

Diplomarbeit

**Die Rolle von IL-33/ST2 in der experimentellen
Glomerulonephritis**

eingereicht von

Chiara Marie Krallinger

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Drⁱⁿ. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Universitätsklinikum für Innere Medizin LKH Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Nephrologie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med.univ. Kathrin Eller

und

Dr.ⁱⁿ med.univ. Katharina Artinger, PhD

Graz, am 03.06.2023

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 03.06.2023

Chiara Marie Krallinger eh.

Danksagungen

Mein Dank gebührt meinen beiden Betreuerinnen Katharina Artinger und Kathrin Eller, die mich jederzeit mit wertvollem Rat und konstruktiver Kritik tatkräftig unterstützten. Ebenso möchte ich Corinna Schabhüttl danken, für ihre labortechnische Expertise und liebe Hilfe.

Danke an das ganze Laborteam für eure Freundlichkeit und euren Rat.

Danke an meine Familie, die mir das Studium an sich ermöglicht hat und mir immer zur Seite steht. Danke an Papa insbesondere, mich anzustecken mit der fundamentalen Begeisterung für die Medizin.

Danke an meine Freundinnen Anni, Maike, Clair und Raphi.

Danke an meinen Freund Tobi für alles und noch viel mehr.

Zusammenfassung

Einleitung: Das nukleäre Alarmin Interleukin-33 wird als Antwort auf schädigende Stimuli vorrangig von Zellen mit Barrierefunktion sezerniert. Über den hauptsächlich von TH2-Zellen exprimierten Transmembranrezeptor ST2 vermittelt IL-33 eine Typ-2-Immunantwort und immun-regulatorische Effekte. Für die rapid-progressive Glomerulonephritis, welche sich durch einen klinisch schweren Verlauf und nebenwirkungsreiche Therapien auszeichnet, liegen derzeit wenige Daten zur Rolle der IL-33/ST2 Achse vor. Daher wurde im Rahmen dieser Studie die Expression und Funktion von ST2 im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis (NTS), einem T-Zell vermittelten Mausmodell der rapid-progressiven Glomerulonephritis, untersucht.

Methoden: Männliche Wildtyp (WT) Mäuse wurden subkutan mit Kaninchen IgG in komplettem Freund-Adjuvans immunisiert. Drei Tage danach wurde die NTS induziert, indem ein nephrotoxisches Kaninchen anti-Maus Serum intravenös injiziert wurde, welches Antikörper gegen die murine glomeruläre Basalmembran enthält. Gesunde WT Mäuse dienten als Kontrollen. In beiden Gruppen wurde die ST2 Expression auf klassischen und nicht klassischen Monozyten, neutrophilen Granulozyten, B-, CD4+T-, CD8+T-, NK-, iNKT-, iNKT1-, iNKT2- und iNKT17-Zellen sowie T_{reg} in Milz und Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert. Weiters wurde die NTS in ST2 knockout (St2^{-/-}) Mäusen auf C57BL/6J Hintergrund und WT Mäusen induziert. Am Tag 14 wurde in beiden Gruppen die Albuminurie, die humorale Immunantwort, der histologische glomeruläre Schaden und die in die Niere infiltrierenden Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, sowie CD4+T- und CD8+T-Zellen immunhistochemisch analysiert. NK-, iNKT-, iNKT1-, iNKT2-, iNKT17-, CD4+T- und CD8+T-Zellen wurden in Milz und Lymphknoten durchflusszytometrisch evaluiert.

Ergebnisse: In nephritischen WT Mäusen zeigte sich die ST2 Expression auf klassischen Monozyten und nicht klassischen Monozyten in der Milz im Vergleich zu gesunden WT Mäusen signifikant vermindert. Signifikant erhöht zeigte sich der Anteil ST2+B-Zellen an der B-Zell Population in der Milz nephritischer Mäuse, wengleich die ST2 Expression der Zellen signifikant verringert war. Bei signifikant erhöhtem Anteil ST2+NK-Zellen in der Milz nephritischer Mäuse fand sich ebenfalls ein Trend zu höherer medianer Fluoreszenzintensität von ST2 dieser Zellen in nephritischen Mäusen. Die Albuminurie in nephritischen St2^{-/-} Mäusen zeigte sich im Vergleich zu WT Mäusen verringert, der PAS-Score war ohne signifikanten Unterschied. Die in die Niere infiltrierenden Zellen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Im Vergleich zu nephritischen WT Mäusen zeigten nephritische St2^{-/-} Mäuse einen signifikant erhöhten Anteil an NK-Zellen in der Milz, sowie eine signifikant gesteigerte B-Zell Antwort.

Conclusio: Die Expression des IL-33 Rezeptors ST2 ist in der NTS auf Monozyten, NK-Zellen und B-Zellen reguliert. Die IL-33/ST2 Achse nimmt eine pathogene Rolle in der NTS ein. Dem Trend zu verringerter Albuminurie in nephritischen St2^{-/-}Mäusen steht ein erhöhter Prozentsatz an NK-Zellen in der Milz und eine gesteigerte humorale Antwort gegenüber. Daher werden weitere Studien benötigt, um die Funktion von ST2+NK-Zellen und damit die komplexen, zum Teil regulatorischen und zum Teil pathogenen Mechanismen der IL-33/ST2 Achse in der NTS zu untersuchen.

Abstract

Introduction: The nuclear alarmin interleukin-33 is secreted in response to damaging stimuli primarily by cells with barrier function. Mainly expressed by TH2 cells, IL-33 mediates a type 2 immune response and immune-regulatory effects via the transmembrane receptor ST2. Data on the role of the IL-33/ST2 axis in rapid progressive glomerulonephritis, which is characterized by a clinically severe course and therapies with many side effects, is currently insufficient. Therefore, we investigated the role of ST2 expression and function in the model of nephrotoxic serum nephritis (NTS), a T cell mediated mouse model of rapid progressive glomerulonephritis.

Methods: Male Wildtype (WT) mice were immunized with rabbit IgG in complete Freund's Adjuvant. Three days later, NTS was induced by intravenously injecting a nephrotoxic rabbit anti-mouse serum containing antibodies against murine glomerular basement membrane. Healthy WT mice served as controls. Flow cytometry was used to analyze ST2 expression on classical and non-classical monocytes, neutrophil granulocytes, B, CD4+T, CD8+T, NK, iNKT, iNKT1, iNKT2 and iNKT17 cells and T_{reg} in spleen and lymph nodes. In another set of experiments, NTS was induced in WT and ST2 knockout (St2^{-/-}) mice. At day 14, albuminuria, humoral immune response and histological glomerular damage were evaluated. Further, cells infiltrating the kidney, those being macrophages, neutrophil granulocytes, CD4+T and CD8+T cells, were analyzed by immunohistochemistry in both groups. NK, iNKT, iNKT1, iNKT2, iNKT17, CD4+T and CD8+T cells were analyzed in cells from spleen and lymph nodes by flow cytometry.

Results: In nephritic WT mice, ST2 expression was significantly decreased in classical monocytes and non-classical monocytes in the spleen compared to healthy WT mice. A significantly increased percentage of ST2+B cells was found in the B cell population of nephritic mice, although ST2 expression of the cells was significantly decreased. Percentages of ST2+ NK cells were significantly increased with a trend to increased ST2 median fluorescence intensity in nephritic WT mice. Albuminuria in St2^{-/-} mice was decreased, however PAS scores showed no significant difference between the two groups. Cells infiltrating into the kidney showed no significant difference between nephritic WT and St2^{-/-} mice. Compared to nephritic WT mice, we found a significantly increased proportion of NK cells in the spleen in nephritic St2^{-/-} mice, as well as a significantly increased B cell response.

Conclusion: ST2 expression is regulated on monocytes, NK cells and B cells over the time course of NTS. The IL-33/ST2 axis has a pathogenic role in NTS. Reduced albuminuria in nephritic St2^{-/-} mice is accompanied by increased percentages of NK cells in the spleen and increased humoral responses. Further studies are therefore needed to investigate the function of ST2+NK cells and thus the manifold regulatory and pathogenic contributions of the IL-33/ST2 axis to experimental kidney disease.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	II
Danksagungen	III
Zusammenfassung	IV
Abstract.....	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungen	IX
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XIII
Formelverzeichnis	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Die menschliche Niere und ihre Funktion.....	1
1.2 Glomerulonephritiden.....	4
1.2.1 Einteilungsmöglichkeiten	5
1.2.1.1 Klinische Einteilung in Nephritisches und Nephrotisches Syndrom	5
1.2.1.2 Pathophysiologie	7
1.2.2 Rapid Progressive Glomerulonephritis.....	9
1.2.2.1 Immunkomplex-GN	11
1.2.2.1.1 IgA-Nephritis	12
1.2.2.1.2 Postinfektiöse GN (Post-Streptokokken-GN).....	14
1.2.2.1.3 Systemischer Lupus Erythematoses mit Nierenbeteiligung.....	15
1.2.2.2 Anti-GBM-GN	17
1.2.2.3 Pauci-immun/ANCA-assoziierte GN.....	18
1.3 Das Immunsystem	20
1.3.1 Das angeborene Immunsystem.....	20
1.3.1.1 Entzündungsmediatoren	21
1.3.1.2 Granulozyten	22
1.3.1.3 Monozyten.....	23
1.3.1.4 Natürliche Killerzellen	24
1.3.1.5 Immanente Lymphoide Zellen	25

1.3.1.6	Humorale Bestandteile	25
1.3.2	Das adaptive Immunsystem.....	26
1.3.2.1	T-Lymphozyten.....	26
1.3.2.1.1	Der TCR.....	27
1.3.2.1.2	MHC-Moleküle.....	28
1.3.2.1.3	Die Aktivierung von T-Lymphozyten	28
1.3.2.1.4	Subklassen der T-Helferzellen.....	29
1.3.2.2	B-Lymphozyten.....	31
1.3.2.2.1	Antikörper.....	32
1.4	Das murine Modell der nephrotoxischen Serumnephritis	33
1.4.1	Funktion des angeborenen Immunsystems in der NTS.....	33
1.4.2	Funktion der T-Zell-Subtypen in der NTS	34
1.5	IL-33/ST2	35
1.5.1	Die Physiologie der IL-33/ST2 Achse.....	35
1.5.2	IL-33/ST2 in der Lunge.....	38
1.5.3	IL-33/ST2 im Herzen.....	39
1.5.4	IL-33/ST2 in der Leber.....	39
1.5.5	IL-33/ST2 in der Niere	40
1.5.5.1	Lokalisation IL-33 produzierender Zellen und des ST2-Rezeptors in der Niere.....	40
1.5.5.2	IL-33 und immanente lymphoide Zellen in der Niere.....	41
1.5.5.3	Daten zu antiinflammatorischer Wirkung.....	42
1.5.5.4	Daten zu proinflammatorischer Wirkung.....	44
1.5.5.5	Vordaten und Hypothese.....	47
2	Material und Methoden	48
2.1	Die Zusammenstellung der Versuchspopulation und Studiendesign	48
2.1.1	DNA-Genotypisierung	48
2.1.2	Genotypisierungs-PCR und Gelelektrophorese.....	49
2.2	Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis.....	52
2.3	Bestimmung des Quotienten aus Albumin und Kreatinin aus Harn.....	52
2.3.1	Albumin-ELISA	53

2.3.2	Kreatinin-Assay	54
2.4	Bestimmung des IgG-Serumspiegels mittels IgG-ELISA.....	55
2.5	Immunhistochemische Färbungen der Niere für CD4, CD8, CD68, Ly6g ...	56
2.6	PAS-Reaktion	58
2.7	Durchflusszytometrie der Milz und der Lymphknoten	59
2.7.1	Herstellen der Suspension und der Lösung und Färbung der Oberflächenantigene	59
2.7.2	Intrazelluläre Färbung von Foxp3 zur Darstellung der T _{reg}	60
2.7.3	Antikörper Panels	61
2.7.4	Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....	63
2.8	Statistik und Darstellung der Ergebnisse.....	64
3	Ergebnisse mit graphischen Darstellungen.....	65
3.1	Regulation der ST2 Expression in der NTS	65
3.1.1	ST2 Expression auf klassischen und nicht klassischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten in der NTS in der Milz.....	65
3.1.2	ST2 Expression auf B-Zellen, CD4+T-Zellen und CD8+T-Zellen in der NTS in Milz und Lymphknoten	69
3.1.3	ST2 Expression auf NK-, iNKT-, iNKT1-, iNKT2- und iNKT17-Zellen in der NTS in der Milz.....	75
3.1.4	ST2 Expression auf T _{reg} in der NTS in Milz und Lymphknoten.....	80
3.2	Verringerte Albuminurie in St2 ^{-/-} Mäusen.....	82
3.3	Histologisch gleich starke glomeruläre Schädigung in WT und St2 ^{-/-} Mäusen.	83
3.4	Gesteigerte B-Zell Antwort in St2 ^{-/-} Mäusen.....	84
3.5	ST2 Defizienz beeinflusst die renale Zellinfiltration nicht	84
3.6	Prozentualer Anteil der NK-Zellen in St2 ^{-/-} Mäusen erhöht.....	87
4	Diskussion	92
5	Literaturverzeichnis	103

Abkürzungen

ACR	Albumin/Kreatinin-Ratio
ANCA	Anti-Neutrophile-Zytoplasmatische Antikörper
pANCA	Perinukleäre ANCA
cANCA	Zytoplasmatische ANCA
APC	Antigen präsentierende Zellen
BCR	B-Zell-Rezeptor
C3	Komplementfaktor 3
CCR6	CC-Chemokin-Rezeptor 6
CD	<i>engl.</i> : Cluster of Differentiation (Unterscheidungsmerkmale)
CXCR3	CXC-Chemokin-Rezeptor 3
DDD	<i>engl.</i> : Dense Deposit Disease
DTH	<i>engl.</i> : Delayed Type Hypersensitivity (Verzögerte Hypersensitivität)
EM	Elektronenmikroskopie
ESRD	<i>engl.</i> : End-stage-renal-disease (Terminale Niereninsuffizienz)
FACS	<i>engl.</i> : Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	Kristallisierbares Fragment
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPF	<i>engl.</i> : High-Power-Field
IF	Immunofluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IK	Immunkomplex
IL	Interleukin
iNKT	Invariante Natürliche Killerzelle
IRI	<i>engl.</i> : Ischaemia-Reperfusion-Injury (Ischämie-Reperfusionsschaden)

KF	Filtrationskoeffizient
LAMP	Lysosomales Membran-assoziiertes Protein
LN	Lupus-Nephritis
LPF	<i>engl.</i> : Low-Power-Field
MAP	<i>engl.</i> : Mitogen-activated Protein
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MHC	Major-Histokompatibilitätskomplex
MIDD	Monoklonale Ig Ablagerungskrankheit
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPGN	Membranproliferative Glomerulonephritis
MPO	Myeloperoxidase
mP	Mikroskopische Polyangiitis
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NET	Extrazelluläre-Neutrophilen-Falle
NF-κB	<i>engl.</i> : Nuclear factor ‘kappa-light-chain-enhancer’ of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NTS	Nephrotoxische Serumnephritis
PAMP	Pathogen-assoziiertes Molekulares Muster
PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion
PGNMID	Proliferative GN mit monoklonalen Ig Ablagerungen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PR3	Proteinase 3
PRR	<i>engl.</i> : Pattern-Recognition-Receptor
RPGN	Rapid Progressive Glomerulonephritis
SEM	Standardfehler
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
sST2	<i>engl.</i> : Soluble (löslicher) Suppressor of Tumorigenicity 2
ST2	<i>engl.</i> : Suppressor of Tumorigenicity 2
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _{FH} -Zellen	Follikuläre T-Helferzellen
TGF-β	<i>engl.</i> : Transforming Growth Factor β
TLR	<i>engl.</i> : Toll-Like-Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor

