zumindest für Ox40 und seinen Liganden wurde eine Rolle für die Adhäsion von aktivierten Lymphozyten am Endothel beschrieben (186). Zusätzlich gibt es Hinweise aus Studien an der EAE, dass Ox40L-Antikörper die Migration der T-Zellen in inflammatorische Gewebe behindern könnten (197). Außerdem könnte die Ox40-Achse an der Expression von Chemokinrezeptoren beteiligt sein (187). Konkret für die NTS bleiben solche oder ähnliche Mechanismen spekulativ.

Die deutlichen protektiven Effekte in CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Mäusen legen nahe, dass die therapeutische Blockade ebenfalls einen Vorteil für den Krankheitsverlauf mitbringen könnte. Vorausgehende Studien zeigten, dass die kombinierte Antikörper-Blockade des CD30L und Ox40L einen deutlichen Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe brachte (siehe Kapitel 1.5.3). Die protektiven Effekte waren zwar nicht so eindrucksvoll wie in den Knockout-Mäusen, zeigten aber ebenfalls signifikante Unterschiede in der Anzahl von in die Nieren infiltrierter CD4<sup>+</sup> Zellen und neutrophiler Granulozyten. Möglicherweise lassen sich

die Ergebnisse denen der Knockout-Mäusen angleichen, wenn die Antikörper in einer anderen Dosierung bzw. anderen Intervallen verabreicht werden. Außerdem könnten Antikörper mit einer höheren Affinität oder besseren neutralisierenden Eigenschaften deutlichere Ergebnisse liefern. Dennoch bestätigt sich, dass die Blockade der CD30- und Ox40-Achse eine potentielle Therapieoption darstellen könnte.

In den aufgeführten Experimenten wurden Mitglieder der TNFR-Superfamilie kombiniert blockiert, um den Verlauf der NTS zu begünstigen. Eine berechtigte Frage ist, inwiefern und warum diese kombinierte Blockade der Blockade einer einzelnen costimulierenden Achse überlegen sein könnte. Zunächst zeigte sich bereits in den Arbeiten von Gaspal et al., dass nur die kombinierte Blockade von CD30 und Ox40 in FoxP3-defizienten Mäusen einen schweren Verlauf zuverlässig verhindern konnten (204). Auch in der beschriebenen Therapie der nephritischen Mäuse zeigte sich die kombinierte Verabreichung der CD30L- und Ox40L-Antikörper der Einzelblockade dieser Liganden überlegen (Daten hier nicht gezeigt). Zusätzlich gibt es in der Literatur zur Blockade einer dieser Achsen auch negative Auswirkungen. Odobasic et al. untersuchten kürzlich die Effekte der Blockade des Ox40L in der NTS. Dabei zeigten die mit Ox40L-Antikörpern therapierten Mäuse ein schlechteres Outcome als die Kontrollgruppe (201). Grundsätzlich sind diese Ergebnisse überraschend, da in zahlreichen anderen Studien in Tiermodellen die Ox40-Achse meist einen negativen Einfluss auf die Erkrankungsverläufe zeigte (197, 200, 286). Andererseits konnten Ruby et al. in der EAE zeigen, dass die Rolle der Ox40-Achse wesentlich vom Zeitpunkt innerhalb des Erkrankungsverlaufs abhängig ist (203). Diese zeitliche Dynamik könnte sich auch in den Unterschieden der Ergebnisse von Odobasic et al. widerspiegeln, denn neben einer anderen NTS-Serum-Spezies gab es wesentliche Unterschiede in der zeitlichen Durchführung zu den hier beschriebenen Experimenten. Die widersprüchlichen Ergebnisse der Blockade einzelner TNFRSF-Achsen zeigt, wie wichtig die kombinierte Anwendung entsprechender Antikörper für den Therapieerfolg sein könnten. Dabei ist anzunehmen, dass die Effekte der kombinierten Blockade über einfache synergistische Mechanismen hinaus gehen. Odobasic et al. führten bereits einige Jahre zuvor Studien in der experimentellen GN durch, in denen sie die Rolle der CD28 Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) evaluierten. Dabei zeigte sich, dass obwohl in dieser Studie die Ox40-Achse in Wildtyp-Mäusen protektiv zu sein scheint, die Blockade des Ox40L in CD80/CD86<sup>-/-</sup> Mäusen einen günstigen Effekt auf die Erkrankung hat (202). Diese Ergebnisse sprechen für komplexe Interaktionen zwischen den Signalwegen costimulierender Rezeptoren. Im Falle der TNFRSF könnten TRAF-Proteine für solche Interaktionen entscheidend sein. Viele dieser Adaptorproteine

werden, wie in Kapitel 1.4 bereits beschrieben, von den verschiedenen Rezeptoren geteilt (170, 172). Damit könnten Faktoren wie die Konkurrenz um TRAFs Einfluss auf die Signaltransduktion haben. CD30 und Ox40 können wahrscheinlich beide TRAF2 und TRAF5 rekrutieren, wobei noch mehr gemeinsame TRAFs möglich sind. Ox40 ist zusätzlich in der Lage, Signale über die Rekrutierung von TRAF6 zu vermitteln (172, 174), welcher in Folge an der Vermittlung peripherer Toleranz von T-Zellen beteiligt sein könnten (195). Eine mögliche Hypothese zur Interaktion zwischen Ox40- und CD30-Signalen könnte also lauten, dass CD30 in der Lage ist die proinflammatorischen Signale der Ox40-Achse nach deren Wegfall zu übernehmen, antiinflammatorische Signale durch die TRAF6 Rekrutierung jedoch wegfallen. Erst durch zusätzliche Blockade der CD30-Achse überwiegt schlussendlich der Wegfall proinflammatorischer Signale und damit ein günstiger Effekt auf den Krankheitsverlauf. Ein tieferes Verständnis der molekularen Signaltransduktion innerhalb der TNFRSF ist notwendig, um diese oder ähnliche Hypothesen zu beweisen.

Die hier durchgeführten Studien konnten zeigen, dass die kombinierte Blockade der CD30- und Ox40-Achse einen vielversprechenden Therapieansatz in der experimentellen Glomerulonephritis darstellt. Selbst die vollkommen geschützten Knockout-Mäuse zeigten keine offensichtlichen Nebenwirkungen. Es bestand keine erhöhte Infektionsneigung, wohlbemerkt ohne dass die Mäuse einem besonderen Risiko ausgesetzt worden wären. Nawaf et al. beschreiben außerdem in CD30/Ox40<sup>-/-</sup> Mäusen einen effizienten Schutz vor Pneumokokken nach entsprechender Impfung (287). Insofern ist anzunehmen, dass die kombinierte Blockade dieser TNF-Rezeptoren auch im Menschen zu einer gezielten immunsuppressiven Therapie genutzt werden könnte, ohne dass schwere Infektionen die Indikationen massiv einschränken. Weitere Hinweise, die diese Annahme unterstützen, stammen aus Erfahrungen mit bereits verwendeten Wirkstoffen, welche auf die CD30- oder Ox40-Achse abzielen. In einer Phase II Studie wurde ein gegen Ox40L gerichteter monoklonaler Antikörper zur Behandlung von Asthma bronchiale eingesetzt. Trotz unzureichender Effekte in dieser Studie, war die Anwendung zumindest sicher (215). Schwerwiegendere Nebenwirkungen zeigt dagegen der CD30-Antikörper Brentuximab Vedotin. Dieser stammt aus der Lymphomforschung und ist mit einem toxischen Molekül konjugiert (239). Möglicherweise würde ein neutralisierender Antikörper ohne toxisches Konjugat diese Nebenwirkungen reduzieren und die Anwendbarkeit in autoimmunologischen Erkrankungen erhöhen.