T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
UUO	Unilaterale Urinale Obstruktion
VH	Variable Domäne der schweren Kette
VL	Variable Domäne der leichten Kette
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makroskopischer Aufbau der Niere.....	1
Abbildung 2: Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere.	2
Abbildung 3: Aufbau eines (A) Nephrons und eines (B) Glomerulus.....	3
Abbildung 4: Das Manifestationsspektrum der Glomerulonephritiden.....	5
Abbildung 5: Die fünf unterschiedenen Primärdiagnosen nach Sethi et. al.	8
Abbildung 6: Leukopoese.....	21
Abbildung 7: Aufbau des T-Zell-Rezeptors.	27
Abbildung 8: Die T-Zell Subtypen.....	31
Abbildung 9: Aufbau des B-Zell-Rezeptors.....	32
Abbildung 10: Beispiele IL-33 produzierender Zellen und ST2 exprimierender Zellen.	37
Abbildung 11: Gelelektrophorese, Gel unter UV-Licht.	51
Abbildung 12: Panel 1 Gatingstrategie.....	66
Abbildung 13: ST2 Expression auf klassischen Monozyten in H und NTS.	67
Abbildung 14: ST2 Expression auf nicht klassischen Monozyten in H und NTS.....	68
Abbildung 15: ST2 Expression auf neutrophilen Granulozyten in H und NTS.	68
Abbildung 16: Panel 2 Gatingstrategie.....	71
Abbildung 17: ST2 Expression auf B-Zellen in H und NTS.	72
Abbildung 18: ST2 Expression auf CD4+T-Zellen in H und NTS.	73
Abbildung 19: ST2 Expression auf CD8+T-Zellen in H und NTS.	74
Abbildung 20: Panel 3 Gatingstrategie.....	77
Abbildung 21: ST2 Expression auf NK-Zellen in H und NTS.	77
Abbildung 22: ST2 Expression auf iNKT-Zellen in H und NTS.	78
Abbildung 23: ST2 Expression auf iNKT1-Zellen in H und NTS.	78
Abbildung 24: ST2 Expression auf iNKT2- und iNKT17-Zellen in H und NTS.....	79
Abbildung 25: Panel 4 Gatingstrategie.....	80
Abbildung 26: ST2 Expression auf T _{reg} in H und NTS.	81
Abbildung 27: Albuminurie in nephritischen WT und St2 ^{-/-} Mäusen.....	82
Abbildung 28: PAS Score nach d14.	83
Abbildung 29: PAS Färbung von Nierenpräparaten.....	83
Abbildung 30: B-Zell Antwort nach d14.	84
Abbildung 31: In die Niere infiltrierende Zellen in nephritischen WT und St2 ^{-/-} Mäusen an d14.	85
Abbildung 32: In die Niere infiltrierende Ly6g+ neutrophile Granulozyten an d14.	85
Abbildung 33: CD4 Färbung von Nierenpräparaten.	86
Abbildung 34: CD68 Färbung von Nierenpräparaten.	86
Abbildung 35: Gatingstrategie der Verteilung der Zellpopulationen in Milz und Lymphknoten bei nephritischen WT und St2 ^{-/-} Mäusen.	87
Abbildung 36: Prozent der NK1.1+ der CD45+CD3- in (A) Lymphknoten und (B) Milz.	88
Abbildung 37: Prozent der Tetramer+ der CD45+CD3+ in (A) Lymphknoten und (B) Milz.....	89
Abbildung 38: Prozent der NK1.1+ der Tetramer+ in (A) Lymphknoten und (B) Milz.	89
Abbildung 39: Prozent der NK1.1- der Tetramer+ in (A) Lymphknoten und (B) Milz.	90
Abbildung 40: Prozent der CD4+CD8- der CD45+ in (A) Lymphknoten und (B) Milz.	90
Abbildung 41: Prozent der CD4-CD8+ der CD45+ in (A) Lymphknoten und (B) Milz.	91

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Gegenüberstellung der Leitsymptome des nephrotischen und nephritischen Syndroms.</i>	7
<i>Tabelle 2: Makrophagen-Score.</i>	58
<i>Tabelle 3: Antikörper Panel 1 für die Analyse ST2-exprimierender Zellen aus der Milz in gesunden und nephritischen WT Mäusen.</i>	61
<i>Tabelle 4: Antikörper Panel 2 für die Analyse ST2-exprimierender Zellen aus Lymphknoten und Milz in gesunden und nephritischen WT Mäusen.</i>	62
<i>Tabelle 5: Antikörper Panel 3 für die Analyse ST2-exprimierender Zellen aus der Milz in gesunden und nephritischen WT Mäusen.</i>	62
<i>Tabelle 6: Antikörper Panel 4 für die Analyse ST2-exprimierender Zellen aus Lymphknoten und Milz in gesunden und nephritischen WT Mäusen.</i>	62
<i>Tabelle 7: Antikörper Panel 5 für die Analyse der Zellen aus Lymphknoten und Milz in nephritischen WT und St2^{-/-} Mäusen.</i>	63

Formelverzeichnis

<i>Formel 1: Effektiver Filtrationsdruck (1)</i>	2
<i>Formel 2: Glomeruläre Filtrationsrate (1)</i>	2
<i>Formel 3: Kreatiningehalt in mg/dl.</i>	55
<i>Formel 4: PAS-Score</i>	59

1 Einleitung

1.1 Die menschliche Niere und ihre Funktion

Paarig angelegt befinden sich die beiden Nieren auf Höhe der oberen Lendenwirbelsäule im Retroperitoneum. Hier sind sie durch ein Fettpolster, Muskeln und die Rippen gut geschützt vor äußeren Einflüssen und erfüllen ihre vielfältigen Funktionen. Eine Niere misst in etwa zwölf cm in der Länge, fünf cm in der Breite und vier cm in der Dicke, ihre Form erinnert an eine Bohne. An der konkav gebogenen medialen Seite jeder Niere befindet sich der Hilus, der die Ein- und Austrittspforte der Arteriae renales, der Venae renales und des Harnleiters ist. Makroskopisch unterscheidet man im Bereich des Parenchyms das innen befindliche Nierenmark und die außen liegende, etwa 1cm breite Nierenrinde. Das Mark besteht aus bis zu 14 Markpyramiden, die mit der als Papille bezeichneten Spitze zum Nierenhilus gerichtet sind. Dort münden sie in die Nierenkelche, die sich zum Nierenbecken vereinigen. Bis hier reicht die Nierenrinde, indem sie die Markpyramiden als Bertini-Säulen umschließt. (1,2)

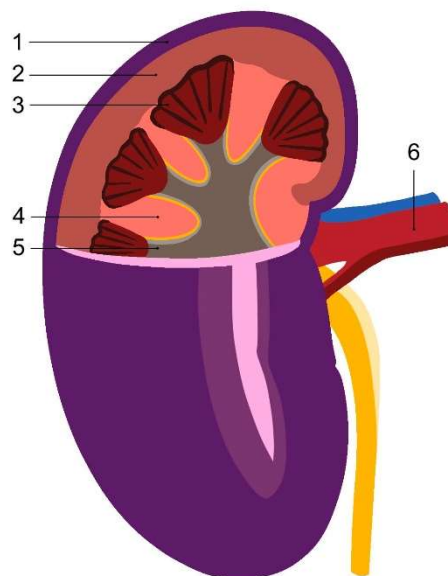


Abbildung 1: Makroskopischer Aufbau der Niere.

Oberes Drittel im Sagittalschnitt eröffnet. Die Nierenkapsel (1) umschließt das Nierenparenchym, welches sich aus Nierenrinde (2) und Nierenmark (4) zusammensetzt. Der gebildete Harn fließt ausgehend von den Markspyramiden (3) in das Nierenbeckenkelchsystem (5). Am Hilus befinden sich A. renalis (rot), die V. renalis (blau) und der Harnleiter (gelb) (6). Modifiziert nach Amboss (3).

Die kleinste Funktionseinheit der Niere wird als Nephron bezeichnet, wovon jede Niere rund eine Million enthält. Aufgebaut aus je einem 200 µm im Durchschnitt messendem Glomerulus und einem Tubulus verantworten die Nephrone die Produktion des Harns. In der Nierenrinde befinden sich die Glomeruli, die auch als Nierenkörperchen bezeichnet werden. Jeder Glomerulus beinhaltet ein Knäuel aus Kapillarschlingen, welche aus der Arteriola

afferens hervorgehen und als Ganzes von der Bowman-Kapsel umgeben sind. An dieses Kapillarnetz schließen sich statt abführender Venen die Arteriolen efferentes an, die in ihrer Gesamtheit wiederum für die arterielle Versorgung des Nierenmarks sorgen. Die beiden Arteriolen bilden den Gefäßstil eines Glomerulus. (1,2,4)

Über ein stufenweise aufgebautes Filtriersystem erzeugt ein Glomerulus aus dem kapillären Blut den Primärharn, der in das Tubulussystem abgeleitet wird. Der Harn fällt als Nebenprodukt bei der Regulierung des Wasserhaushaltes und der Entgiftung an (2). Die Menge an filtriertem Primärharn wird bedingt durch die Unterschiede im hydrostatischen (Δp) sowie onkotischen ($\Delta \pi$) Druck zwischen Kapillarlumen und dem Inneren der Bowman-Kapsel. Durch die Differenz dieser Messgrößen errechnet sich der effektive Filtrationsdruck:

$$P_{eff} = \Delta p - \Delta \pi$$

Formel 1: Effektiver Filtrationsdruck (1).

Dieser reguliert die glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Sie wird aus dem Filtrationskoeffizienten (KF), der Membranen hinsichtlich ihrer Fläche und Durchlässigkeit für Wasser beschreibt, sowie dem effektiven Filtrationsdruck (P_{eff}) berechnet:

$$GFR = KF \times P_{eff} \left[\frac{ml}{min} \right]$$

Formel 2: Glomeruläre Filtrationsrate (1).

Bei einem gesunden Erwachsenen kann von einem mittleren P_{eff} von 5 mmHg und somit einer GFR von 125 ml/min ausgegangen werden. (1)

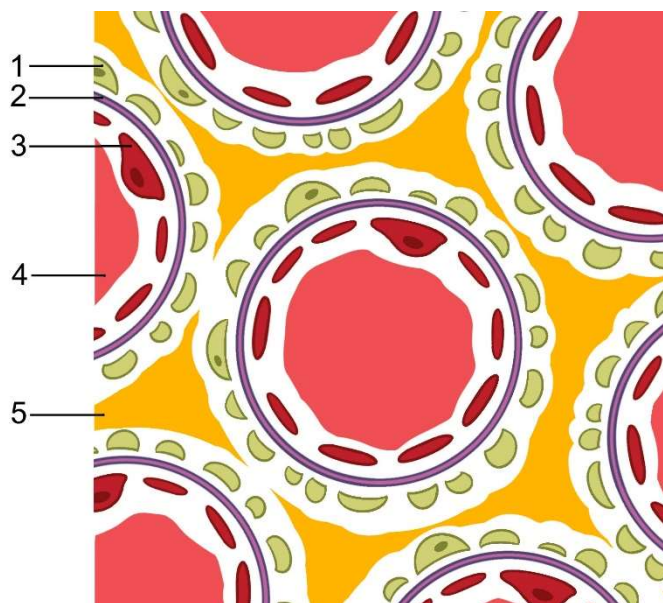


Abbildung 2: Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere.

Podozyten (1) mit ihren Fußfortsätzen bilden die äußere Schicht des Filters, die glomeruläre Basalmembran (GBM) (2) die mittlere und fenestrierte Endothel (3) die innere. In den Kapillaren fließt Blut (4), welches die Filtrationsbarriere zum Teil passiert und als Harn (5) in das Tubulussystem abfließt. Modifiziert nach Amboss (3).

Die proteinarme, wässrige Zusammensetzung des Primärharns wird durch den spezifischen dreistufigen Aufbau des glomerulären Filters bedingt. Die erste Stufe bilden die fenestrierten Endothelzellen der Kapillaren. Mit einer Porengröße von 50-100 nm hindern sie vorwiegend Erythrozyten am Durchtritt in die Bowman-Kapsel. Darauf folgt die größen- und ladungsselektive glomeruläre Basalmembran (GBM) als zweite Stufe. Der bestimmte Aufbau aus Kollagen und negativ geladenen Molekülen hält Strukturen ab 400 kDa Molekülmasse und Negativgeladenes zurück. Die dritte Stufe des Filters, die Podozyten, stellen den limitierenden Faktor der Größenselektivität dar, denn nur Moleküle welche kleiner als 5 nm sind können ihn überwinden. (1,2,4,5)

Die Podozyten bilden gleichzeitig die innere Schicht der Bowman-Kapsel, die sich von der äußeren Schicht abhebt, um einen Spaltraum zu bilden. In diesem sammelt sich der abfiltrierte Primärharn, um in weiterer Folge in das Tubulussystem abzufließen. (1)

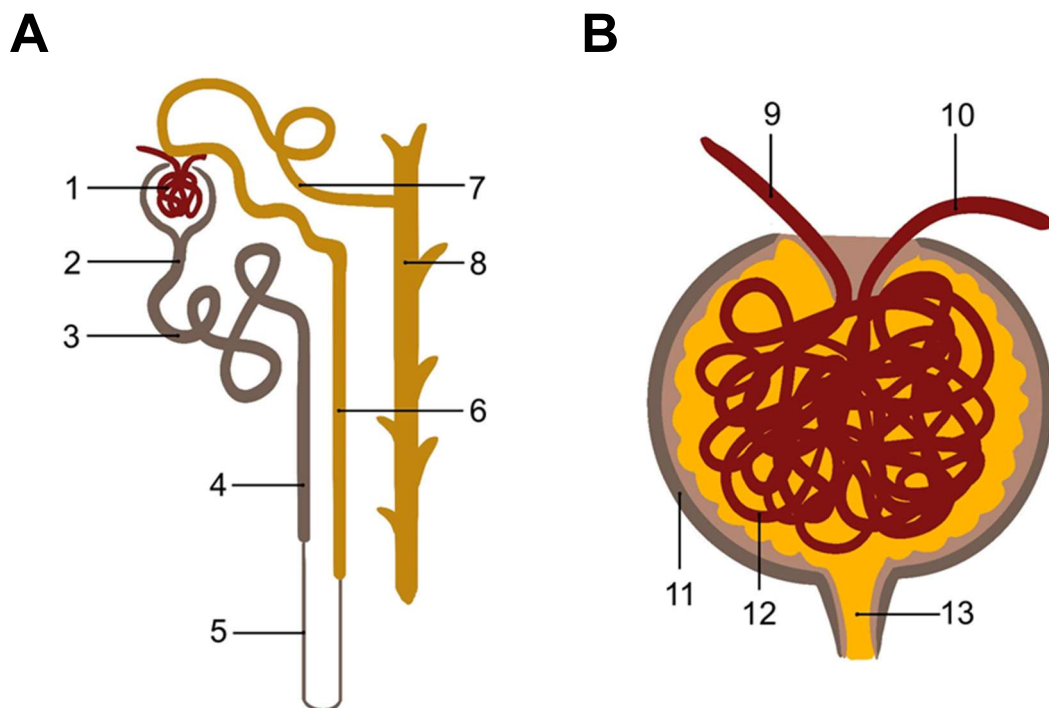


Abbildung 3: Aufbau eines (A) Nephrons und eines (B) Glomerulus. Aus dem Glomerulus (1) fließt der Harn in den proximalen Tubulus (2), dessen Pars convoluta (3) und dessen absteigenden Teil (4) um nach den dünnen Anteilen der Henle'schen Schleife (5) über den dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (6) und den Pars convoluta des distalen Tubulus (7) über das Verbindungsstück in das Sammelrohr (8) zu münden. Aus dem Vas Afferens (9) geht ein von der Bowman-Kapsel (11) umgebenes Kapillarknäuel (12) hervor, das als Vas Efferens (10) den Glomerulus wieder verlässt. Der produzierte Harn (13) wird in das Tubulussystem abgeleitet. Modifiziert nach Amboss (3).