Bedenkt man die Komplexität immunologischer Mechanismen und die feingliedrigen Abstimmungen zwischen den zahlreichen beteiligten Zellen und Geweben, ist es

naheliegend, dass mit zunehmendem detaillierten Verständnis immunologischer Erkrankungen in Zukunft auch immer komplexere Therapien bedeutend werden könnten. Hier konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Blockade zweier strukturell eng verwandter Rezeptoren aus der TNFR-Superfamilie einen vielversprechenden Therapieansatz in der experimentellen Glomerulonephritis darstellt. Diese Erkenntnisse sind wahrscheinlich auch auf humane Glomerulonephritiden anzuwenden und könnten bisherigen immunsuppressiven Therapien, die immer noch mit schweren Nebenwirkungen einhergehen, überlegen sein. Ein tieferes molekulares Verständnis der Mechanismen und Interaktionen costimulierender Rezeptoren und ihrer Liganden ist wichtig, um neue Therapiestrategien zu entwickeln. Die TNFR-Superfamilie bietet mit ihrer Vielfältigkeit das Potential, T-Zell vermittelte Immunantworten präzise zu regulieren und dadurch Autoimmunerkrankungen effizient mit möglichst wenigen Nebenwirkungen zu therapieren.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Silbernagl S. Physiologie - Kapitel 10 Die Funktion der Nieren. 7. Edition ed. Klinker R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S, editors. Stuttgart Georg Thieme Verlag; 2014.
2. Yu ASL, Chertow GM, Luyckx V, Marsden PA, Skorecki K, Taal MW. Brenner and Rector's The Kidney Elsevier Health Sciences; 2019.
3. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie. 4. ed. Stuttgart: Thieme; 2012.
4. Blum HE, Müller-Wieland D. Klinische Pathophysiologie. 10. ed. Stuttgart: Thieme; 2018.
5. Khanna R. Clinical presentation & management of glomerular diseases: hematuria, nephritic & nephrotic syndrome. *Mo Med.* 2011;108(1):33-6.
6. Chadban SJ, Atkins RC. Glomerulonephritis. *Lancet (London, England).* 2005;365(9473):1797-806.
7. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Höfler G, Kreipe H. Lehrbuch Pathologie. 6. Auflage ed. München Elsevier Health Sciences; 2019.
8. Dean DF, Molitoris BA. Chapter 7 - The Physiology of the Glomerulus. In: Ronco C, Bellomo R, Kellum JA, Ricci Z, editors. *Critical Care Nephrology (Third Edition)*. Philadelphia: Content Repository Only!; 2019. p. 35-42.e2.
9. Sethi S, Haas M, Markowitz GS, D'Agati VD, Rennke HG, Jennette JC, et al. Mayo Clinic/Renal Pathology Society Consensus Report on Pathologic Classification, Diagnosis, and Reporting of GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2016;27(5):1278-87.
10. Hénique C, Papista C, Guyonnet L, Lenoir O, Tharaux P-L. Update on crescentic glomerulonephritis. *Seminars in immunopathology.* 2014;36(4):479-90.
11. Henderson L, Turner N. Chapter 11 Anti-GBM Disease: Mechanisms, Clinical Features, and Treatment. In: Mason JC, Pusey CD, editors. *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases.* 7: Elsevier; 2007. p. 195-213.
12. Moroni G, Ponticelli C. Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis: Early treatment is a must. *Autoimmun Rev.* 2014;13(7):723-9.
13. Perše M, Večerić-Haler Ž. The Role of IgA in the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24):6199.
14. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB, et al. The pathophysiology of IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2011;22(10):1795-803.
15. Soares MFS, Roberts ISD. Histologic Classification of IgA Nephropathy: Past, Present, and Future. *Seminars in nephrology.* 2018;38(5):477-84.
16. Hunt EAK, Somers MJG. Infection-Related Glomerulonephritis. *Pediatr Clin North Am.* 2019;66(1):59-72.
17. Satoskar AA, Parikh SV, Nadasdy T. Epidemiology, pathogenesis, treatment and outcomes of infection-associated glomerulonephritis. *Nature reviews Nephrology.* 2020;16(1):32-50.
18. Almaani S, Meara A, Rovin BH. Update on Lupus Nephritis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* 2017;12(5):825-35.
19. Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, et al. *Harrisons Innere Medizin.* 19. Auflage, deutsche Ausgabe ed. Stuttgart, New York: Thieme; 2016.
20. Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2009;10(5):373-9.

21. Munroe ME, James JA. Genetics of Lupus Nephritis: Clinical Implications. *Seminars in nephrology*. 2015;35(5):396-409.
22. Arora P, Malik M, Sachdeva R, Saxena L, Das J, Ramachandran VG, et al. Innate and humoral recognition of the products of cell death: differential antigenicity and immunogenicity in lupus. *Clinical and experimental immunology*. 2017;187(3):353-68.
23. Tsokos GC, Lo MS, Costa Reis P, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nature reviews Rheumatology*. 2016;12(12):716-30.
24. Hanscombe KB, Morris DL, Noble JA, Dilthey AT, Tombleson P, Kaufman KM, et al. Genetic fine mapping of systemic lupus erythematosus MHC associations in Europeans and African Americans. *Hum Mol Genet*. 2018;27(21):3813-24.
25. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*. 2019;78(9):1151.
26. Bajema IM, Wilhelmus S, Alpers CE, Bruijn JA, Colvin RB, Cook HT, et al. Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and chronicity indices. *Kidney international*. 2018;93(4):789-96.
27. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(1):1-11.
28. Jennette JC, Nachman PH. ANCA Glomerulonephritis and Vasculitis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2017;12(10):1680-91.
29. Bajema IM. Pathological classification of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated glomerulonephritis. *Clinical and experimental immunology*. 2011;164 Suppl 1(Suppl 1):14-6.
30. Syed R, Rehman A, Valecha G, El-Sayegh S. Pauci-Immune Crescentic Glomerulonephritis: An ANCA-Associated Vasculitis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:402826-.
31. Jennette JC. Overview of the 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference nomenclature of vasculitides. *Clinical and experimental nephrology*. 2013;17(5):603-6.
32. McAdoo SP, Pusey CD. Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2017;12(7):1162-72.
33. L'Imperio V, Ajello E, Pieruzzi F, Nebuloni M, Tosoni A, Ferrario F, et al. Clinicopathological characteristics of typical and atypical anti-glomerular basement membrane nephritis. *J Nephrol*. 2017;30(4):503-9.
34. Nasr SH, Collins AB, Alexander MP, Schraith DF, Herrera Hernandez L, Fidler ME, et al. The clinicopathologic characteristics and outcome of atypical anti-glomerular basement membrane nephritis. *Kidney international*. 2016;89(4):897-908.
35. Bodis G, Toth V, Schwarting A. Role of Human Leukocyte Antigens (HLA) in Autoimmune Diseases. *Rheumatology and therapy*. 2018;5(1):5-20.
36. Sethi S, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy-associated proliferative glomerulonephritis. *Mayo Clin Proc*. 2013;88(11):1284-93.
37. Riedl M, Thorner P, Licht C. C3 Glomerulopathy. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2017;32(1):43-57.
38. Gansevoort RT, de Zeeuw D, de Jong PE. ACE inhibitors and proteinuria. *Pharm World Sci*. 1996;18(6):204-10.

39. Couser WG. Pathogenesis and treatment of glomerulonephritis-an update. *Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*. 2016;38(1):107-22.
40. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R, Rintelen H. *Physiologie*. München Elsevier Health Sciences; 2015.
41. Cain DW, Cidlowski JA. Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(4):545-56.
42. Lu NZ, Cidlowski JA. Translational Regulatory Mechanisms Generate N-Terminal Glucocorticoid Receptor Isoforms with Unique Transcriptional Target Genes. *Molecular Cell*. 2005;18(3):331-42.
43. Panettieri RA, Schaafsma D, Amrani Y, Koziol-White C, Ostrom R, Tliba O. Non-genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View. *Trends in pharmacological sciences*. 2019;40(1):38-49.
44. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocrine reviews*. 2003;24(4):488-522.
45. Perez A, Jansen-Chaparro S, Saigi I, Bernal-Lopez MR, Miñambres I, Gomez-Huelgas R. Glucocorticoid-induced hyperglycemia. *J Diabetes*. 2014;6(1):9-20.
46. Jefferson JA. Complications of Immunosuppression in Glomerular Disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2018;13(8):1264-75.
47. Ahlmann M, Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;78(4):661-71.
48. Wiseman AC. Immunosuppressive Medications. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2016;11(2):332-43.
49. Chen Y, Sun J, Zou K, Yang Y, Liu G. Treatment for lupus nephritis: an overview of systematic reviews and meta-analyses. *Rheumatology international*. 2017;37(7):1089-99.
50. Hiemstra TF, Walsh M, Mahr A, Savage CO, de Groot K, Harper L, et al. Mycophenolate mofetil vs azathioprine for remission maintenance in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: a randomized controlled trial. *Jama*. 2010;304(21):2381-8.
51. Schioppo T, Ingegnoli F. Current perspective on rituximab in rheumatic diseases. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:2891-904.
52. Pescovitz MD. Rituximab, an Anti-CD20 Monoclonal Antibody: History and Mechanism of Action. *American Journal of Transplantation*. 2006;6(5p1):859-66.
53. Stone JH, Merkel PA, Spiera R, Seo P, Langford CA, Hoffman GS, et al. Rituximab versus Cyclophosphamide for ANCA-Associated Vasculitis. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(3):221-32.
54. Rovin BH, Furie R, Latinis K, Looney RJ, Fervenza FC, Sanchez-Guerrero J, et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(4):1215-26.
55. Jordan N, D'Cruz D. Current and emerging treatment options in the management of lupus. *Immunotargets Ther*. 2016;5:9-20.
56. Pallet N, Fernández-Ramos AA, Lorient M-A. Chapter Four - Impact of Immunosuppressive Drugs on the Metabolism of T Cells. In: Galluzzi L, Rudqvist N-P, editors. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 341: Academic Press; 2018. p. 169-200.
57. Mok CC, Ying KY, Yim CW, Siu YP, Tong KH, To CH, et al. Tacrolimus versus mycophenolate mofetil for induction therapy of lupus nephritis: a randomised controlled trial and long-term follow-up. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016;75(1):30-6.

58. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nature medicine*. 2008;14(9):931-8.
59. Sin FE, Isenberg D. An evaluation of voclosporin for the treatment of lupus nephritis. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2018;19(14):1613-21.
60. Noris M, Mescia F, Remuzzi G. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nature reviews Nephrology*. 2012;8(11):622-33.
61. Stegall MD, Diwan T, Raghavaiah S, Cornell LD, Burns J, Dean PG, et al. Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2011;11(11):2405-13.
62. Welte T, Arnold F, Kappes J, Seidl M, Häffner K, Bergmann C, et al. Treating C3 glomerulopathy with eculizumab. *BMC nephrology*. 2018;19(1):7.
63. Burgstaler EA, W, J.L. . Apheresis: principles and technology of hemapheresis. In *Rossi's Principles of Transfusion Medicine* (eds T.L. Simon JM, E.L. Snyder, B.G. Solheim and R.G. trauss), editor: John Wiley & Sons; 2016.
64. Williams ME, Balogun RA. Principles of separation: indications and therapeutic targets for plasma exchange. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2014;9(1):181-90.
65. Bobati SS, Naik KR. Therapeutic Plasma Exchange - An Emerging Treatment Modality in Patients with Neurologic and Non-Neurologic Diseases. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(8):EC35-EC7.
66. Clark WF, Huang SS. Introduction to therapeutic plasma exchange. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2019;58(3):228-9.
67. Kronbichler A, Brezina B, Quintana LF, Jayne DR. Efficacy of plasma exchange and immunoadsorption in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome: A systematic review. *Autoimmun Rev*. 2016;15(1):38-49.
68. Clark WF, Huang SS, Walsh MW, Farah M, Hildebrand AM, Sontrop JM. Plasmapheresis for the treatment of kidney diseases. *Kidney international*. 2016;90(5):974-84.
69. Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC, et al. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Engl J Med*. 1991;325(6):393-7.
70. Walsh M, Merkel PA, Peh C-A, Szpirt WM, Puéchal X, Fujimoto S, et al. Plasma Exchange and Glucocorticoids in Severe ANCA-Associated Vasculitis. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(7):622-31.
71. Schwartz J, Padmanabhan A, Aqui N, Balogun RA, Connelly-Smith L, Delaney M, et al. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice-Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Seventh Special Issue. *Journal of clinical apheresis*. 2016;31(3):149-62.
72. Assmann KJ, Tangelder MM, Lange WP, Schrijver G, Koene RA. Anti-GBM nephritis in the mouse: severe proteinuria in the heterologous phase. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology*. 1985;406(3):285-99.
73. Odobasic D, Ghali JR, O'Sullivan KM, Holdsworth SR, Kitching AR. Glomerulonephritis Induced by Heterologous Anti-GBM Globulin as a Planted Foreign Antigen. *Current protocols in immunology*. 2014;106:15.26.1-0.
74. Hoppe JM, Vielhauer V. Induction and analysis of nephrotoxic serum nephritis in mice. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2014;1169:159-74.