Über komplexe Mechanismen der Sekretion und Rückresorption wird der Primärharn in den Tubuli in Konzentration und Inhaltsstoffen verändert und um den Faktor 180 konzentriert. So wird er zuletzt als stark konzentrierter Sekundärharn zu den unteren Harnwegen weitergeleitet und letztendlich ausgeschieden. Das Tubulussystem gliedert sich in einen

proximalen und distalen Tubulus, welche durch die Henle'sche Schleife miteinander verbunden sind. Die Schleife ist der am weitesten distal gelegene Anteil des Tubulussystems, nachfolgend steigt der Tubulus wieder zum Gefäßstil des Glomerulus auf (Abbildung 3). So entsteht eine Kontaktstelle zwischen den beiden Strukturen, welche als Macula densa bezeichnet wird. Knapp danach mündet der distale Tubulus zusammen mit acht bis zehn anderen Nephronen in ein gemeinsames Sammelrohr. Diese führen den entstandenen Sekundärharn gesammelt in die Nierenkelche ab, wo er über den Ureter in die Harnblase fließt. Durch die parallele Anordnung von Nierenmarksarteriolen und den Henle'schen Schleifen der Tubuli bei entgegengesetzter Flussrichtung können Stoffe sehr effizient im Gegenstromprinzip ausgetauscht werden. (1,4)

All diese Gegebenheiten sind notwendig, um die einwandfreie Funktion der Nieren gewährleisten zu können. Zu den vielfältigen Aufgaben zählen die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, die Sicherstellung des adäquaten Elektrolyt-, Säure-Base- und Wasserhaushaltes, sowie die hormonelle Regulation des Blutdruckes mittels des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Zusätzlich spielt sie eine Rolle in der Versorgung des Körpers mit Vitamin D3 und über Bildung des Hormones Erythropoetin auch der ausreichenden Produktion von Erythrozyten. Zum Stoffwechsel trägt sie mit Gluconeogenese und Proteinabbau bei. Es liegen komplexe Mechanismen zugrunde, deren Basis die zuvor beschriebenen anatomischen Grundlagen sind. Kleinste Veränderungen derer können große Auswirkungen auf den gesamten Körper haben. (1,4)

1.2 Glomerulonephritiden

In mehr als 50% der Fälle von terminaler Niereninsuffizienz liegen eine hypertensive Nephropathie, eine diabetische Nephropathie oder eine primäre Glomerulonephritis (GN) zugrunde. Je nach Quelle trägt die GN den zweit- (19%) oder drittgrößten (10-15%) Anteil dazu bei. GN sind eine heterogene Gruppe entzündlicher Erkrankungen, die vorrangig die Glomeruli betreffen. Außer inflammatorischen Veränderungen in den Glomeruli kommt es je nach Form zusätzlich zu Hyperzellularität, indem sich ansässige Zellen in der Niere vermehren oder Leukozyten einwandern. Unterschieden werden primäre Formen, die im Gegensatz zu sekundären Formen nicht mit einer zugrundeliegenden Systemerkrankung einhergehen. Das Spektrum an möglichen Manifestationen ist breit, es reicht von asymptomatischer Mikrohämaturie über die Ausbildung eines nephrotischen oder nephritischen Syndroms bis hin zu rasch progredienter Niereninsuffizienz. (2,6)

1.2.1 Einteilungsmöglichkeiten

Die bloße Einteilung der GN in primäre und sekundäre Formen wird dem breiten Spektrum an klinischen Manifestationen und ursächlicher pathophysiologischer Mechanismen nicht gerecht (2). Im klinischen Kontext differenziert man mehrere Verlaufsformen, das nephritische sowie das nephrotische Syndrom, die Rapid Progressive GN und die chronisch verlaufende GN (7). Um die Pathophysiologie der verschiedenen Formen zu berücksichtigen, kann nach histopathologischen Merkmalen eingeteilt werden, so lassen sich diese Formen mit Hilfe der Biopsie einer Niere durch Immunhistochemie (IHC) oder Immunfluoreszenzfärbungen einteilen und bilden die Grundlage für eine genaue Diagnosestellung (8). So erarbeiteten Sethi et al. 2016 eine standardisierte histopathologische Klassifizierung der GN nach Pathophysiologie, die fünf Gruppen unterscheidet und im Folgenden erläutert werden soll. (8,9)

1.2.1.1 Klinische Einteilung in Nephritisches und Nephrotisches Syndrom

Klinisch präsentiert sich die GN oft als einer von zwei Symptomkomplexen, dem nephrotischen oder dem nephritischen Syndrom (7). In manchen Fällen gibt es Überlappungen, daher ist diese Einteilung als Spektrum zu verstehen (7). Es unterscheiden sich neben der Klinik auch die Lokalisation sowie die Schwere der Schädigung (2,6).

Das Spektrum der Glomerulonephritiden (GN)

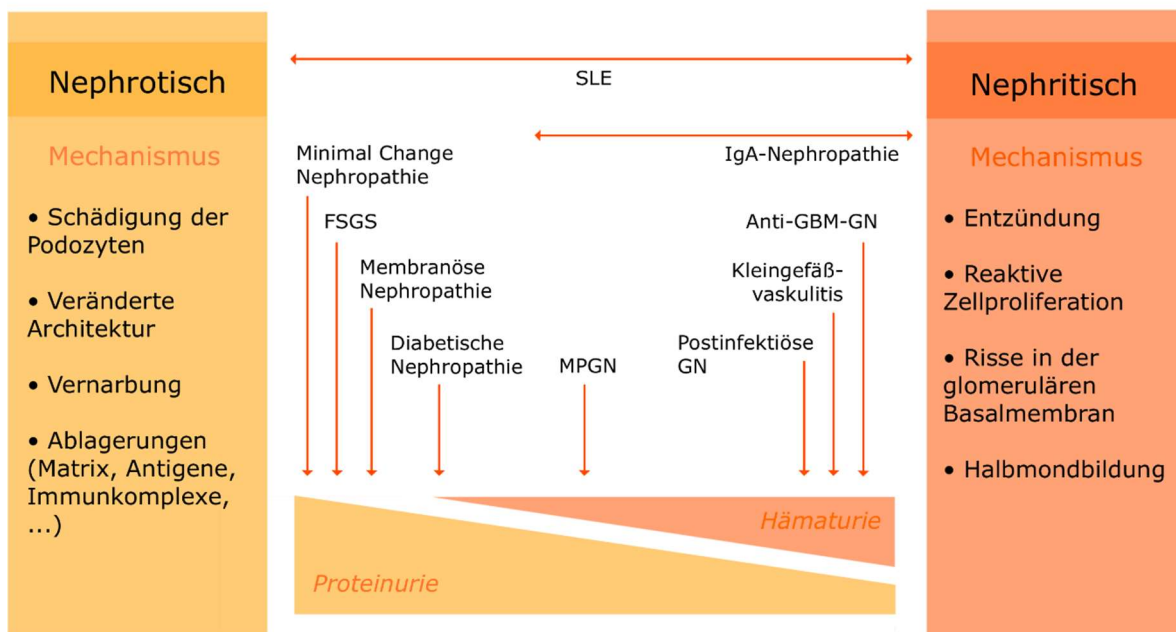


Abbildung 4: Das Manifestationsspektrum der Glomerulonephritiden.

SLE: Systemischer Lupus Erythematoses. FSGS: Fokal Segmentale Glomerulosklerose. MPGN: Membranoproliferative GN. Modifiziert nach <https://edren.org/ren/education/textbook/conditions-that-affect-the-kidney/glomerulonephritis/>

Bei Vorliegen eines nephrotischen Syndroms sind die glomerulären Kapillaren permeabler für Plasmaeiweiß, was zu renalen Eiweißverlusten führt (6,7). Kennzeichnend ist eine Proteinurie $>3,5\text{g}/24\text{h}$ (6). Kompensatorisch dazu synthetisiert die Leber vermehrt Albumin, verliert jedoch die Niere mehr Eiweiß als die Leber neu synthetisieren kann, äußert sich das in Hypalbuminämie ($<3,0\text{g}/\text{dL}$) sowie peripheren Ödemen (6,7). Die Proteinurie betrifft neben Albumin auch Gerinnungsfaktoren (6). Aus vermindertem Antithrombinspiegel im Serum resultiert Hyperkoagulabilität, wodurch es bei jeder/m vierten Patientin/en zu thromboembolischen Ereignissen kommt, die sich prognostisch ungünstig auswirken (6,7). Als nephrotisches Syndrom können sich die Minimal-change-GN, die Fokal Sklerosierende GN, die Membranöse GN, die Membranoproliferative GN und Komplementfaktor 3 (C3) Glomerulopathien manifestieren (6,7,10).

Strukturelle Schäden an der glomerulären Filtrationsbarriere führen zum Leitsymptom des nephritischen Syndroms, der Mikrohämaturie mit Proteinurie $<3\text{g}/24\text{h}$ (5,6). Je nach Ausprägungsgrad liegt Makrohämaturie vor (6). Durch die Proteinurie kommt es wiederum zu Ödemen, die hier betont periorbital auftreten (5). Ist zusätzlich zu diesen Symptomen eine Hypertonie nachweisbar, bezeichnet man die Kombination aus Hämaturie, Ödemen und Hypertonie als Volhard-Trias (6). Einige Patient*innen bilden durch die verringerte GFR eine Oligurie aus (5,7). Im Urin zeigen sich neben einer milden Proteinurie mikroskopisch dysmorphe Erythrozyten und Erythrozytenzylinder (2,5,6). Während die Erythrozyten das Tubulussystem durchfließen, sind sie großen Schwankungen der Osmolalität ausgesetzt (2). Intra- und extrazellulär führt dies zu mehrmaligen Verschiebungen der Natriumkonzentration, es wird vermutet, dass sie dadurch im Urinbefund dysmorph erscheinen (1,2). Strukturelle Schäden an der glomerulären Filtrationsbarriere, die sich als nephritisches Syndrom äußern, betreffen die Endothelzellen, subendotheliale, subepitheliale oder mesangiale Immunkomplexablagerung, direkt die GBM oder die Podozyten (5).

Zu den Ursachen eines nephritischen Syndroms zählen die Immunglobulin (Ig) A (IgA)-Nephritis, die Lupus-Nephritis (LN), Anti-Neutrophilen-Cytoplasmatische-Antikörper (ANCA)-Vaskulitiden, die Post-Streptokokken GN, Membranoproliferative GN, die Rapid Progressive GN (RPGN) und die Anti-GBM-GN (5–7).

	Nephrotisches Syndrom	Nephritisches Syndrom
Proteinurie	≥3,5g/24h u.U. mit Hypalbuminämie	<3,5g/24h
Hämaturie	/	Mikro- bis Makrohämaturie
Blutdruck	/	u.U. Hypertonie
Ödeme	Peripher	Periorbital

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Leitsymptome des nephrotischen und nephritischen Syndroms.

1.2.1.2 Pathophysiologie

Bereits 1959 betont Ross in einem Artikel zu Nierenbiopsie und GN die Notwendigkeit, klinische Befunde wie das nephrotische Syndrom zur Diagnosestellung mit der zugrundeliegenden Pathophysiologie zu verknüpfen (11). Einige Formen der GN tragen den Pathomechanismus im Namen, wie die Post-Streptokokken GN, ein einheitliches System zur Benennung der Entitäten gab es allerdings bis 2015 nicht (2,8,12). So stellten behandelnde Ärztinnen und Ärzte die Diagnose aus einer Zusammenschau klinischer Präsentation, Ätiologie und histologischer Befunde (9,12). Zwar wurde der histopathologische Befund von Nierenbiopsien in die Diagnose miteinbezogen, jedoch gab es kein standardisiertes Schema zur Einteilung und Benennung der Befunde (10). Dies erschwerte es, die Diagnose pathophysiologisch einzuordnen, wodurch die Patient*innenversorgung negativ beeinflusst wurde (8). Des Weiteren ergaben sich in der Forschung Schwierigkeiten, international und multizentrisch Daten zur GN zu vergleichen und zu verarbeiten (8,12).

2015 erarbeiteten Nephrolog*innen und Patholog*innen im Auftrag der Renal Pathology Society einen Lösungsansatz für diese Problematik (8). Das Resultat ist eine mehrschichtige Klassifikation, die fünf Gruppen der GN anhand ihrer Pathophysiologie unterscheidet (8). Die Diagnose einer GN kann damit durch Patholog*innen gestellt werden und ist klar einem Pathomechanismus zuordenbar (8,10). Bezüglich der therapeutischen Versorgung der Patient*innen ist besonders die Unterscheidung der Monoklonalen GN und der C3 GN sinnvoll, da diese spezieller Therapie bedürfen (10). Als GN im engeren Sinne definieren Sethi et al. Krankheitsbilder mit glomerulärer Hyperzellularität als Folge gesteigerter Proliferation ansässiger Zellen oder leukozytärer Infiltration (8,12). Die Befunde werden mittels Fluoreszenzmikroskopie (IF), IHC oder Elektronenmikroskopie (EM) erhoben (8,9). Die Klassifikation für die primäre Diagnose ist vierschichtig, im Folgenden wird die vorgeschlagene Klassifikation anhand von Beispielen aus (8) erläutert:

Ist die Entität bekannt, wird sie direkt benannt. Bei Unkenntnis wird stattdessen eine der fünf pathophysiologischen Gruppen zugeordnet (zum Beispiel „Proteinase 3 (PR3)-ass.-ANCA+-GN“). Im zweiten Schritt wird das Schädigungsmuster beschrieben („rapid progressiv, halbmondbildend“). Darauf folgen je nach vorangehenden Daten anwendbare Scores oder Klassifizierungen. Abschließend sind sonstige Auffälligkeiten, die mit der Krankheit assoziiert sind und bisher noch nicht bezeichnet wurden („Chronifiziert“), zu benennen. Eine separate sekundäre Diagnose soll Nebenbefunde beinhalten, die nicht mit der primären Diagnose zusammenhängen. (8)

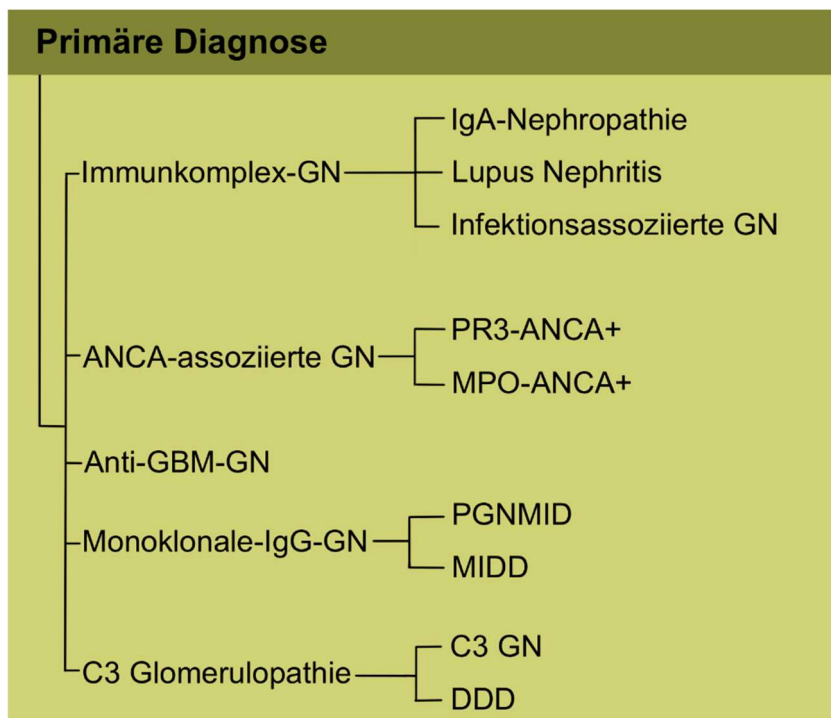


Abbildung 5: Die fünf unterschiedenen Primärdiagnosen nach Sethi et. al.
 PR3:Proteinase 3. MPO: Myeloperoxidase. PGNMID: Proliferative GN mit monoklonalen Ig Ablagerungen. MIDD: Monoklonale Ig Ablagerungskrankheit. DDD: Dense Deposit Disease. Modifiziert nach Sethi et. al (13)

Der erste der fünf pathogenen Typen ist die *Immunkomplex (IK) GN* (8). Er inkludiert die IgA-Nephritis, die LN, die Infekt-assoziierte GN und die Fibrilläre GN (8). Mittels Immunofluoreszenz (IF) und IHC sind granuläre polyklonale Ig-Ablagerungen charakteristisch nachweisbar (8). Das Schädigungsmuster ist variabel (mesangial, endokapillär, exsudativ, membranoproliferativ, nekrotisierend, rapid progressiv, sklerosierend, oder mehrere.) (8).