75. Artinger K, Kirsch AH, Aringer I, Moschovaki-Filippidou F, Eller P, Rosenkranz AR, et al. Innate and adaptive immunity in experimental glomerulonephritis: a pathfinder tale. *Pediatr Nephrol.* 2017;32(6):943-7.
76. Du Y, Fu Y, Mohan C. Experimental anti-GBM nephritis as an analytical tool for studying spontaneous lupus nephritis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis.* 2008;56(1):31-40.
77. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(10):738-53.
78. Couser WG. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 1998;13 Suppl 1:10-5.
79. Kruger T, Benke D, Eitner F, Lang A, Wirtz M, Hamilton-Williams EE, et al. Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2004;15(3):613-21.
80. Kurts C, Heymann F, Lukacs-Kornek V, Boor P, Floege J. Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology. *Seminars in Immunopathology.* 2007;29(4):317-35.
81. Murphy K, Weaver C, Seidler L. *Janeway Immunologie, Kapitel 1.* 9. Auflage ed: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
82. Murphy K, Weaver C, Seidler L. *Janeway Immunologie.* 9. Auflage ed: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
83. Macri C, Pang ES, Patton T, O'Keeffe M. Dendritic cell subsets. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2018;84:11-21.
84. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology.* 2000;18:767-811.
85. Murphy K, Weaver C, Seidler L. *Janeway Immunologie, Kapitel 9.* 9. Auflage ed: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
86. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Antigen presentation by dendritic cells in renal lymph nodes is linked to systemic and local injury to the kidney. *Kidney international.* 2005;68(3):1096-108.
87. Teteris SA, Engel DR, Kurts C. Homeostatic and pathogenic role of renal dendritic cells. *Kidney international.* 2011;80(2):139-45.
88. Li L, Huang L, Sung SS, Vergis AL, Rosin DL, Rose CE, Jr., et al. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney international.* 2008;74(12):1526-37.
89. Hochheiser K, Heuser C, Krause TA, Teteris S, Ilias A, Weisheit C, et al. Exclusive CX3CR1 dependence of kidney DCs impacts glomerulonephritis progression. *The Journal of clinical investigation.* 2013;123(10):4242-54.
90. Riedel JH, Paust HJ, Turner JE, Tittel AP, Krebs C, Disteldorf E, et al. Immature renal dendritic cells recruit regulatory CXCR6(+) invariant natural killer T cells to attenuate crescentic GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2012;23(12):1987-2000.
91. Odobasic D, Kitching AR, Semple TJ, Holdsworth SR. Inducible co-stimulatory molecule ligand is protective during the induction and effector phases of crescentic glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2006;17(4):1044-53.
92. Hochheiser K, Engel DR, Hammerich L, Heymann F, Knolle PA, Panzer U, et al. Kidney Dendritic Cells Become Pathogenic during Crescentic Glomerulonephritis with Proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2011;22(2):306-16.

93. Menke J, Zeller GC, Kikawada E, Means TK, Huang XR, Lan HY, et al. CXCL9, but not CXCL10, promotes CXCR3-dependent immune-mediated kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(6):1177-89.
94. Andersen K, Eltrich N, Lichtnekert J, Anders HJ, Vielhauer V. The NLRP3/ASC inflammasome promotes T-cell-dependent immune complex glomerulonephritis by canonical and noncanonical mechanisms. *Kidney international*. 2014;86(5):965-78.
95. Tipping PG, Holdsworth SR. T cells in crescentic glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(5):1253-63.
96. Summers SA, Steinmetz OM, Li M, Kausman JY, Semple T, Edgton KL, et al. Th1 and Th17 cells induce proliferative glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20(12):2518-24.
97. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;156(1):5-7.
98. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1183:211-21.
99. Paust HJ, Turner JE, Riedel JH, Disteldorf E, Peters A, Schmidt T, et al. Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney international*. 2012;82(1):72-83.
100. Panzer U, Steinmetz OM, Paust HJ, Meyer-Schwesinger C, Peters A, Turner JE, et al. Chemokine receptor CXCR3 mediates T cell recruitment and tissue injury in nephrotoxic nephritis in mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(7):2071-84.
101. Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL. gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Current opinion in immunology*. 2008;20(3):353-7.
102. Murphy K, Weaver C, Seidler L. *Janeway Immunologie*, Kapitel 4. 9. Auflage ed: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
103. Turner JE, Krebs C, Tittel AP, Paust HJ, Meyer-Schwesinger C, Bennis SB, et al. IL-17A production by renal  $\gamma\delta$  T cells promotes kidney injury in crescentic GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(9):1486-95.
104. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KHG. Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from  $\gamma\delta$  T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity. *Immunity*. 2009;31(2):331-41.
105. Murphy K, Weaver C, Seidler L. *Janeway Immunologie*, Kapitel 11. 9. Auflage ed: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
106. Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators of inflammation*. 2017;2017:3908061.
107. Liu Y, Mei J, Gonzales L, Yang G, Dai N, Wang P, et al. IL-17A and TNF-alpha exert synergistic effects on expression of CXCL5 by alveolar type II cells in vivo and in vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(5):3197-205.
108. Disteldorf EM, Krebs CF, Paust HJ, Turner JE, Nouailles G, Tittel A, et al. CXCL5 drives neutrophil recruitment in TH17-mediated GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015;26(1):55-66.
109. Huang XR, Tipping PG, Apostolopoulos J, Oettinger C, D'Souza M, Milton G, et al. Mechanisms of T cell-induced glomerular injury in anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in rats. *Clinical and experimental immunology*. 1997;109(1):134-42.
110. Tesch GH, Schwarting A, Kinoshita K, Lan HY, Rollins BJ, Kelley VR. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not

- glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(1):73-80.
111. Paust H-J, Riedel J-H, Krebs CF, Turner J-E, Brix SR, Krohn S, et al. CXCR3+ Regulatory T Cells Control TH1 Responses in Crescentic GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2016;27(7):1933-42.
112. Haberstroh U, Pocock J, Gomez-Guerrero C, Helmchen U, Hamann A, Gutierrez-Ramos JC, et al. Expression of the chemokines MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 is differentially regulated by infiltrating inflammatory cells. *Kidney international*. 2002;62(4):1264-76.
113. Suarez-Fueyo A, Bradley SJ, Klatzmann D, Tsokos GC. T cells and autoimmune kidney disease. *Nature reviews Nephrology*. 2017;13(6):329-43.
114. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunology Today*. 1999;20(6):254-7.
115. Carvalho-Pinto CE, Garcia MI, Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Martin-Caballero J, Flores J, et al. Autocrine production of IFN-gamma by macrophages controls their recruitment to kidney and the development of glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;169(2):1058-67.
116. Largen PJ, Tam FW, Rees AJ, Cattell V. Rat mesangial cells have a selective role in macrophage recruitment and activation. *Experimental nephrology*. 1995;3(1):34-9.
117. Li S, Holdsworth SR, Tipping PG. MHC class I pathway is not required for the development of crescentic glomerulonephritis in mice. *Clinical and experimental immunology*. 2000;122(3):453-8.
118. Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nature immunology*. 2017;18(7):716-24.
119. Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3(+) Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity*. 2019;50(2):302-16.
120. Wolf D, Hohegger 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. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(5):1360-70.
121. Eller K, Weber T, Pruenster M, Wolf AM, Mayer G, Rosenkranz AR, et al. CCR7 deficiency exacerbates injury in acute nephritis due to aberrant localization of regulatory T cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(1):42-52.
122. Hohegger K, Siebenhaar F, Vielhauer V, Heininger D, Mayadas TN, Mayer G, et al. Role of mast cells in experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *European journal of immunology*. 2005;35(10):3074-82.
123. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature immunology*. 2005;6(2):135-42.
124. Eller K, Wolf D, Huber JM, Metz M, Mayer G, McKenzie AN, et al. IL-9 production by regulatory T cells recruits mast cells that are essential for regulatory T cell-induced immune suppression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(1):83-91.
125. Murphy K, Weaver C, Seidler L. *Janeway Immunologie, Kapitel 10. 9. Auflage ed*: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
126. Li S, Holdsworth SR, Tipping PG. Antibody independent crescentic glomerulonephritis in mu chain deficient mice. *Kidney international*. 1997;51(3):672-8.
127. Ruth AJ, Kitching AR, Kwan RY, Odobasic D, Ooi JD, Timoshanko JR, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and effector CD4+ cells play nonredundant roles in anti-myeloperoxidase crescentic glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(7):1940-9.

128. Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(10):1639-48.
129. Murphy K, Weaver C, Seidler L. *Janeway Immunologie*, Kapitel 3. 9. Auflage ed: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
130. George JF, Lever JM, Agarwal A. Mononuclear phagocyte subpopulations in the mouse kidney. *American journal of physiology Renal physiology*. 2017;312(4):F640-F6.
131. Radeke HH, Janssen-Graalfs I, Sowa EN, Chouchakova N, Skokowa J, Loscher F, et al. Opposite regulation of type II and III receptors for immunoglobulin G in mouse glomerular mesangial cells and in the induction of anti-glomerular basement membrane (GBM) nephritis. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(30):27535-44.
132. Murphy K, Weaver C, Seidler L. *Janeway Immunologie*, Kapitel 2. 9. Auflage ed: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
133. Alexander JJ, Chaves L, Chang A, Quigg RJ. The C5a receptor has a key role in immune complex glomerulonephritis in complement factor H-deficient mice. *Kidney international*. 2012;82(9):961-8.
134. Sheerin NS, Springall T, Carroll MC, Hartley B, Sacks SH. Protection against anti-glomerular basement membrane (GBM)-mediated nephritis in C3- and C4-deficient mice. *Clinical and experimental immunology*. 1997;110(3):403-9.
135. Hebert MJ, Takano T, Papayianni A, Rennke HG, Minto A, Salant DJ, et al. Acute nephrotoxic serum nephritis in complement knockout mice: relative roles of the classical and alternate pathways in neutrophil recruitment and proteinuria. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1998;13(11):2799-803.
136. Leemans JC, Kors L, Anders H-J, Florquin S. Pattern recognition receptors and the inflammasome in kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2014;10:398.
137. Fu Y, Xie C, Chen J, Zhu J, Zhou H, Thomas J, et al. Innate stimuli accentuate end-organ damage by nephrotoxic antibodies via Fc receptor and TLR stimulation and IL-1/TNF-alpha production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(1):632-9.
138. Tarzi RM, Davies KA, Robson MG, Fossati-Jimack L, Saito T, Walport MJ, et al. Nephrotoxic nephritis is mediated by Fcγ3 receptors on circulating leukocytes and not intrinsic renal cells. *Kidney international*. 2002;62(6):2087-96.
139. Brady HR. Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney international*. 1994;45(5):1285-300.
140. Mayadas TN, Rosetti F, Hernandez T, Sethi S. Neutrophils: game changers in glomerulonephritis? *Trends in molecular medicine*. 2010;16(8):368-78.
141. Thieblemont N, Wright HL, Edwards SW, Witko-Sarsat V. Human neutrophils in auto-immunity. *Seminars in immunology*. 2016;28(2):159-73.
142. Nemeth T, Mocsai A, Lowell CA. Neutrophils in animal models of autoimmune disease. *Seminars in immunology*. 2016;28(2):174-86.
143. Weiss SJ. Tissue Destruction by Neutrophils. *New England Journal of Medicine*. 1989;320(6):365-76.
144. Davies MJ. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2011;48(1):8-19.
145. Johnson RJ, Klebanoff SJ, Ochi RF, Adler S, Baker P, Sparks L, et al. Participation of the myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-halide system in immune complex nephritis. *Kidney international*. 1987;32(3):342-9.
146. Odobasic D, Kitching AR, Semple TJ, Holdsworth SR. Endogenous myeloperoxidase promotes neutrophil-mediated renal injury, but attenuates T cell

- immunity inducing crescentic glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(3):760-70.
147. Chalmers SA, Chitu V, Herlitz LC, Sahu R, Stanley ER, Putterman C. Macrophage depletion ameliorates nephritis induced by pathogenic antibodies. *Journal of autoimmunity*. 2015;57:42-52.
148. Duffield JS, Tipping PG, Kipari T, Cailhier JF, Clay S, Lang R, et al. Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis. *The American journal of pathology*. 2005;167(5):1207-19.
149. Hill GS, Delahousse M, Nochy D, Rémy P, Mignon F, Méry JP, et al. Predictive power of the second renal biopsy in lupus nephritis: Significance of macrophages. *Kidney international*. 2001;59(1):304-16.
150. Chavele KM, Martinez-Pomares L, Domin J, Pemberton S, Haslam SM, Dell A, et al. Mannose receptor interacts with Fc receptors and is critical for the development of crescentic glomerulonephritis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(5):1469-78.
151. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nature reviews Nephrology*. 2014;10(9):493-503.
152. Han Y, Ma FY, Tesch GH, Manthey CL, Nikolic-Paterson DJ. Role of macrophages in the fibrotic phase of rat crescentic glomerulonephritis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2013;304(8):F1043-F53.
153. Floege J, Eitner F, Alpers CE. A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(1):12-23.
154. Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Yamada T, Imai N, et al. Identification of alternatively activated macrophages in new-onset paediatric and adult immunoglobulin A nephropathy: potential role in mesangial matrix expansion. *Histopathology*. 2011;58(2):198-210.
155. Duffield JS. Macrophages and immunologic inflammation of the kidney. *Seminars in nephrology*. 2010;30(3):234-54.
156. Chen T, Cao Q, Wang Y, Harris DCH. M2 macrophages in kidney disease: biology, therapies, and perspectives. *Kidney international*. 2019;95(4):760-73.
157. Murphy K, Weaver C, Seidler L. *Janeway Immunologie*, Kapitel 7. 9. Auflage ed: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
158. Samelson LE, Harford JB, Klausner RD. Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell*. 1985;43(1):223-31.
159. Kuhns MS, Davis MM. TCR Signaling Emerges from the Sum of Many Parts. *Frontiers in immunology*. 2012;3:159.
160. Actor JK. Chapter 4 - T Lymphocytes: Ringleaders of Adaptive Immune Function. In: Actor JK, editor. *Introductory Immunology*. Amsterdam: Academic Press; 2014. p. 42-58.
161. Vignali DA, Doyle C, Kinch MS, Shin J, Strominger JL. Interactions of CD4 with MHC class II molecules, T cell receptors and p56lck. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1993;342(1299):13-24.
162. Ward-Kavanagh LK, Lin WW, Sedy JR, Ware CF. The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity*. 2016;44(5):1005-19.
163. Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(12):939-51.
164. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunological reviews*. 2009;229(1):5-11.
165. Yokosuka T, Saito T. Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunological reviews*. 2009;229(1):27-40.

166. Walker LS, Sansom DM. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends in immunology*. 2015;36(2):63-70.
167. Li J, Yin Q, Wu H. Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. *Advances in immunology*. 2013;119:135-53.
168. Ware CF. The TNF receptor super family in immune regulation. *Immunological reviews*. 2011;244(1):5-8.
169. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(4):271-85.
170. Croft M. The TNF family in T cell differentiation and function--unanswered questions and future directions. *Seminars in immunology*. 2014;26(3):183-90.
171. Sun S-C. The non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in immunity and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(9):545-58.
172. So T, Nagashima H, Ishii N. TNF Receptor-Associated Factor (TRAF) Signaling Network in CD4(+) T-Lymphocytes. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2015;236(2):139-54.
173. Croft M, So T, Duan W, Soroosh P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunological reviews*. 2009;229(1):173-91.
174. Webb GJ, Hirschfield GM, Lane PJ. OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2016;50(3):312-32.
175. Takasawa N, Ishii N, Higashimura N, Murata K, Tanaka Y, Nakamura M, et al. Expression of gp34 (OX40 ligand) and OX40 on human T cell clones. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 2001;92(4):377-82.
176. Compaan DM, Hymowitz SG. The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex. *Structure (London, England : 1993)*. 2006;14(8):1321-30.
177. Redmond WL, Ruby CE, Weinberg AD. The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival. *Critical reviews in immunology*. 2009;29(3):187-201.
178. Willoughby J, Griffiths J, Tews I, Cragg MS. OX40: Structure and function - What questions remain? *Molecular immunology*. 2017;83:13-22.
179. Song J, Salek-Ardakani S, Rogers PR, Cheng M, Van Parijs L, Croft M. The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity. *Nature immunology*. 2004;5(2):150-8.
180. Song J, Salek-Ardakani S, So T, Croft M. The kinases aurora B and mTOR regulate the G1-S cell cycle progression of T lymphocytes. *Nature immunology*. 2007;8(1):64-73.
181. So T, Choi H, Croft M. OX40 complexes with phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B (PKB) to augment TCR-dependent PKB signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(6):3547-55.
182. So T, Song J, Sugie K, Altman A, Croft M. Signals from OX40 regulate nuclear factor of activated T cells c1 and T cell helper 2 lineage commitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(10):3740-5.
183. Hogan PG. Calcium-NFAT transcriptional signalling in T cell activation and T cell exhaustion. *Cell calcium*. 2017;63:66-9.
184. Gramaglia I, Weinberg AD, Lemon M, Croft M. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;161(12):6510-7.
185. Soroosh P, Ine S, Sugamura K, Ishii N. OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(10):5975-87.
186. Imura A, Hori T, Imada K, Ishikawa T, Tanaka Y, Maeda M, et al. The human OX40/gp34 system directly mediates adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(5):2185-95.

187. Obermeier F, Schwarz H, Dunger N, Strauch UG, Grunwald N, Schölmerich J, et al. OX40/OX40L interaction induces the expression of CXCR5 and contributes to chronic colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *European journal of immunology*. 2003;33(12):3265-74.
188. Prell RA, Evans DE, Thalhoffer C, Shi T, Funatake C, Weinberg AD. OX40-mediated memory T cell generation is TNF receptor-associated factor 2 dependent. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;171(11):5997-6005.
189. Soroosh P, Ine S, Sugamura K, Ishii N. Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;179(8):5014-23.
190. Gramaglia I, Jember A, Pippig SD, Weinberg AD, Killeen N, Croft M. The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;165(6):3043-50.
191. Salek-Ardakani S, Moutaftsi M, Crotty S, Sette A, Croft M. OX40 drives protective vaccinia virus-specific CD8 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(11):7969-76.
192. Song A, Tang X, Harms KM, Croft M. OX40 and Bcl-x<sub>L</sub> Promote the Persistence of CD8 T Cells to Recall Tumor-Associated Antigen. *The Journal of Immunology*. 2005;175(6):3534-41.
193. Bansal-Pakala P, Halteman BS, Cheng MH, Croft M. Costimulation of CD8 T cell responses by OX40. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;172(8):4821-5.
194. Vu MD, Xiao X, Gao W, Degauque N, Chen M, Kroemer A, et al. OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs. *Blood*. 2007;110(7):2501-10.
195. King CG, Kobayashi T, Cejas PJ, Kim T, Yoon K, Kim GK, et al. TRAF6 is a T cell-intrinsic negative regulator required for the maintenance of immune homeostasis. *Nature medicine*. 2006;12(9):1088-92.
196. Ndhlovu LC, Ishii N, Murata K, Sato T, Sugamura K. Critical involvement of OX40 ligand signals in the T cell priming events during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;167(5):2991-9.
197. Nohara C, Akiba H, Nakajima A, Inoue A, Koh CS, Ohshima H, et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: a critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;166(3):2108-15.
198. Weinberg AD, Vella AT, Croft M. OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Seminars in immunology*. 1998;10(6):471-80.
199. Totsuka T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Yamazaki M, Akiba H, et al. Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF-alpha MAbs in a murine model of chronic colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2003;284(4):G595-603.
200. Wu X, Rosenbaum JT, Adamus G, Zhang GL, Duan J, Weinberg A, et al. Activation of OX40 prolongs and exacerbates autoimmune experimental uveitis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(11):8520-6.
201. Ruth AJ, Oudin V, Odobasic D, Kitching AR, Holdsworth SR. OX40 ligand is inhibitory during the effector phase of crescentic glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2018;34(3):429-41.
202. Odobasic D, Kitching AR, Tipping PG, Holdsworth SR. CD80 and CD86 costimulatory molecules regulate crescentic glomerulonephritis by different mechanisms. *Kidney international*. 2005;68(2):584-94.
203. Ruby CE, Yates MA, Hirschhorn-Cymerman D, Chlebeck P, Wolchok JD, Houghton AN, et al. Cutting Edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if

- the cytokine milieu is right. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2009;183(8):4853-7.
204. Gaspar F, Withers D, Saini M, Bekiaris V, McConnell FM, White A, et al. Abrogation of CD30 and OX40 signals prevents autoimmune disease in FoxP3-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(8):1579-84.
205. Aten J, Roos A, Claessen N, Schilder-Tol EJ, Ten Berge IJ, Weening JJ. Strong and selective glomerular localization of CD134 ligand and TNF receptor-1 in proliferative lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2000;11(8):1426-38.
206. Kaur D, Brightling C. OX40/OX40 ligand interactions in T-cell regulation and asthma. *Chest*. 2012;141(2):494-9.
207. Boleto G, Allanore Y, Avouac J. Targeting Costimulatory Pathways in Systemic Sclerosis. *Frontiers in immunology*. 2018;9(2998).
208. Elhai M, Avouac J, Hoffmann-Vold AM, Ruzehaji N, Amiar O, Ruiz B, et al. OX40L blockade protects against inflammation-driven fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(27):E3901-10.
209. Cunninghame Graham DS, Graham RR, Manku H, Wong AK, Whittaker JC, Gaffney PM, et al. Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*. 2008;40(1):83-9.
210. Bossini-Castillo L, Broen JC, Simeon CP, Beretta L, Vonk MC, Ortego-Centeno N, et al. A replication study confirms the association of TNFSF4 (OX40L) polymorphisms with systemic sclerosis in a large European cohort. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(4):638-41.
211. Dolff S, Quandt D, Wilde B, Feldkamp T, Hua F, Cai X, et al. Increased expression of costimulatory markers CD134 and CD80 on interleukin-17 producing T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(4):R150.
212. Farres MN, Al-Zifzaf DS, Aly AA, Abd Raboh NM. OX40/OX40L in systemic lupus erythematosus: association with disease activity and lupus nephritis. *Ann Saudi Med*. 2011;31(1):29-34.
213. Byun M, Ma CS, Akcay A, Pedergnana V, Palendira U, Myoung J, et al. Inherited human OX40 deficiency underlying classic Kaposi sarcoma of childhood. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(9):1743-59.
214. Sahin G, Palanduz A, Aydogan G, Cassar O, Ertem AU, Telhan L, et al. Classic Kaposi sarcoma in 3 unrelated Turkish children born to consanguineous kindreds. *Pediatrics*. 2010;125(3):e704-8.
215. Gauvreau GM, Boulet LP, Cockcroft DW, FitzGerald JM, Mayers I, Carlsten C, et al. OX40L blockade and allergen-induced airway responses in subjects with mild asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2014;44(1):29-37.
216. Wolff G. Phase 2b Study to Evaluate the Efficacy and Safety of GBR 830 in Adults With Moderate to Severe Atopic Dermatitis (NCT03568162) 2018 [05.01.2020]. Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03568162>.
217. Guttman-Yassky E, Pavel AB, Zhou L, Estrada YD, Zhang N, Xu H, et al. GBR 830, an anti-OX40, improves skin gene signatures and clinical scores in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2019;144(2):482-93.e7.
218. Strout V. Study of a Monoclonal Antibody KHK4083 in Moderate Ulcerative Colitis (NCT02647866) 2016 [05.01.2020]. Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02647866>.
219. So T, Ishii N. The TNF-TNFR Family of Co-signal Molecules. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019;1189:53-84.