Die *Pauci-immun GN* oder auch *ANCA-assoziierte GN* stellt den zweiten Typ dar (8). Da in 80-90% der Fälle serologisch ANCA nachweisbar sind, wird dieser Typ weiter unterschieden in ANCA- und ANCA+ GN (8). Letztere werden je nach Antigen-spezifität in PR3-ANCA+ GN und Myeloperoxidase (MPO)-ANCA+ GN unterteilt (8). Zu den ANCA+

zählt man die mikroskopische Polyangiitis (mP), Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) und die eosinophile GPA (8). IF und IHC zeigen keine oder wenige Ig-Ablagerungen (Lateinisch: pauci = wenig) (8). Das Schädigungsmuster kann je nach Fortschritt der Krankheit rapid progressiv, nekrotisierend oder sklerosierend sein (8).

Anti-GBM GN ist der dritte pathogene Typ, der das Goodpasture Syndrom bezeichnet (8). Entlang der GBM finden sich lineare Ig-Ablagerungen, deren Hauptbestandteil meist IgG ist (8). Serologisch sind zirkulierende anti-GBM-AK, in <25% zusätzlich ANCA nachweisbar (8). Das Schädigungsmuster ist meist nekrotisierend und rapid progressiv, auch sklerosierend (8).

Die *Monoklonale Ig GN* als vierter Typ beinhaltet monoklonale Gammopathien und Paraproteinämien (8). IF und IHC zeigen sich charakteristische monoklonale IgG Ablagerungen in den Glomeruli oder der tubulären Basalmembran (8). Derartig äußert sich bspw. die Monoklonale Ig Ablagerungskrankheit (MIDD) (8). Liegt weder eine der zuvor genannten Entitäten zugrunde, noch finden sich in der EM mesangiale oder kapilläre Ablagerungen, unterscheidet man weiter die proliferative GN mit monoklonalen Ig Ablagerungen (PGNMID) (8). Das Schädigungsmuster ist zumeist mesangioproliferativ, ansonsten diffus proliferierend, nekrotisierend, rapid progressiv oder sklerosierend (8).

Der fünfte Typ ist die *C3 Glomerulopathie*, die elektronenmikroskopisch gesichert als C3 GN oder DDD erkannt werden kann (8). Charakteristisch in IF und IHC sind C3 Ablagerungen in Glomeruli in Abwesenheit von Ig (8). Das Schädigungsmuster kann mesangioproliferativ, diffus endokapillär proliferativ, membranoproliferativ, nekrotisierend, rapid progressiv oder sklerosierend sein (8).

1.2.2 Rapid Progressive Glomerulonephritis

IK-GN, Anti-GBM GN und ANCA+ GN können bei Vorliegen von histopathologischem Schädigungsmuster mit glomerulärer Halbmondbildung und klinisch rasch progredienter Niereninsuffizienz als Rapid progressive GN (RPGN) verlaufen (6,14,15).

Die Diagnose stellt einen klinischen Notfall dar, der unbehandelt nach Wochen bis Monaten als terminales Nierenversagen endet (2,16). Durch rechtzeitig eingeleitete adäquate Therapie kann allerdings in 60% der Fälle die Nierenfunktion wieder verbessert werden (5). Ausschlaggebend für die Besserung unter Therapie ist die Nierenfunktion, welche damit der aussagekräftigste Prognosefaktor ist (5,13,14). Um die Zeit zur Therapie bei noch ausgebliebener Diagnosestellung zu verkürzen, wird in einem solchen Fall auf die empirische immunsuppressive Therapie mit i.v. Methylprednisolon zurückgegriffen (6,16).

Es erkranken weniger als 1/100000/Jahr in Großbritannien, in den USA wird die Inzidenz auf 7/1.000.000 Personenjahre geschätzt (6,16). In allen Altersgruppen ist die häufigste Ursache für RPGN die Pauci-immun ANCA+ GN mit Halbmondbildung (15,16). Nach Altersgruppe liegt bei unter 20-jährigen Patient*innen die IK-GN (45%) knapp vor der Pauci-immun GN (42%) am häufigsten vor (15). Bei 21-60-jährigen überwiegt die Pauci-immun (48%) gegenüber der IK-GN (35%) als Auslöser (15). Bei über 61-jährigen liegt die Pauci-immun GN an erster Stelle (79%) (15).

Allen Formen der RPGN gemeinsam ist die histopathologische glomeruläre Halbmondbildung, welche je nach Ursache pathophysiologisch unterschiedlich zustande kommt (6,15,16). Den Anfang der gemeinsamen Endstrecke vermutet man in elektronenmikroskopisch erkennbaren Rissen in der GBM, wodurch Blutbestandteile in den Bowman-Raum gelangen, die über komplexe Mechanismen die Halbmondbildung induzieren (15–17).

Derartige Risse entstehen durch fokale Lyse der kapillären GBM durch Enzyme wie Serinproteinasen und Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die fähig sind die Bestandteile der GBM abzubauen (15,18,19). Ungeachtet der Ursache finden sich in frühen Stadien einer jeden RPGN aktivierte neutrophile Granulozyten und Monozyten (15). Diese werden durch geschädigte Endothel-, Epithel- und Mesangialzellen, sowie durch T-Lymphozyten zur Degranulierung angeregt (15). So sezernieren diese am Ort der Entzündung aus ihren Granula Serinproteinasen, wie Elastase oder PR3, welche in aktiver Form gespeichert wurden (18). Auch die MMPs 8 und 9 werden als Proenzyme in Granula gespeichert, aktiviert werden sie unter anderem von Serinproteinasen (18). Bei Inflammation werden sie rasch sezerniert (15). Auch andere MMPs werden als Reaktion auf Inflammationsmediatoren vermehrt synthetisiert und daraufhin sezerniert (18).

Gleichzeitiger oxidativer Burst der aktivierten neutrophilen Granulozyten und Makrophagen erzeugt Oxidantien, welche zusätzlich von geschädigten glomerulären Epithel- und Mesangialzellen gebildet werden (15,18). Oxidantien tragen zum lytischen Milieu bei, denn sie hindern die ubiquitär vorkommenden Proteinase-Inhibitoren am Inaktivieren der lytischen Enzyme und aktivieren überdies indirekt MMPs (15,18).

Geschützt vor Inaktivierung lysieren sie auf diesem Weg in begrenztem Bereich ungehindert Typ IV Kollagen, Laminin, Fibronectin und Proteoglykane (18). Diese stellen die Hauptbestandteile der GBM dar, demnach resultiert der Vorgang in der fokalen Lyse der GBM (18,19). Serinproteinasen führen zusätzlich zu Zytokinausschüttung und schädigen direkt glomeruläre Endothelzellen und Epithelzellen (18). Elastase und PR3 im Speziellen

leiten also zeit- und dosisabhängig bei Epithelzellen Apoptose ein, indem sie sie von der umgebenden Matrix, wie den Zellkontakten zum Mesangium, ablösen (19).

Durch die lytischen Risse in der Basalmembran der glomerulären Kapillaren gelangen in weiterer Folge Koagulationsfaktoren, teils aktiviert (15), und inflammatorische Zytokine in den Bowman-Raum (19). Dort führen Erstere über Interaktion mit Gewebethromboplastin zu Fibrinbildung (1,20). Plasminogen-Aktivator-Inhibitor ist ein potenter physiologischer Fibrinolysehemmer (1). Er verhindert, dass Fibrin lysiert und damit aus dem Bowman-Raum abgeräumt wird (20).

Zu charakteristischer Halbmondbildung führt nun eine positive Rückkopplung zwischen den endogenen glomerulären Zellen und den hereingespülten Molekülen, die Erstere zur Zytokinausschüttung stimulieren (15). Daraus resultiert einerseits verstärkte Migration von Makrophagen in betroffene Glomeruli, andererseits werden epitheliale Zellen zur Proliferation angeregt (15). Halbmonde einer RPGN bestehen vorrangig aus Epithelzellen, weitere Bestandteile sind Makrophagen, Lymphozyten und Myofibroblasten (15,16).

1.2.2.1 Immunkomplex-GN

Zur Entstehung einer IK-GN tragen Antigene unterschiedlicher Herkunft bei, die durch Anlagerung von Antikörpern einen IK bilden (16). Dazu zählen exogene bakterielle oder virale Antigene ebenso wie autogene Antigene, etwa bei Multisystemerkrankungen wie dem Systemischen Lupus erythematodes (SLE) (2,16). Dabei kann die Bildung eines IK sowohl vor als auch nach Ablagerung desselben erfolgen (16). Binden Antikörper die Antigene bereits im Blut, entstehen zirkulierende IKs, die sich als Ganze in der glomerulären Kapillarwand ablagern können (2,16). Wandern hingegen Antigene in das Nierengewebe ein, oder werden Strukturen des Nierengewebes als Antigen erkannt, können zirkulierende Antikörper daran binden (2,21,22). Dies kann subendothelial wie auch mesangial erfolgen (15).

Untersuchungen von 632 Nierenbiopsaten des Nephropathology Laboratory der University of North Carolina zeigen, dass die IK-GN im Gegensatz zu den anderen RPGN Formen (Anti-GBM-GN, ANCA-GN) die am wenigsten ausgeprägte Halbmondbildung zeigt. In den meisten Fällen sind <50% der Glomeruli betroffen (15). Dennoch liegen in 25-30% aller RPGN eine IK-GN zugrunde (16).

Für die Ausbildung glomerulärer Halbmonde ist im Rahmen der IK-GN entscheidend, wo die Ablagerungen lokalisiert sind (15). Finden sie sich elektronenmikroskopisch ausschließlich mesangial, so bleibt meist die Halbmondbildung bei IK-GN aus (15).

Subendotheliale Ablagerungen gehen im Gegensatz dazu regelmäßig mit Halbmondbildung und dem damit assoziierten schwereren Verlauf einher (15,21,22). Letztere stehen in engem nachbarschaftlichem Verhältnis zu Blutgefäßen und den darin enthaltenen Entzündungsmediatoren (15). So werden wie zuvor beschrieben Entzündungszellen zur Einwanderung ins Gewebe rekrutiert, wo sie die GBM schädigen und somit wiederum Halbmondbildung resultiert (15,18,19).

1.2.2.1.1 IgA-Nephritis

Die idiopathische IgA-Nephropathie wird zur IK-GN gezählt (8). Mit 15-40% stellt sie weltweit die häufigste Form der primär idiopathischen Glomerulopathie dar (6,22,23). Ihre weltweite Inzidenz wird auf 2.5/100.000/Jahr geschätzt, basierend auf einer systematischen Analyse von 40 relevanten Studien zur Inzidenz von primären GN mit einer zeitlichen Spanne von 1980-2010 (24). Die Dunkelziffer wird aufgrund subklinischen Verlaufes und damit einhergehender ausbleibender Diagnosestellung um ein Vielfaches höher geschätzt (15). Sie betrifft vorrangig junge Männer (6).

Die klinische Relevanz der Erkrankung ergibt sich einerseits aus der Häufigkeit, andererseits aus dem Risiko, dadurch ein terminales Nierenversagen zu erleiden (6). So entwickeln 25-33% der Patient*innen innerhalb von 20 Jahren nach Erstdiagnose eine terminale Niereninsuffizienz (6). Andere Studien beziehen sich auf das renale Überleben innerhalb eines Zeitraumes von zehn Jahren nach Erstdiagnose, hierbei beschreiben Coppo et al. bei einem kombinierten Endpunkt aus eGFR Verschlechterung um 50% und End stage renal disease (ESRD) bei Patient*innen mit IgA-Nephritis eine renale Überlebensrate von 74% (25). Bei rapid progressivem Verlauf einer IgA-Nephritis liegt das renale Überleben nach einer Untersuchung von 113 Fällen mit 57,5% nach einem Jahr trotz erfolgter Immunsuppression noch niedriger (26).

Das Manifestationsspektrum reicht, wie für GN typisch, von asymptomatischer Mikrohämaturie bis zur RPGN sowie progressivem Nierenfunktionsverlust (22). Tritt während oder kurz nach einer Virusinfektion des oberen Respirationstraktes Mikro- oder Makrohämaturie ein, kann das ein Zeichen für das Vorliegen einer IgA-Nephritis sein (6,7). Dies tritt mit einer Häufigkeit von etwa 10-15% als Erstmanifestation einer IgA-GN auf (27). Die IgA-Nephropathie ist oft mit arteriellem Hypertonus vergesellschaftet, vorrangig bei allen Patient*innen mit bereits bestehender Niereninsuffizienz, sowie in 40% der Patient*innen ohne Niereninsuffizienz (6). Die Diagnose wird mittels Nierenbiopsie anhand

zuvor beschriebener Parameter gestellt. Dort zeigt sich in 100% der Fälle eine positive IgA-Färbung (23).

Zum klinischen Bild der Hämaturie oder gar der RPGN kommt es durch zuvor beschriebene Mechanismen, die die Integrität der GBM stören (15,18,19). Im Falle der IgA-GN sind Immunkomplexablagerungen dafür verantwortlich (15,21). Diese IKs sind bei der IgA-GN von charakteristischer Zusammensetzung aus IgA1, welches an der konstanten Gelenks-Region O-Glycans aberrant galaktosyliert ist, sowie gegen ebendiese Gelenksregion gerichtete IgG-Antikörper und C3 (9,21–23).

Die Ursache der vermehrten Produktion des aberranten IgA wird in genetischen sowie Umweltfaktoren vermutet (22,23). Auch dem gastrointestinalen Mikrobiom wird eine Rolle zugeschrieben (10,28). Jedoch sind weitere Faktoren notwendig, um die Niere ausgehend von aberrant galaktosyliertem IgA in weiterer Folge zu schädigen (23). Die „multi-hit“ Hypothese beschreibt diese Faktoren in chronologischer Reihenfolge (23). „Hit 1“ ist das systemische Vorhandensein von aberrant galaktosyliertem IgA (22,23). Somit bezeichnet dieser „Hit“ Störungen in der Regulation der IgA-Produktion sowie Störungen der Galaktosylierung (23). Auf welchem Weg IgA in die Zirkulation gelangt ist unzureichend geklärt (29). Zwei Theorien bezüglich des Mechanismus bestehen, sie schließen sich gegenseitig nicht aus (21). Erstere beschreibt überschießende IgA-Produktion von mukosalen B-Zellen bei prädisponierten Patient*innen als ursächlich für das Übertreten von mukosalem IgA in die systemische Zirkulation (22,23). Die zweite Theorie stützt sich auf das irrtümliche Homing von mukosalen IgA produzierenden Zellen in das Knochenmark (21–23). Als „Hit 2“ werden Anti-Glycans-Antikörper gehandelt (21–23). Sie richten sich gegen den als Epitop erkannten N-Acetylgalaktosamin-Rest der untergalaktosylierten Gelenksregion des IgA1 (29). Im Gegensatz zu freiem IgA1 sind IKs aus Letzterem und den Anti-Glycans-Antikörpern pathogen und damit „Hit 3“ (23). Dazu zählt man auch deren Ablagerung im Nierengewebe (23). Bei diesem unvollständig verstandenen Prozess spielen in Tiermodellen Cluster of Differentiation (CD) 89 in der Komplexbildung, sowie Transglutaminase 2 und der Transferrin-Rezeptor CD71 bei der mesangialen Ablagerung eine Rolle (23,30). „Hit 4“ beschreibt die nachfolgende, durch die abgelagerten IKs ausgelöste, lokale Entzündungsreaktion und Komplementsystem-Aktivierung (22,23). Letzteres kann über den alternativen- und den Lektin-Aktivierungsweg geschehen (6,22,23). So regen sie die lokale Produktion von Entzündungsmediatoren wie Interleukin (IL)-6 und Transforming growth factor β (TGF- β) an, wodurch vermehrt Leukozyten rekrutiert werden (23). Weiters werden Wachstumsfaktoren sezerniert, die Mesangialzellen zur Proliferation

stimulieren, was in verstärkter Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen resultiert (21). Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und das Komplementsystem werden außerdem aktiviert und führen zusammen mit den beschriebenen Vorgängen in ihrer Gesamtheit zu renaler Sklerosierung und dadurch abnehmender Nierenfunktion (21,22). Lagern sich die IKs zusätzlich subendothelial ab, ist das klinische Korrelat schwerer als bei rein mesangialer Ablagerung (siehe Kapitel 1.2.2.1). Histologisch nachweisbar sind demnach granuläre Immunkomplexablagerungen (8).

1.2.2.1.2 Postinfektiöse GN (Post-Streptokokken-GN)

Diese Form der GN bezieht sich auf den zeitlichen und pathophysiologischen Zusammenhang zwischen einer bakteriellen Infektion und einer akuten IK-vermittelten GN (31,32). Früher wurde sie nach den vorherrschenden Erregern als Post-Streptokokken-GN bezeichnet, wobei die Dominanz dieses Erregers mittlerweile nur in Entwicklungsländern weiterhin besteht (33). Die Inzidenz wird auf 24,3/100.000 Personenjahren bei Erwachsenen geschätzt (34). In Industrienationen stehen jedoch andere Erreger, wie Staphylokokken oder gramnegative Erreger, im Vordergrund. (6,31,32). Hier wird die Inzidenz auf 0,3-6/100.000 Personenjahre geschätzt, wobei die Dunkelziffer wohl um ein Vielfaches höher liegt, da vorrangig symptomatische Patient*innen untersucht werden (34). Es sind hauptsächlich Kinder betroffen (31). Bei Erwachsenen lag der Altersgipfel in einer Studie mit 103 Teilnehmern bei 53 Jahren (35). Ältere Patient*innen weisen häufig Komorbiditäten wie eine Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus, Diabetes mellitus oder andere immunsupprimierende Erkrankungen auf (10,33). Gegenüber anderen IK-GN weist diese als Alleinstellungsmerkmal exogene Antigene auf (10).

Wie jede GN präsentiert sich auch die postinfektiöse GN als breites Spektrum. Leitsymptome sind jedoch Mikrohämaturie und eine Proteinurie <3g/24h (6,10). Periorbitale Ödeme und Hypertonie sind oft manifest (6). Treten Hämaturie, Hypertonie und Ödeme auf, spricht man von der bereits beschriebenen Volhard-Trias (6). Kinder genesen in >90% der Fälle innerhalb weniger Wochen folgenlos (6,32). Dahingegen heilt die Erkrankung bei Erwachsenen nur in etwa 50% aus (6).

Lange war die gängige Theorie, dass sich IK aus bakteriellen nephrogenen Antigenen und IgG-AK bilden und ablagern, das Komplementsystem aktivieren und dadurch eine Entzündungsreaktion auslösen (10). Vermutlich lässt sich die Pathogenese jedoch primär auf den alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems zurückzuführen (10,16,33). Hierbei binden Oberflächenpolysaccharide von Bakterien, etwa der Streptokokken, an C3

(1). Genauer handelt es sich bei der Postinfektiösen-GN um das streptokokkale pyrogene Exotoxin B, ein nephrogenes Antigen, welches zirkuliert, bis es im Glomerulus bindet (28,33). Unabhängig von einem Antikörper und damit auch unabhängig von Immunkomplexbildung aktiviert es demnach das Komplementsystem über den Alternativen- oder den Mannose-Signalweg (10,33). Daher bestehen die Ablagerungen zu großen Teilen aus C3, während IgG eine untergeordnete Rolle spielt, was eher untypisch für IK Erkrankungen ist (10). Durch den hohen C3 Anteil weist sie einige Gemeinsamkeiten zur C3-Glomerulopathie auf, was die Unterscheidung der Entitäten erschwert (32). Dennoch wird sie zu den IK GN gezählt (8). Auch eine autoimmune Komponente wird der Erkrankung zugeschrieben, jedoch ist der Rheumafaktor der einzige Autoantikörper, der mit der Postinfektiösen-GN assoziiert wird (10).

1.2.2.1.3 Systemischer Lupus Erythematodes mit Nierenbeteiligung

Systemischer Lupus Erythematodes (SLE) betrifft als chronisch entzündliche Multiorganerkrankung bei 40-50% der Erkrankten die Niere (6,36,37). Frauen sind bis zu 15 mal häufiger als Männer betroffen (36). Die Prävalenz wird je nach Region unterschiedlich angegeben mit einer Spanne von 4,8 bis 91/100000 (36). Therapieresistent sind über 30% der Betroffenen (6).

Die renale Komponente bezeichnet man als LN (6). Histologisch unterscheidet man nach einer Klassifikation der Renal Pathology Society/International Society of Nephrology sechs Klassen, welche die morphologische Vielfaltigkeit einer LN widerspiegeln (38). Sie kann mild mit leichter mesangialer Proliferation manifestieren, in unterschiedlichem Maße fokal oder diffus sklerosieren, sowie fortgeschrittene Sklerosierung zeigen, die über 90% der Glomeruli betrifft (6). Ähnlich zur IgA-GN kommt es vorrangig bei subendothelialen Ablagerungen zu Halbmondbildung (15).

Demnach hat auch die LN als GN ein breites Manifestationsspektrum, das von asymptomatischer Proteinurie über ein akutes nephritisches Syndrom bis hin zu RPGN oder chronischer Niereninsuffizienz reicht (6,37). Zusätzlich betrifft SLE außer der Niere noch weitere Organe und kann etwa zu Serositis oder Hautveränderungen führen (16).

Klasse eins und zwei verlaufen eher mild, hierbei kommt es zu mesangialen Immunkomplexablagerungen (39). Klasse fünf schädigt über subepitheliale Ablagerungen Podozyten, wodurch eine Glomerulosklerose entstehen kann (39). Klasse drei und vier beschreiben sehr aktive Formen von LN, welche zu subendothelialen Ablagerungen und damit Gefäßverschlüsse herbeiführen können, wodurch die GFR maßgeblich sinken kann

(39). Demnach sind sie mit schlechterer Prognose assoziiert (6,21,39). Der Ort der IK-Ablagerung hängt direkt mit der Art der betroffenen Zelltypen zusammen, somit hat er maßgeblichen Einfluss auf die Prognose (21). Neben diesen zählen zu prognostisch ungünstigen Faktoren die renale Hypertonie und serologisch erniedrigtes C3 (6). Früherkennung stellt einen wichtigen Beitrag zur Vorbeugung von inflammatorisch bedingten Endorganschäden dar (40). Durch die Früherkennung in Kombination mit modernen Immunsuppressiva zeigt sich eine 5-Jahres-Überlebensrate der LN von 90% (37). Manifestiert sich ein SLE mit LN, ist das Risiko für ESRD in etwa verdoppelt (37).

Die Pathogenese ist noch nicht abschließend geklärt (10). Zu der zugrundeliegenden chronischen Immundysregulation bei SLE auf nukleäre Autoantigene führen chronische Entzündung, das Vorhandensein spezifischer Autoantikörper, Immunkomplexbildung und die Inhibition regulatorischer Mechanismen (40). Bei SLE/LN können verschiedene antinukleäre Autoantikörper vorliegen (21,39). Sie werden gebildet, wenn die Toleranz gegen nukleäre Autoantigene wie Nukleinsäuren, Histone oder ribonukleäre Proteine verloren geht (21,39–41). Zu diesem Verlust tragen genetische Faktoren sowie exogene und endogene Trigger bei (38,40). Durch Kombination aus verschiedenen genetischen Varianten werden etwa autoreaktive Lymphozyten unzureichend deletiert (38,39). Überschießendes Einleiten programmierten Zelltodes erhöht zusammen mit verringerter Geschwindigkeit der phagozytischen Entfernung des apoptotischen Materials die Menge an vorhandenen potentiellen Autoantigenen (38–40). Diese persistieren und werden dadurch in weiterer Folge von Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) als Antigen erkannt, da sie unter physiologischen Umständen bereits abgeräumt worden wären (40). Über Opsonierung der Autoantigene und Binden an Komplementrezeptoren wird das Komplementsystem aktiviert, sowie die Immunantwort und damit einhergehend die Bildung von Autoantikörpern verstärkt (39,40).

Genauer betrachtet aktivieren Autoantigene auf APCs, etwa dendritischen Zellen (DC) oder B-Lymphozyten, direkt Toll-like-Rezeptoren (TLR) 7 und 9 (39,40). Dies löst eine Immunreaktion aus, bei der im Vordergrund der Interferon α (IFN α) Signalweg steht (21,39,40). Dieser ist klassischerweise ein Signalweg der antiviralen Immunität, seine Aktivierung in Zusammenhang mit den Autoantigenen zeugt von der Handhabung jener als virale Partikel (10,21,40). Über diesen wird die Lebensdauer von Immunzellen verlängert und damit insgesamt die Immunantwort verstärkt, indem die Produktion von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen angeregt wird (40). Die Antigenpräsentation wird dadurch gefördert und autoreaktive Lymphozyten werden aktiviert und zur Differenzierung

angeregt (39). Über Kostimulation wird die Immunantwort von T-Helferzellen verstärkt, wodurch die Differenzierung von T-Lymphozyten weiter stimuliert wird (40). T-Lymphozyten und B-Lymphozyten sind davon gleichermaßen betroffen, wobei die zu Plasmazellen differenzierten B-Lymphozyten antinukleäre Autoantikörper produzieren (39,40).

So werden durch nukleäre Autoantigene das Komplementsystem, DC, autoreaktive T-Lymphozyten und B-Lymphozyten aktiviert und die Immunantwort potenziert (40). Genetische Veränderungen, die zu einer verstärkten Aktivierung dieser Zellen führen, sind in besonderem Maß mit LN assoziiert (40). Dazu zählt auch verminderte Bildung von regulatorischen T-Lymphozyten (40).

Die LN als renale Manifestation des SLE entsteht durch glomeruläre Immunkomplexablagerung, wobei diese IK Autoantikörper beinhalten (39). Diese binden an intrarenale Autoantigene und führen zu komplementvermittelter intrarenaler Inflammation (39,40). Die intrarenale Ausschüttung an Zytokinen rekrutiert Leukozyten zur Einwanderung ins Gewebe, was wiederum die Entzündungsreaktion verstärkt (39). Nimmt die Niere Merkmale lymphatischer Organe an, findet direkt in der Niere die Bildung von Autoantikörpern statt (39). In besonderem Maße mit LN assoziiert sind Anti-Komplementfaktor 1q- und Anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper, letztere erkennen das in Cytoplasma und Nucleus von Mesangialzellen befindliche Annexin II als Autoantigen (21). Im Mesangium und den glomerulären Epithelzellen finden sich weiters Nukleosomen, deren Doppelstrang-DNA-Bestandteile auch als Autoantigene fungieren können (21,40).

1.2.2.2 Anti-GBM-GN

Die Anti-GBM-GN ist eine für die Niere und die Lunge organspezifische Autoimmunerkrankung (42). Früher als Goodpasture-Syndrom bezeichnet, war damit die klinisch manifeste RPGN mit pulmonaler Kapillaritis beschrieben (21,42). Dies tritt in etwa 50% der Fälle ein (6). Die Anti-GBM-GN verläuft in bis zu 90% der Fälle als RPGN (43). Sie ist die RPGN mit der schlechtesten Prognose, denn bei >95% der Patient*innen zeigen sich in der Biopsie mittels IF Halbmonde und in 85% sind >50% der Glomeruli betroffen (15). Sie ist für 10-15% der Fälle von RPGN verantwortlich (15). Laut Daten einer 11-Jahres Analyse aus Irland liegt die (nationale) Inzidenz bei 1,64/1.000.000/Jahr (44). Damit liegt sie ein wenig über der geschätzten Inzidenz für europäische Populationen von <1/1.000.000/Jahr (43). Assoziiert mit der Erkrankung ist das Allel Humanes Leukozyten-Antigen (HLA) DRB1-1501, über 80% der Betroffenen weisen es auf (21,43). Damit einher

geht ein 8-fach erhöhtes Risiko für das Entstehen einer Anti-GBM-GN (10). Präsentiert dieses HLA ein dem beschriebenen renalen Autoantigen gleichendes Antigen, reagieren T-Lymphozyten unzureichend darauf, weswegen sie im Rahmen des Selektionsprozesses nicht genügend thymal deletiert werden (21). Dieselben T-Lymphozyten reagieren allerdings auf das entsprechende renale Autoantigen und lösen so die Anti-GBM-GN aus (21).

Namensgebend für die Anti-GBM-GN sind Autoantikörper gegen Typ IV Kollagen, genauer gegen den nicht-kollagenen Abschnitt 1 der $\alpha 3$ Kette ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) (10,21,42,43,45). Die Autoantikörper richten sich gegen spezielle Epitope der α Ketten des Kollagens, welche in der gesunden Niere allerdings als Hexamer gebunden vorliegen (21,42). Im Normalzustand können keine Autoantikörper an die Epitope binden, somit kann kein pathogener Effekt induziert werden (21). Es bedarf also einer Konformationsänderung der Hexamere, um die Epitope zu exponieren (42). Wie diese genau induziert wird, ist noch unklar - es werden jedoch verschiedene Faktoren, wie Fieber oder proteolytischer Schaden und deren Kombination diskutiert (42,43). Auch vorangehende virale Infektionen können vermutlich über Mimikry eines T-Zell Epitops das Krankheitsbild hervorrufen (10,16,45). So wurde es auch in Zusammenhang mit einem nephrogenen Peptid des Clostridium botulinum beobachtet (45). Andere Toxine wie Zigarettenrauch oder Drogen werden ebenfalls diskutiert (10,16,42). Binden also Autoantikörper an ein derartiges Epitop, werden weitere Konformationsänderungen begünstigt und beschleunigt (21). Diese positive Rückkopplung ist eine mögliche Erklärung für das Auftreten der anti-GBM-GN als RPGN (21).

1.2.2.3 Pauci-immun/ANCA-assoziierte GN

Liegt eine Pauci- immun GN vor, sind in 80-90% der Fälle serologisch ANCA nachweisbar (6,15). Diese als ANCA+ klassifizierten Erkrankungen zählen neben SLE zu systemischen Grunderkrankungen, die mit einer Nierenbeteiligung einhergehen können (6). Es werden die GPA, die eosinophile GPA und die mPA unterschieden (9,21). Der Gruppe der Pauci-immun GN gemein ist die geringe Ausprägung an Ig-Ablagerungen in IF und IHC (8). Denn statt IK spielen hier Autoantikörper und die zelluläre Immunität eine große Rolle (21). In den USA wurde für die Pauci-immun GN eine Inzidenz von 3,1/1.000.000/Jahr ermittelt, wobei vorrangig Männer, Kaukasier sowie Menschen über 65 Jahren betroffen sind (46). Die Inzidenz in Europa liegt dementsprechend höher bei 1-2/100.000/Jahr (46).

Die ANCA+ Pauci-immun GN ist die statistisch am häufigsten verantwortliche Ursache für RPGN (15). Bei GPA richten sich die AK meist gegen die PR3-ANCA, bei der mPA richten

sie sich meist gegen die MPO-ANCA (8,9). PR3-AK werden als zytoplasmatische ANCA (cANCA) bezeichnet, analog dazu nennt man MPO-AK perinukleäre ANCA (pANCA) (5). Salmela et al. beschreiben 2018 ANCA-ass. RPGN Überlebensraten und prognostische Marker basierend auf Daten von 85 Patient*innen aus Helsinki und dem Uusimaa Hospital Distrikt (47). Das renale Überleben wurde als die Zeit von der Diagnose bis zum terminalen Nierenversagen definiert (47). Bis zum Eintreten des Todes oder Ausbleiben eines follow-up vergingen im Median 16 Jahre (47). Das renale Überleben war bei fokalem Schädigungsmuster 88,1%, bei Halbmondbildung 70,6%, bei gemischtem Bild 55,8% und am schlechtesten bei sklerosierter ANCA-ass.-GN mit 37,3% (47). Das insgesamt renale Überleben bei ANCA-ass.-GN lag bei 79% nach 5 Jahren, 71% nach 10 Jahren und 68% nach 20 Jahren (47).