220. So T, Croft M. Regulation of PI-3-Kinase and Akt Signaling in T Lymphocytes and Other Cells by TNFR Family Molecules. *Frontiers in immunology*. 2013;4:139.
221. Schneider C, Hubinger G. Pleiotropic signal transduction mediated by human CD30: a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family. *Leukemia & lymphoma*. 2002;43(7):1355-66.
222. Chiarle R, Podda A, Prolla G, Gong J, Thorbecke GJ, Inghirami G. CD30 in normal and neoplastic cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 1999;90(2):157-64.
223. Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annual review of immunology*. 2005;23:23-68.
224. Romagnani S, Del Prete G, Maggi E, Chilosi M, Caligaris-Cappio F, Pizzolo G. CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *Journal of leukocyte biology*. 1995;57(5):726-30.
225. Sun X, Yamada H, Shibata K, Muta H, Tani K, Podack ER, et al. CD30 Ligand/CD30 Plays a Critical Role in Th17 Differentiation in Mice. *The Journal of Immunology*. 2010;185(4):2222.
226. Shinoda K, Sun X, Oyamada A, Yamada H, Muta H, Podack ER, et al. CD30 ligand is a new therapeutic target for central nervous system autoimmunity. *Journal of autoimmunity*. 2015;57:14-23.
227. Nishimura H, Yajima T, Muta H, Podack ER, Tani K, Yoshikai Y. A Novel Role of CD30/CD30 Ligand Signaling in the Generation of Long-Lived Memory CD8<sup>+</sup> T Cells. *The Journal of Immunology*. 2005;175(7):4627-34.
228. Dai Z, Li Q, Wang Y, Gao G, Diggs LS, Tellides G, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress allograft rejection mediated by memory CD8<sup>+</sup> T cells via a CD30-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(2):310-7.
229. Yue D, You Y, Zhang X, Wang B, Wang X, Qi R, et al. CD30L/CD30 protects against psoriasiform skin inflammation by suppressing Th17-related cytokine production by V $\gamma$ 4(+)  $\gamma$ delta T cells. *Journal of autoimmunity*. 2019;101:70-85.
230. Guo Y, Sun X, Shibata K, Yamada H, Muta H, Podack ER, et al. CD30 is required for activation of a unique subset of interleukin-17A-producing  $\gamma$  $\delta$  T cells in innate immunity against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infection. *Infect Immun*. 2013;81(10):3923-34.
231. Kennedy MK, Willis CR, Armitage RJ. Deciphering CD30 ligand biology and its role in humoral immunity. *Immunology*. 2006;118(2):143-52.
232. Polte T, Behrendt AK, Hansen G. Direct evidence for a critical role of CD30 in the development of allergic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(4):942-8.
233. Siegmund T, Armitage N, Wicker LS, Peterson LB, Todd JA, Lyons PA. Analysis of the mouse CD30 gene: a candidate for the NOD mouse type 1 diabetes locus Idd9.2. *Diabetes*. 2000;49(9):1612-6.
234. Chakrabarty S, Nagata M, Yasuda H, Wen L, Nakayama M, Chowdhury SA, et al. Critical roles of CD30/CD30L interactions in murine autoimmune diabetes. *Clinical and experimental immunology*. 2003;133(3):318-25.
235. Schwab U, Stein H, Gerdes J, Lemke H, Kirchner H, Schaadt M, et al. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature*. 1982;299(5878):65-7.
236. van der Weyden CA, Pileri SA, Feldman AL, Whisstock J, Prince HM. Understanding CD30 biology and therapeutic targeting: a historical perspective providing insight into future directions. *Blood cancer journal*. 2017;7(9):e603.
237. Nadali G, Vinante F, Ambrosetti A, Todeschini G, Veneri D, Zanotti R, et al. Serum levels of soluble CD30 are elevated in the majority of untreated patients with Hodgkin's disease and correlate with clinical features and prognosis. *Journal of clinical*

- oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1994;12(4):793-7.
238. Zanotti R, Trolese A, Ambrosetti A, Nadali G, Visco C, Ricetti MM, et al. Serum levels of soluble CD30 improve International Prognostic Score in predicting the outcome of advanced Hodgkin's lymphoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2002;13(12):1908-14.
239. Yi JH, Kim SJ, Kim WS. Brentuximab vedotin: clinical updates and practical guidance. *Blood Res*. 2017;52(4):243-53.
240. Cabrera CM, Urrea JM, Carreno A, Zamorano J. Differential expression of CD30 on CD3 T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Scandinavian journal of immunology*. 2013;78(3):306-12.
241. Khanna D. Brentuximab Vedotin for Systemic Sclerosis (NCT03222492) 2017 [01.01.2020]. Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03222492>.
242. Sesterhenn S. Dose Ranging Study of Brentuximab Vedotin in Adults With Lupus (NCT02533570) 2015 [01.01.2020]. Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02533570>.
243. Chen Y-BA. Phase I Trial of Brentuximab Vedotin for Refractory Chronic Graft-vs.-Host Disease (GVHD) (NCT01940796) 2013 [01.01.2020]. Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01940796>.
244. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Ueda N. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- $\alpha$  agents - Comparison among therapeutic TNF- $\alpha$  antagonists. *Cytokine*. 2018;101:56-63.
245. Smolen JS, Goncalves J, Quinn M, Benedetti F, Lee JY. Era of biosimilars in rheumatology: reshaping the healthcare environment. *RMD Open*. 2019;5(1):e000900-e.
246. Udalova I, Monaco C, Nanchahal J, Feldmann M. Anti-TNF Therapy. *Microbiol Spectr*. 2016;4(4):10.1128/microbiolspec.MCHD-0022-2015.
247. Sator P. Safety and tolerability of adalimumab for the treatment of psoriasis: a review summarizing 15 years of real-life experience. *Ther Adv Chronic Dis*. 2018;9(8):147-58.
248. Abrams JR, Lebwohl MG, Guzzo CA, Jegasothy BV, Goldfarb MT, Goffe BS, et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(9):1243-52.
249. Langford CA, Cuthbertson D, Ytterberg SR, Khalidi N, Monach PA, Carette S, et al. A Randomized, Double-Blind Trial of Abatacept (CTLA-4Ig) for the Treatment of Giant Cell Arteritis. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(4):837-45.
250. Genovese MC, Becker J-C, Schiff M, Luggen M, Sherrer Y, Kremer J, et al. Abatacept for Rheumatoid Arthritis Refractory to Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Inhibition. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(11):1114-23.
251. Vincenti F, Larsen CP, Alberu J, Bresnahan B, Garcia VD, Kothari J, et al. Three-year outcomes from BENEFIT, a randomized, active-controlled, parallel-group study in adult kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2012;12(1):210-7.
252. Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, Rice K, Steinberg S, Gaite L, et al. Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 2016;374(4):333-43.
253. Khoury SJ, Rochon J, Ding L, Byron M, Ryker K, Tosta P, et al. ACCLAIM: A randomized trial of abatacept (CTLA4-Ig) for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017;23(5):686-95.
254. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity*. 2016;44(5):973-88.
255. Yeung MY, Grimmig T, Sayegh MH. Costimulation Blockade in Transplantation. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019;1189:267-312.

256. Law C-L, Grewal IS. Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: the opportunities and challenges. *Advances in experimental medicine and biology*. 2009;647:8-36.
257. Anil Kumar MS, Papp K, Tainaka R, Valluri U, Wang X, Zhu T, et al. Randomized, controlled study of bleselumab (ASKP1240) pharmacokinetics and safety in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Biopharm Drug Dispos*. 2018;39(5):245-55.
258. Harland RC, Klintmalm G, Jensik S, Yang H, Bromberg J, Holman J, et al. Efficacy and safety of bleselumab in kidney transplant recipients: A phase 2, randomized, open-label, noninferiority study. *Am J Transplant*. 2020;20(1):159-71.
259. Study the Efficacy and Safety of VAY736 and CFZ533 in SLE Patients (NCT03656562) 2018 [05.01.2020]. Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03656562>.
260. Safety, Pharmacokinetics and Preliminary Efficacy Study of CFZ533 in Patients With Lupus Nephritis (NCT03610516) 2018 [05.01.2020]. Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03610516>.
261. Murphy K, Weaver C, Seidler L. *Janeway Immunologie, Kapitel 8. 9. Auflage ed: Springer Berlin Heidelberg*; 2018.
262. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*. 1992;68(5):869-77.
263. Gaspal FMC, Kim M-Y, McConnell FM, Raykundalia C, Bekiaris V, Lane PJL. Mice Deficient in OX40 and CD30 Signals Lack Memory Antibody Responses because of Deficient CD4 T Cell Memory. *The Journal of Immunology*. 2005;174(7):3891.
264. Au - Rush BM, Au - Small SA, Au - Stolz DB, Au - Tan RJ. An Efficient Sieving Method to Isolate Intact Glomeruli from Adult Rat Kidney. *JoVE*. 2018(141):e58162.
265. Spiro RG. Studies on the renal glomerular basement membrane. Preparation and chemical composition. *The Journal of biological chemistry*. 1967;242(8):1915-22.
266. Assmann KJ, Tangelder MM, Lange WP, Tadema TM, Koene RA. Membranous glomerulonephritis in the mouse. *Kidney international*. 1983;24(3):303-12.
267. Meezan E, Hjelle JT, Brendel K, Carlson EC. A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. *Life Sci*. 1975;17(11):1721-32.
268. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach G. MACS Cell Separation (Broschüre)19.01.2020 [cited 2020. Available from: [https://www.miltenyibiotec.com/\\_Resources/Persistent/b5349effdd595b72195e588aff033be3e24706bd/IM0020021.pdf](https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/b5349effdd595b72195e588aff033be3e24706bd/IM0020021.pdf).
269. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach G. CD4+ T Cell Isolation Kit, mouse (Datenblatt)19.01.2020 [cited 2020. Available from: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/macscellseparation/cellseparationreagents/microbeadsandisolationkits/tcells/cd4tcellisolationkitmouse.html#130-104-454>.
270. Rosenkranz AR, Mendrick DL, Cotran RS, Mayadas TN. P-selectin deficiency exacerbates experimental glomerulonephritis: a protective role for endothelial P-selectin in inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(5):649-59.
271. Larkins NG, Teixeira-Pinto A, Craig JC. A narrative review of proteinuria and albuminuria as clinical biomarkers in children. *J Paediatr Child Health*. 2019;55(2):136-42.
272. Bakker AJ. Detection of microalbuminuria. Receiver operating characteristic curve analysis favors albumin-to-creatinine ratio over albumin concentration. *Diabetes Care*. 1999;22(2):307-13.
273. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie: Springer Berlin Heidelberg*; 2014.

274. Stellmach B. Bestimmungsmethoden Enzyme: für Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik, Biochemie, Biologie, Medizin: Springer-Verlag; 2013.
275. Kortüm G. Kolorimetrie und Spektralphotometrie: eine Anleitung zur Ausführung von Absorptions-, Fluoreszenz- und Trübungsmessungen an Lösungen: Springer-Verlag; 1942.
276. Spencer K. Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine. *Annals of clinical biochemistry*. 1986;23 ( Pt 1):1-25.
277. Pundir CS, Jakhar S, Narwal V. Determination of urea with special emphasis on biosensors: A review. *Biosens Bioelectron*. 2019;123:36-50.
278. Kraft W, Dürr UM. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin: Schattauer Verlag; 2013.
279. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. Physiologie. Stuttgart Georg Thieme Verlag; 2018.
280. Cormack DH. Essential histology. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
281. Agarwal SK, Sethi S, Dinda AK. Basics of kidney biopsy: A nephrologist's perspective. *Indian J Nephrol*. 2013;23(4):243-52.
282. Murphy K, Weaver C, Seidler L. Janeway Immunologie, Kapitel 17. 9. Auflage ed: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
283. Gene: CD68 molecule [Internet]. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. [cited 31.01.2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/968>.
284. Lee PY, Wang J-X, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *Journal of leukocyte biology*. 2013;94(4):585-94.
285. Bruhn KW, Dekitani K, Nielsen TB, Pantapalangkoor P, Spellberg B. Ly6G-mediated depletion of neutrophils is dependent on macrophages. *Results Immunol*. 2015;6:5-7.
286. Sitrin J, Suto E, Wuster A, Eastham-Anderson J, Kim JM, Austin CD, et al. The Ox40/Ox40 Ligand Pathway Promotes Pathogenic Th Cell Responses, Plasmablast Accumulation, and Lupus Nephritis in NZB/W F1 Mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2017;199(4):1238-49.
287. Nawaf MG, Ulvmar MH, Withers DR, McConnell FM, Gaspal FM, Webb GJ, et al. Concurrent OX40 and CD30 Ligand Blockade Abrogates the CD4-Driven Autoimmunity Associated with CTLA4 and PD1 Blockade while Preserving Excellent Anti-CD8 Tumor Immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2017;199(3):974-81.