In den Niederlanden wurden 164 Patient*innen mit zwischen 1979 und 2011 aufgetretener histologisch gesicherter ANCA-ass.-GN analysiert, wobei sich das renale 5-Jahres-Überleben vergleichbar mit den Ergebnissen von Salmela et al. zeigte (48). Bei fokalem Schädigungsmuster war das renale 5-Jahres-Überleben 91%, bei gemischtem 69% und bei Halbmondbildung 64% (48). Waren weniger als 25% der Glomeruli noch unbeschädigt, zeigte sich das Überleben bei gemischtem Schädigungsmuster und bei Halbmondbildung weiter verschlechtert (16,48).

Sowohl infektiöse als auch umweltbedingte Triggerfaktoren für die Bildung von ANCA werden diskutiert (10). Bei bakteriellen Erregern wird molekulares Mimikry zur Induzierung der Produktion von PR3- und Lysosom-assoziiertes membranöses Glykoprotein 2 (LAMP2)-AK vermutet während hingegen Extrazelluläre-Neutrophilen-Fallen (NETs) als Bestandteil des angeborenen Immunsystems als autoimmunitätsauslösend gehandelt werden (21). Nach der These des bakteriellen Mimikry ähneln spezielle bakterielle Strukturen so stark speziellen körpereigenen, dass sie als homolog bezeichnet werden können (49). Die gegen die bakteriellen Strukturen gebildeten Antikörper erkennen somit gleichzeitig die körpereigenen Strukturen und werden daher als Autoantikörper bezeichnet (21). Das Bakterium *Staphylococcus aureus* weist das Enzym 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase auf, welches in Mäusen die Bildung von anti-MPO T-Zellen induziert (50).

Autoantigene, die an zirkulierende neutrophile Granulozyten binden, fördern deren Infiltration in das Nierengewebe und die nachfolgende lokale Freisetzung von MPO, PR3 und LAMP2 als Inhalt ihrer Granula durch NETosis oder Degranulation (21). Dadurch wird die Autoantikörper Bildung gegen MPO gefördert (21). LAMP2 ist auch auf Endothelzellen exprimiert (21).

Inflammatorische Zytokine induzieren die verstärkte Expression von MPO als Oberflächenrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten (10). Anti MPO IgG binden daran und induzieren die Degranulierung, wodurch wiederum MPO frei wird, welches von MPO spezifischen T-Lymphozyten erkannt wird (10,51). Dadurch wird der beschriebene Prozess im Sinne eines Circulus vitiosus verstärkt (10,51). Neutrophile Granulozyten und das Komplementsystem werden demnach vorrangig durch Autoantikörper aktiviert, während fokale Nekrose und Halbmondbildung den T-Lymphozyten zuzuschreiben sind (10,21). Es bestehen demnach starke Hinweise auf die Pathogenität der Autoantikörper (21,51). Die anfängliche Reaktion des angeborenen Immunsystems kann auf diese Weise eine Antigen-spezifische adaptive Immunantwort auslösen (10).

1.3 Das Immunsystem

Das ideale Immunsystem verteidigt die Gesundheit des Körpers indem es alles Fremde erkennt und unschädlich macht, langfristig gegen Infektionen schützt und niemals den Körper selbst zum Ziel hat (41). Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, ist das menschliche Immunsystem aus vielen verschiedenen Mechanismen und Strukturen zusammengesetzt (1). Das unspezifische angeborene Immunsystem als ein Teil davon gewährleistet Schutz gegen körperfremde sowie geschädigte körpereigene Zellen, hat mechanische Barrieren und kann das spezifische Immunsystem aktivieren (1,41). Minuten nach einer Infektion wird es aktiv, die Antwort flaut nach Tagen ab (49). Ergänzt wird es durch das spezifische erworbene Immunsystem welches hochspezifisch einzelne Pathogene eliminiert (1). Es reguliert das unspezifische Immunsystem (41). Stunden bis Tage dauert eine Reaktion auf Infektion, sie hält Tage bis Wochen an (49). Beide Teile des Immunsystems haben zelluläre wie humorale Komponenten (1). Neben Entzündungsvorgängen ist das Immunsystem für Reparaturvorgänge in geschädigtem Gewebe verantwortlich (41).

1.3.1 Das angeborene Immunsystem

Der zellulären unspezifischen Immunantwort werden neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Mastzellen, Monozyten sowie Makrophagen, bestimmte DC und immanente lymphoide Zellen, wie natürliche Killer (NK)-Zellen zugeordnet (1). Gemeinsam ist allen genannten die Abstammung von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, welche zwei unterschiedliche Arten an Stammzellen hervorbringen (49). Abgesehen von den NK-Zellen, die aus den lymphoiden Stammzellen hervorgehen, entwickeln sich die restlichen der genannten aus den myeloischen Stammzellen (49). Die Zellen kommunizieren über Botenstoffe miteinander (49).

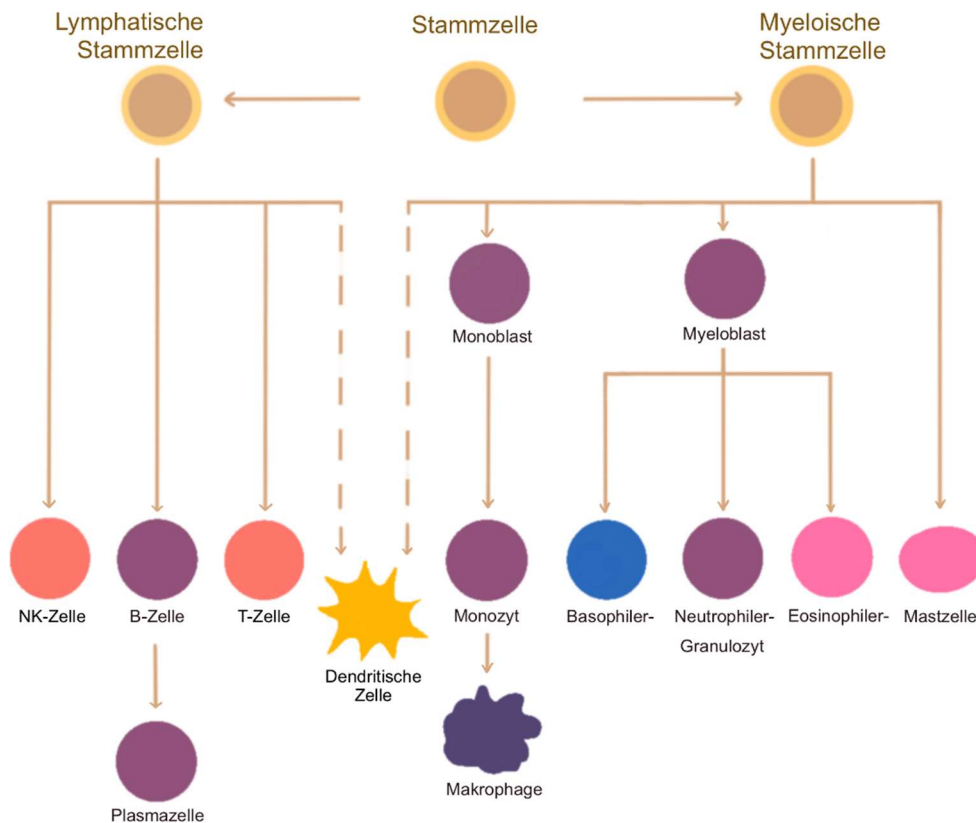


Abbildung 6: Leukopoese.
Modifiziert nach Amboss (52).

1.3.1.1 Entzündungsmediatoren

Zytokine und Chemokine sind Proteine, welche als Entzündungsmediatoren fungieren (49). Sie werden von verschiedenen Immunzellen sezerniert und beeinflussen die Immunantwort ihrer Zielzellen, daher werden sie auch Botenstoffe genannt (49).

Botenstoffe, die vorrangig Immunzellen in unmittelbarer Umgebung der sezernierenden Immunzelle beeinflussen, nennt man Zytokine (49). Sie unterscheiden sich nicht nur danach, von welchen Zellen sie produziert und sezerniert werden, sondern auch anhand der Zellen, auf die sie wirken (49). Hierbei unterscheidet man eine autokrine Wirkung, bei der eine Zelle sich selbst stimuliert und eine parakrine Wirkung, wobei die umgebenden Zellen die Zielzellen sind (49). Über für sie spezifische Rezeptoren werden die entsprechenden Zellen von ihnen aktiviert (1). Zumeist wird dadurch die Funktion der Zielzellen verstärkt und somit die Immunantwort intensiviert (49). Demnach können Zytokine je nach Art der Zielzelle antiinflammatorisch oder proinflammatorisch wirken (49). Hinsichtlich der Zytokine unterscheidet man IL von Hämatopoetinen, IFN und Tumornekrosefaktoren (TNF) (1).

Einige Zellen sezernieren eine Reihe bestimmter Zytokine, man spricht von einem Zytokinprofil (49).

Als Chemokine werden Zytokine bezeichnet, die als chemischer Lockstoff der Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blut in das sie benötigende Gewebe dienen (1). Den Übertritt in das Gewebe nennt man Diapedese (49). Die Chemokine werden in vier Gruppen eingeteilt, denn sie unterscheiden sich in ihrem molekularen Aufbau voneinander hinsichtlich der Anzahl und den Abständen der enthaltenen Cysteinreste (53). So gibt es CXC-, CC-, C- und CX3C-Chemokine (53). CXC-Chemokine rekrutieren neutrophile Granulozyten sowie B-Zellen und fördern die Myelopoese (53). CC-Chemokine rekrutieren Monozyten, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten ins Gewebe und beeinflussen das Gleichgewicht zwischen TH1- und TH2-Zellen sowie die Bildung von Granulomen (53). C-Chemokine rekrutieren T- und NK-Zellen und sind mit T-Zell-medierten Erkrankungen assoziiert, worin ihnen immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden (54). Der einzige Vertreter der CX3C-Chemokin heißt Fractalkin und fungiert als Adhäsionsmolekül (53).

1.3.1.2 Granulozyten

Die im Blut zirkulierenden Leukozyten sind zu 50-70% Granulozyten (1). Die seltensten davon sind mit 0-1% basophile Granulozyten, welche analog zu Mastzellen über IgE zur Freisetzung von Histamin und Heparin angeregt werden (1). Eosinophile Granulozyten machen 2-4% aus und richten sich vorrangig gegen Würmer und Parasiten (1). Die Funktion der neutrophilen Granulozyten besteht im Phagozytieren von zuvor als körperfremd markiertem Material (49). Daher bezeichnet man sie als Fresszellen (Phagozyten), zu denen außerdem noch Makrophagen und DC zählen (49). Die Markierung durch die Anlagerung von Komplementfaktoren, C-reaktivem Protein oder Antikörpern an Antigene wird als Opsonierung bezeichnet (1). Auch APC können Fremdmaterial als Solches erkennbar machen (1,49). Ein Phagozyt umschlingt opsonierte Strukturen mit Membranausstülpungen um sie mittels Endozytose aufzunehmen (1). Das neu entstandene Kompartiment, ein Phagosom, dient dem enzymatischen Abbau des Inhaltes (1). Zudem wirken neutrophile Granulozyten bakterizid, indem sie mithilfe bakteriotoxischer Sauerstoffradikale und Lysozymen die Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien spalten (1).

Die neutrophilen Granulozyten befinden sich zu 30% im Knochenmark, zu über 50% interstitiell verteilt und zu weniger als 20% im peripheren Blut, letztere sind etwa zur Hälfte an Endothelzellen gebunden (1). Wie alle Phagozyten erfüllen sie ihre Funktionen vorrangig

im extravasalen Gewebe, wohin sie über Leukodiapedese aus dem intravasalen Raum gelangen (1,49). Diesen Übertritt ermöglichen die in Kapitel 1.3.1.1 diskutierten Entzündungsmediatoren, welche infolge von mikrobieller Gewebsschädigung von bereits gewebsständigen Leukozyten ausgeschüttet werden (1). So potenziert sich die immunologische Abwehr über Erhöhung der Zellzahl und Rekrutierung von immunologisch aktiven Zellen an den Orten, wo sie benötigt werden (1).

Der Vorgang der Diapedese setzt sich aus Margination, Rollen, Adhäsion und Einwanderung zusammen (49). Lokale Gefäßerweiterung führt zur Verlangsamung der Blutflussgeschwindigkeit (1). Dadurch befinden sich die Zellen in erweiterten Gefäßen tendenziell am Rand (*lat.*: margo, -inis: der Rand), wohingegen sie normalerweise am Ort der höchsten Geschwindigkeit, in der Mitte des Gefäßes, anzutreffen sind (1). Unter dem Rollen versteht man eine reversible Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand (1). Das Rollen wird unter dem Einfluss verschiedener Botenstoffe im Sinne einer Anhaftung beendet (1,49). Um einen anhaftenden Leukozyten schließlich dazu zu bringen, in das Gewebe einzuwandern, tritt ein Leukozyt zuerst zwischen Endothelzellen durch, um dann mithilfe der MMP9 die extrazellulären Bestandteile der Basalmembran abzubauen und diese folglich zu überwinden (49). Am Ort der Entzündung werden von ansässigen Leukozyten die Chemokine CXCL8 und CCL2 sezerniert, damit neutrophile Granulozyten und Makrophagen entlang deren Konzentrationsgradienten dorthin wandern (49). Zwar geschehen die beschriebenen Vorgänge zu jeder Zeit überall im Körper (1). Doch im Rahmen inflammatorischer Vorgänge kommt es zur raschen Umverteilung von zirkulierenden Leukozyten in Entzündungsareale (49).

1.3.1.3 Monozyten

Auch Monozyten und deren gewebsständiges Pendant, die Makrophagen, zählen zu den Phagozyten, welche zusammen als mononukleäres Phagozytensystem bezeichnet werden (1). In nahezu allen Geweben sind seit der Geburt gewebsständige Makrophagen vorhanden, wie die als Kupfferzellen bezeichneten hepatischen Makrophagen (49). Zusätzlich können aus dem Knochenmark stammende hinzukommen (49). Zirkulierend im Blut beginnen diese Zellen ihren Lebenszyklus als Monozyten, bis sie nach wenigen Tagen in das Gewebe auswandern und sich durch verschiedene Stimuli zu Makrophagen weiterentwickeln (1). Über Pattern-Recognition-Receptors (PRRs) wie TLR erkennen sie Pathogene an den jeweiligen Pathogen-Associated-Molecular-Patterns (PAMPs) auf der Oberfläche der Mikroorganismen, da diese auf körpereigenen Zellen nicht exprimiert werden (1,49).

Wurden Erreger durch das Komplementsystem opsoniert, erkennen Makrophagen und neutrophile Granulozyten dies über Komplementrezeptoren und phagozytieren das Material (49). Bei Aktivierung der Rezeptoren auf Makrophagen werden proinflammatorische Zytokine, wie IL-1, IL-12, TNF- α , TNF- β freigesetzt und Transkriptionsfaktoren wie Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) aktiviert (1). IL-1 und TNF- α gemeinsam aktivieren wie zuvor erläutert Endothelzellen, während IL-1, IL-12 und TNF- β T-Zellen aktivieren und zur Differenzierung anregen (1). Zusätzlich dazu interagieren Makrophagen mit dem adaptiven Immunsystem über Phagozytose von infizierten Zellen, die bereits durch das adaptive Immunsystem anvisiert werden (49). Auch über Major-Histokompatibilitätskomplex II (MHC-II)-Rezeptoren kann das adaptive Immunsystem aktiviert werden, wobei die Makrophagen als APC fungieren (1). Indem T-Zellen mit dem MHC-Antigen-Komplex interagieren, wird das adaptive Immunsystem aktiviert (1,49). Makrophagen können weiter in proinflammatorische klassisch-aktivierte M1- und antiinflammatorische alternativ-aktivierte M2-Makrophagen unterteilt werden (49). Die klassische Aktivierung erfolgt vorrangig durch IFN- γ und potenziert die antimikrobielle Aktivität der Makrophagen zur Bekämpfung intrazellulärer Pathogene sowie die Aktivierung ruhender CD4⁺-T-Zellen (49). IL-4 und IL-13 führen zur Differenzierung zu M2-Makrophagen, welche der Bekämpfung von Wurmbefall und dadurch entstandenem Gewebsschaden dienen (49). Demnach fördern sie die Reparatur und den Umbau von Gewebe (49).

1.3.1.4 Natürliche Killerzellen

Anders als die Phagozyten erkennen NK-Zellen fremdes Material nicht mittels TLR oder an MHC-II präsentierte Antigenen, sondern über Membranproteine, die durch Stress getriggert vermehrt exprimiert werden (1,49). Erythrozyten, Nervenzellen und von Viren befallene Zellen exprimieren sehr wenig MHC, weswegen das adaptive Immunsystem kaum Möglichkeiten hat, diese Zellen zu bekämpfen (1). NK-Zellen füllen diese Lücke, indem sie neben den Stress induzierten Membranproteinen über ihren Kristallisierbares Fragment (Fc)-Rezeptor antikörpermarkierte Zellen erkennen (1). Zur Bekämpfung dieser Zellen setzen NK-Zellen Perforine ein, welche die Zellwand der Zielzelle perforieren, um so den Zelltod herbeizuführen (1). Sie können weiters über Interaktion mit MHC-Molekülen zu antigenspezifischer Gedächtnisbildung führen (41). Man zählt sie zur Gruppe der immanenten lymphoiden Zellen (ILC) (49).

1.3.1.5 Immanente Lymphoide Zellen

Von lymphoiden Stammzellen stammen neben NK-Zellen die ILC Subgruppen ab (49). Ausgehend vom Knochenmark befinden sie sich in lymphatischem Gewebe und Organen wie der Leber, der Haut und Organen mit Barrierefunktion wie dem Dünndarm oder auch der Lunge (49). Besonderheiten sind die fehlende Antigen-spezifität aufgrund fehlender T-Zell-Rezeptoren (TCR) und B-Zell-Rezeptoren (BCR) sowie der Korezeptoren (49). Trotzdem sezernieren sie Zytokine und bilden Gedächtniszellen aus (41). Hinsichtlich ihrer Entwicklung und Funktionen weisen sie Ähnlichkeiten zu CD4+T-Zellen und Zytotoxischen T-Zellen auf (49). Drei Gruppen an ILCs werden nach dem Profil ihrer sezernierten Zytokine unterschieden (49). ILC1s werden von IL-12 und IL-18 stimuliert und produzieren IFN- γ , um intrazelluläre Erreger wie Viren zu bekämpfen (49). Als vorwiegend gewebsständige Zellen zirkulieren sie im Gegensatz zu den nah verwandten NK-Zellen nicht im Blut (49). ILC2s werden von IL-25, IL-33 und dem Thymic stromal lymphopoietin zur Ausschüttung von IL-4, IL-5 und IL-13 angeregt, ihnen wird die Abwehr von Parasiten zugeschrieben (49). Immunität gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze wird von ILC3s über IL-17 und IL-22 Produktion verstärkt, sie werden von IL-1 β und IL-23 stimuliert (49).

1.3.1.6 Humorale Bestandteile

Die humorale Abwehr des unspezifischen Immunsystems beinhaltet das Komplementsystem, das Enzym Lysozym und die Akute-Phase-Proteine (1). Neben Phagozyten ist das bakterizide Lysozym noch in Schleimhäuten des oberen Gastrointestinal- und Respirationstraktes sowie in der Tränenflüssigkeit enthalten (1). Als Glykosidase wirkt es vorrangig gegen grampositive Bakterien bakterizid (49).

IL-1 β und TNF- α werden in der Frühphase von Entzündungsreaktionen sezerniert (1,49). Diese lösen zusammen mit IL-6, das von aktivierten Makrophagen sezerniert wird, in der Leber eine Akute-Phase-Reaktion aus (1,49). Im Rahmen derer schüttet die Leber wiederum Akute-Phase-Proteine aus (1,49). Das C-Reaktive Protein als eines davon bindet spezifisch eine große Anzahl verschiedener PAMPs (49). Über Opsonierung dieser bakteriellen Oberflächenstrukturen und gleichzeitiger Aktivierung des Komplementsystems leitet es deren Lyse ein (1,49).

Das Komplementsystem wird von etwa 30 hepatischen Plasmaproteinen einschließlich der von C1 bis C9 nummerierten Komplementfaktoren gebildet, welche in der Membran unterschiedlicher Erreger Poren bilden, um deren Lyse einzuleiten (1,49). Weiters kann das Komplementsystem Leukozyten anlocken und aktivieren, Körperfremdes opsonieren sowie

die Durchlässigkeit von Gefäßen steigern (1). Die Porenbildung ist das Resultat einer Kaskade an Vorgängen (1). Das Komplementsystem kann durch unterschiedliche Wege aktiviert werden (1). Ungeachtet davon, welcher Weg das Komplementsystem aktiviert, resultiert ein porenbildender Membranangriffskomplex, der aus C5b, C6, C7, C8 und 10-16x C9 besteht (1). Der klassische Aktivierungsweg wird als antikörperabhängig bezeichnet, denn hier wird der Faktor C1 von Antigen-Antikörper-Komplexen aktiviert (49). Dem gegenüber stehen der antikörperunabhängige alternative Aktivierungsweg, bei dem Oberflächenpolysaccharide von Bakterien an C3 binden, sowie der antikörperunabhängige Mannosebindende- oder Lektin-Weg (1,49). Letzterer spielt vorrangig bei akuten entzündlichen Prozessen eine Rolle, im Rahmen derer Bakterien opsoniert werden und wiederum der klassische Aktivierungsweg folgt (1). Die Steigerung der Gefäßpermeabilität wird den Faktoren C3a, C4a und C5a zugeschrieben (49). Auch setzen sie im Rahmen dessen Histamin frei und fungieren so als Entzündungsmediatoren (1).

1.3.2 Das adaptive Immunsystem

Die Besonderheiten des adaptiven Immunsystems stellen die Bildung eines Immungedächtnisses und die spezifische Reaktion auf bestimmte Antigene dar (1,49). Die T-Lymphozyten mit dem TCR als der zelluläre und die B-Lymphozyten mit dem BCR als der humorale Anteil entwickeln sich allesamt aus lymphoiden Stammzellen (1).

1.3.2.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten weisen sowohl den für jede Zelle einzigartigen TCR auf als auch einen der beiden Korezeptoren CD4 oder CD8 (1,49). Sie können über den TCR hochspezifisch an bestimmte Antigene binden und diese als körperfremd erkennen (41). Antigene müssen hierzu über ein MHC-Moleküle präsentiert werden (49). MHC-Moleküle befinden sich an ihrem Syntheseort, dem endoplasmatischen Retikulum, in Phagozyten und binden dort Antigene, die bei der Phagozytose durch Lysosomen abgespalten wurden (1). Der MHC-Antigen-Komplex wird nachfolgend an der Zelloberfläche gebunden und nach extrazellulär hin präsentiert (1). Er ist ein Ligand für den TCR, welcher durch Bindung an denselben bei gleichzeitiger Kostimulation T-Lymphozyten aktiviert und zur Proliferation angeregt (1,41,49). Polymorphismen der MHC-Rezeptoren bedingen die Variabilität der präsentierten Antigene (1).

1.3.2.1.1 Der TCR

Der antigenspezifische TCR ist ein Heterodimer, wobei die variablen Anteile der Transmembrandomänen die antigenbindende Domäne bilden (1,49). Die variablen Anteile jener sind weiter unterteilt in V, D und J Gensegmente, die für die hohe Variabilität von bis zu 10^{15} verschiedenen TCR verantwortlich sind (1,49). Weitere Bestandteile sind ein Homodimer aus ζ -Ketten und der Oberflächenrezeptor CD3, welcher bei Bindung mit dem MHC-Komplex interagiert (1).

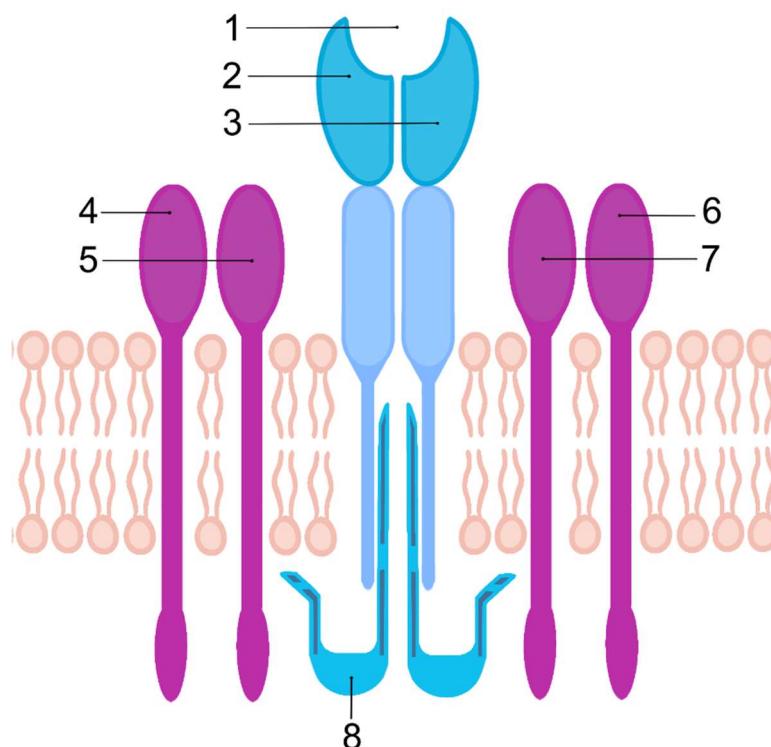


Abbildung 7: Aufbau des T-Zell-Rezeptors.

Die Antigenbindungsstelle (1) wird aus den variablen Domänen gebildet, die auf der α -Kette (2) und der β -Kette (3) lokalisiert sind. Die ϵ -Kette (4) und die δ -Kette (5) bilden einen CD3-Rezeptor. Die γ -Kette (7) und die ϵ -Kette (6) bilden einen weiteren CD3-Rezeptor. Die beiden ζ -Ketten (8) liegen intrazellulär. Modifiziert nach Amboss (52).

T-Zellen werden im Knochenmark zunächst als T-Vorläuferzellen synthetisiert, welche weder den TCR noch einen der Korezeptoren CD4 oder CD8 aufweisen (1). Die definite Struktur der vielen verschiedenen TCR ist nicht genetisch determiniert (41). Erst im Thymus werden mittels antigenunabhängiger Gen-Rekombination TCR und außerdem CD4- und CD8- Korezeptoren auf den nun als Thymozyten bezeichneten Zellen gebildet (1). Knochenmark und Thymus gehören zu den primären lymphatischen Organen (41). Die beiden wichtigsten Vorgänge zur Reifung der Thymozyten sind die positive und negative Selektion (1,49). Im Rahmen Ersterer wird die Apoptose all derjenigen Lymphozyten

eingeleitet, die körpereigene MHC-Komplexe nicht erkennen und binden (1,49). Die negative Selektion ist wesentlich für die Selbsttoleranz, sie führt zur Eliminierung aller Thymozyten, die trotz ausbleibender Kostimulation körpereigene MHC-Antigen-Komplexe erkennen und binden (1,41). Alle Thymozyten, die sowohl die positive als auch die negative Selektion im Thymus überstehen, bezeichnet man als reife, naive T-Zellen (1,49). Sie reagieren in einer angemessenen Spezifität auf MHC-Moleküle (41). Bis sie über Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen aktiviert werden, verbleiben sie in sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten (1) und der Milz (41). Analog zur negativen Selektion von Thymozyten im Thymus, die zur zentralen Selbsttoleranz führt, gibt es Mechanismen zur Erlangung peripherer Toleranz (1). Bleibt nämlich eine Kostimulation aus, werden die T-Lymphozyten inaktiviert (1,41).

1.3.2.1.2 MHC-Moleküle

Hinsichtlich der MHC-Moleküle werden die beiden Klassen I und II unterschieden (1). MHC I wird, abgesehen von Nervenzellen und Erythrozyten, von allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten exprimiert (1). Er präsentiert Antigene für CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, die bei Zweitkontakt durch Zytokinfreisetzung den Zelltod der betreffenden Zellen einleiten (1). MHC II wird von DC, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten exprimiert (1). Präsentiert werden in diesem Fall Antigene für CD4⁺T-Helferzellen, die bei Zweitkontakt Makrophagen aktivieren können und zur Aktivierung von B-Lymphozyten führen, welche über Differenzierung zu Plasmazellen spezifische Antikörper produzieren (1).

1.3.2.1.3 Die Aktivierung von T-Lymphozyten

Damit diese Aktivierung stattfindet, T-Zellen proliferieren, differenzieren und in entzündetes Gewebe auswandern können, müssen APC mit präsentiertem MHC-Antigen-Komplex in sekundäre lymphatische Organe einwandern (49). In den meisten Fällen wird hierzu der dem Ort des Geschehens am nächsten gelegene Lymphknoten über Lymphbahnen des lymphatischen Systems aufgesucht (41). Hier kommen die APC mit einer Vielzahl naiver T-Lymphozyten in Erstkontakt, bis ein TCR-CD3-Rezeptorkomplex spezifisch bindet (1,41). CD4 oder CD8 binden an den jeweiligen MHC-Komplex und lösen so über Kostimulation die Differenzierung anderer naiver T-Zellen zu CD4⁺T-Helferzellen, T-Gedächtniszellen oder zu CD8⁺Zytotoxischen T-Zellen aus (1). CD4⁺T-Helferzellen und CD8⁺Zytotoxische T-Zellen werden als T-Effektorzellen bezeichnet (1,49). T-Gedächtniszellen differenzieren bei Zweitkontakt mit dem spezifischen Antigen zu T-Effektorzellen (49). Im Vergleich zu den naiven T-Zellen sind sie vielzähliger, langlebiger,

prolifrieren besser, reagieren schneller und einige verbleiben in nicht lymphatischem Gewebe als residente Gedächtniszellen (41).

Die T-Zelle, welche das präsentierte Antigen spezifisch erkennt, muss klonal vervielfältigt werden, um eine Vielzahl der benötigten T-Effektorzellen zur Verfügung zu haben (1). Dies dient auch zur Vermeidung von Kollateralschäden (41). Die Aktivierung des TCR/CD3-Rezeptorkomplexes induziert über intrazelluläre Signalkaskaden und Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren die Produktion von Zytokinen wie IL-2 (1). Es fördert die Proliferation von T-Zellen und damit die klonale Expansion der spezifisch bindenden T-Lymphozyten (1). Auch die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen wird durch IL-2 gefördert, dadurch entstehen Plasmazellen, die Antikörper produzieren (1). B-Zellen können überdies als APC fungieren und so den Zweitkontakt der T-Zellen mit dem spezifischen Antigen herstellen (1). Sie interagieren auf diese Weise mit passenden T-Helferzellen, wodurch die Affinität der Antikörper zum spezifischen Antigen erhöht wird (1).

Nach stattgehabter Auswanderung der T-Effektorzellen in das periphere Gewebe kann es zum Zweitkontakt mit dem spezifischen Antigen kommen, wodurch sie aktiviert werden (1,49). Zytotoxische T-Lymphozyten führen nachfolgend mithilfe von Perforinen und Serinproteasen zum Zelltod der Zielzelle oder leiten über den Liganden CD95 bei Zellen mit CD95-Rezeptor die Apoptose ein (1). Über CD95 können sie eine Immunreaktion beenden, denn er wird außer von viral befallenen Zellen oder Tumorzellen auch von aktivierten Lymphozyten exprimiert (1).

1.3.2.1.4 Subklassen der T-Helferzellen

T-Helferzellen werden in einige Subklassen unterteilt, die notwendig für die Koordination der Immunantwort sind (41,49). Aus den aktivierten aber noch undifferenzierten TH0-Zellen begünstigen IFN- γ und IL-12 die Differenzierung zu *TH1-Zellen*, die vorwiegend IFN- γ produzieren (1,49). Dadurch besteht eine positive Feedbackschleife, in der TH1-Zellen weitere TH1-Zellen rekrutieren (49). Sie bekämpfen intrazelluläre Pathogene wie Viren (49). Erkennt eine TH1-Zelle einen infizierten Makrophagen, der bakterielle Antigene auf seiner Oberfläche präsentiert, wird diese ihn mittels IFN- γ zu einem M1-Makrophagen aktivieren, wodurch dessen antimikrobielle Funktion verstärkt wird (49). Man bezeichnet dies als Typ-1-Immunantwort, welche im Sinne eines Klassenwechsels B-Zellen dazu anregt, vorrangig opsonierende IgG-Antikörper zu produzieren (49).

IL-4 fördert hingegen die Differenzierung von TH0-Zellen zu *TH2-Zellen*, die IL-4, IL-5 und IL-10 produzieren (1). Sie dienen vorrangig der Bekämpfung extrazellulärer Parasiten, indem sie im Rahmen der Typ-2-Immunantwort eosinophile Granulozyten und Mastzellen unterstützen (49). Dies spiegelt sich auch in dem induzierten B-Zell Klassenwechsel zu IgE-Antikörpern wider (49).

Zu *TH9-Zellen* differenzieren TH0- oder TH2-Zellen unter dem Einfluss von IL-4 und TGF- β , sie produzieren vorrangig IL-9 (49). Dadurch steigern sie die Aktivität von Mastzellen (49).

Weiters fördern TGF- β , IL-6 und IL-23 die Differenzierung zu *TH17-Zellen*, die IL-17A, IL-17F und IL-22 produzieren, sie helfen bei der Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilzen (49). So aktivieren sie vorrangig neutrophile Granulozyten und leiten die sogenannte Typ-3-Antwort ein, welche den B-Zell Klassenwechsel auf opsonierende IgG2- und IgG3-Antikörper fördert (49). IL-17 und IL-22 tragen zur Aktivierung von epithelialen Zellen mit Barrierefunktion in unterschiedlichen Geweben bei (49).

Auf den Stimulus von IL-6 hin erfolgt die Differenzierung zu folliculären T-Helferzellen (*T_{FH}-Zellen*), die IL-21 produzieren (49). Namensgebend ist, dass sie in Lymphfollikeln anzutreffen sind, wo sie B-Zellen zur Produktion von hoch affinen Antikörpern anregen (49). Sie tragen zur Typ-1-, Typ-2- und Typ-3-Immunantwort bei und demnach zu dem jeweiligen B-Zell-Klassenwechsel (49).

Entgegengesetzt dazu weisen *regulatorische T-Zellen* (*T_{reg}*) immunmodulatorische Eigenschaften bezüglich der zuvor genannten T-Zell-Subtypen auf (41,49). Sie produzieren IL-10 und TGF- β (49). Von allen peripher zirkulierenden CD4⁺T-Zellen machen sie 5-10% aus (49). Man unterscheidet *T_{reg}* thymalen Ursprungs und die peripher aus naiven CD4-Zellen differenzierten *T_{reg}* (49). Der von ihnen exprimierte Transkriptionsfaktor FoxP3 reguliert die Produktion von IL-2, wodurch sie die Aktivität anderer Lymphozyten verringern, dem Entstehen von Autoimmunität entgegenwirken und somit die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischem Milieu erhalten (14,49).

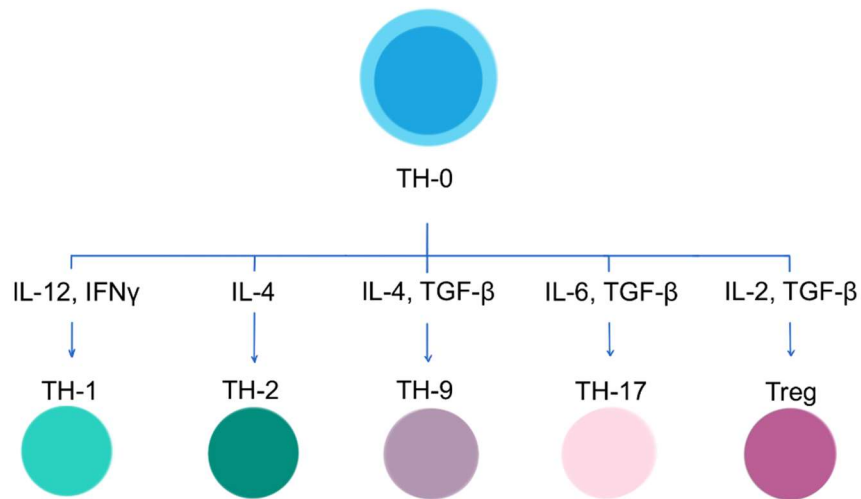


Abbildung 8: Die T-Zell Subtypen.

Die aus einer naiven TH-0-Zelle hervorgehenden T-Zell-Subtypen TH-1, TH-2, TH-9, TH-17 und T_{reg}. Modifiziert nach Janeway's Immunobiology (49).

1.3.2.2 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten als humoraler Bestandteil der adaptiven Immunantwort reifen noch im Knochenmark antigenunabhängig zu naiven B-Zellen mit BCR heran (1). Dieser besteht aus membranständigen Antikörpern, daher wird er als Membran-Ig bezeichnet (49). Im Rahmen einer negativen Selektion werden alle B-Zellen, die mit ihrem BCR körpereigene Antigene erkennen und binden, aussortiert (1,49). Die Übrigen wandern analog zu den T-Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe (1).

Die Hauptfunktion von B-Zellen besteht in der Produktion von Antikörpern, die spezifisch gegen ein Antigen gerichtet sind (1). Sie neutralisieren und opsonieren Antigene durch Bindung, außerdem aktivieren sie das Komplementsystem (1). Sobald ein Antigen den BCR bindet, differenziert die B-Zelle zur Plasmazelle, proliferiert und beginnt mit der Produktion von Antikörpern mit derselben Antigen-spezifität wie der entsprechende BCR (41,49). Diese kann wie zuvor erwähnt T-Zell abhängig eingeleitet werden, was eine effiziente Immunantwort hervorruft, oder aber T-Zell unabhängig über direkte Aktivierung der B-Zelle über das Binden eines Antigenes an den BCR (1).

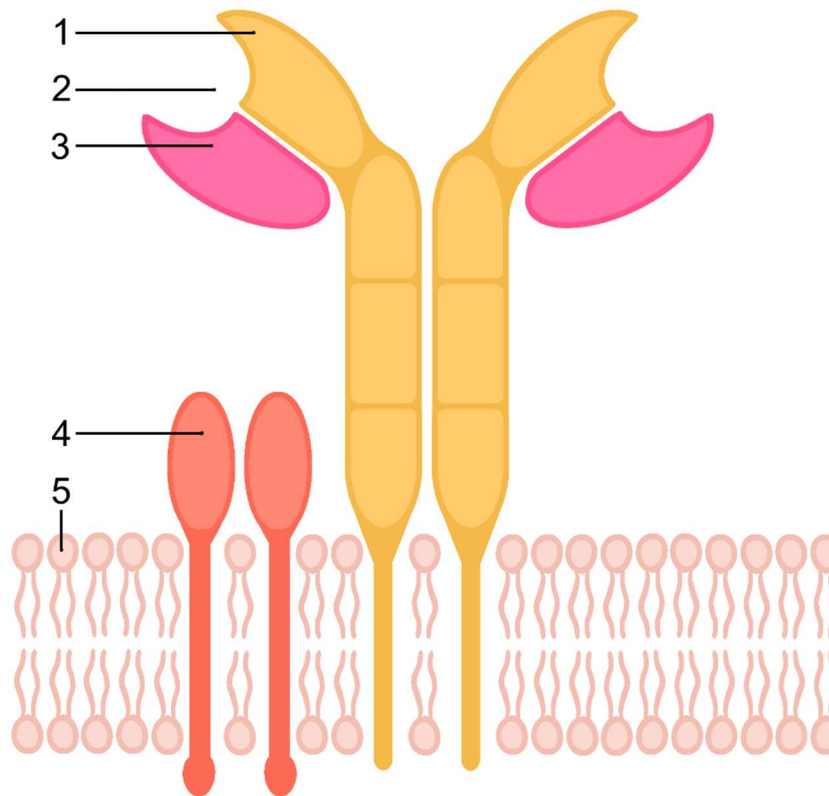


Abbildung 9: Aufbau des B-Zell-Rezeptors.

Die schwere Kette (1) und die leichte Kette (3) bilden mit ihren variablen Anteilen die Antigenbindungsstelle (2). Iga und Igβ (4) sind für die Signalübertragung über die Zellmembran (5) hinweg verantwortlich. Modifiziert nach Amboss (52).

1.3.2.2.1 Antikörper

Ein Antikörper ist aus je zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten aufgebaut, die jeweils eine konstante und eine variable Domäne haben (1,49). Die Zusammensetzung aus den schweren Ketten bestimmt die Subklasse des Antikörpers, sie werden als Ig A, D, E, G oder M bezeichnet (1). Der konstante Teil der schweren Ketten bildet das Fc (1,49). Die Antigenbindungsstelle setzt sich aus dem Anteil der konstanten Domäne der schweren Kette und der konstanten Domäne der leichten Kette zusammen, sowie aus der variablen Domäne der schweren (VH) und der leichten (VL) (1). Die hohe Variabilität der Antikörper ergibt sich aus den vielen verschiedenen Antigenbindungsstellen (1,49). Diese werden zum Einen durch die VJD-Rekombination erreicht, die in etwa 10.000 Variationen an VH und VL ermöglicht (1). Zum anderen werden VL und VH miteinander kombiniert, dadurch entstehen in etwa 1.000.000 mögliche Antigenbindungsstellen (1). Jeder Antikörper hat zwei identische Antigenbindungsstellen (49).

Analog zu T-Gedächtniszellen bilden sich auch antikörperproduzierende Plasmazellen zu B-Gedächtniszellen aus (1). Da der Reifungsprozess hierbei schon abgeschlossen ist, erfolgt

die adaptive Immunantwort auf den erneuten Kontakt mit einem speziellen Erreger sehr viel effizienter und rascher (41).

1.4 Das murine Modell der nephrotoxischen Serumnephritis

Die nephrotoxische Serumnephritis (NTS) ist eine T-Lymphozyten und Antikörpervermittelte Anti-GBM-GN und dient als Basis für tierexperimentelle Forschung an GN und RPGN (10,21). Sie wird als Prototyp der autoimmun vermittelten Nierenerkrankung beim Menschen bezeichnet (10,45). So ist die NTS ein Tiermodell, das seine Entsprechung im Menschen in der RPGN findet (21).

Die NTS kann grundsätzlich in verschiedenen Versuchstieren ausgelöst werden, dazu gehören auch Mäuse (55). Die krankheitsauslösenden heterologen Anti-GBM-Antikörper werden hergestellt, indem eine den Versuchstieren fremde Spezies, wie Kaninchen, gegen GBM-Bestandteile der Versuchstiere immunisiert wird (55). Die dabei gebildeten heterologen Anti-GBM-Antikörper werden nachfolgend in Form von Serum intravenös den Versuchstieren verabreicht, wodurch die NTS ausgelöst wird (55,56). Das Modell verläuft in zwei aufeinanderfolgenden Phasen (55,56). Zu Beginn der Erkrankung lagern sich in der GBM des Versuchstieres die heterologen Anti-GBM-Antikörper rasch ab, weswegen diese erste als heterologe Phase bezeichnet wird (55). In dieser Phase steht das immanente Immunsystem pathophysiologisch im Vordergrund (55). Darauf folgt die autologe Phase, die durch die Reaktion des adaptiven Immunsystems des Versuchstieres gegen die heterologen Antikörper gekennzeichnet ist (55,56). Um das Eintreten der autologen Phase zu beschleunigen, wird das Modell der akzelerierten NTS angewendet, welches im Menschen einer IK-GN entspricht (21). Hierbei werden Mäuse zuvor gegen IgG der fremden Spezies immunisiert und bekommen nachfolgend heterologe Anti-GBM-Antikörper in Form des Serums der fremden Spezies verabreicht (14). Dadurch tritt die autologe Phase direkt nach Verabreichung des Serums ein (55,56). Die Mäuse entwickeln eine starke Proteinurie und die Glomeruli zeigen typische histologische Zeichen der Glomerulosklerose (21).

1.4.1 Funktion des angeborenen Immunsystems in der NTS

In den ersten Tagen nach der Verabreichung der heterologen Antikörper und ihrer Bindung an die Zielstrukturen in der GBM führen vorrangig immanente Zellen wie neutrophile Granulozyten zu renalem Schaden (21). Auch Mastzellen tragen dazu bei, indem sie die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und P-Selektin steigern und dadurch die Rekrutierung von Effektorzellen erleichtern (57). Neutrophile Granulozyten werden schon Stunden nach NTS-Induktion von ebenfalls immanenten IL-17 produzierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen

rekrutiert (58). Diese sind pathogen, gehören hauptsächlich dem angeborenen Immunsystem an und werden von DC via IL-23 aktiviert (49,58). Die Gewebsschädigung verschlimmert sich, je mehr neutrophile Granulozyten rekrutiert werden (58).

Bildet sich die Inflammation bis zum 10. Tag nach Induktion der NTS nicht zurück, reifen renale DC, welche den CX3C-Chemokin-Rezeptor 1 und den CC-Chemokin-Rezeptor 2 ausbilden (59). Folglich sezernieren diese CXCL9 und rekrutieren dadurch TH1-Zellen (59). CXCL9 vermittelt über die CXC-Chemokin-Rezeptor 3 (CXCR3)+T-Zellen verstärkte intraglomeruläre Ablagerung pathogener Antikörper, was zur renalen Schädigung beiträgt (59). Die DC begünstigen durch die Aktivierung von Zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen, die spezifisch für renale glomeruläre Antigene sind, die interstitielle Ausbreitung der Schädigung (60). Die T-Zellen schädigen funktionell und strukturell die Niere, was zu weiterer Freisetzung von jenen Antigenen führt (60). Dies verstärkt den renalen Schaden, indem DC die T-Zellen zur Ausschüttung von Zytokinen und Rekrutierung weiterer CD8+ Zellen und Makrophagen anregen (60).

Als frühen antiinflammatorischen modulierenden Gegenpol rekrutieren unreife renale DC über den CXC-Chemokin-Liganden 16 (CXCL16) regulatorische iNKT-Zellen mit CXC-Chemokin-Rezeptor 6 (CXCR6) (61). CXCL16 stimuliert diese dazu, IL-4 und IL-10 zu sezernieren, worüber sie vermutlich die inflammatorische Wirkung der TH17- und TH1-Zellen abschwächen (21,61).

1.4.2 Funktion der T-Zell-Subtypen in der NTS

Während den ersten beiden Wochen der NTS werden durch DC, welche zuvor phagozytierte heterologe Antikörper als Antigen präsentieren, in renalen Lymphknoten T-Zellen rekrutiert, die hochspezifisch für die heterologen Antikörper sind (21). Erst 14 Tage nach Induktion der NTS werden ausreichend Antikörper von Plasmazellen gebildet, die nachfolgend im renalen Gewebe Iks mit den heterologen Anti-GBM-Antikörpern formieren, sich intrarenal ablagern und dadurch zur Nierenschädigung beitragen (21).

Die proinflammatorischen TH17-Zellen sind vier Tage nach NTS-Induktion vor Ort, sie bilden den CC-Chemokin-Rezeptor 6 (CCR6) und den retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t aus (21,62). Letzterer ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor nicht nur für TH17- sondern auch für die $\gamma\delta$ -T-Zellen (62). Im Sinne einer positiven Rückkopplung steigern TH17-Zellen ihre eigene Rekrutierung, indem sie Mesangialzellen stimulieren (63).

Die TH17-Zellen werden etwa am 10. Tag der NTS von den CXCR3+TH1-Zellen abgelöst, falls die Inflammation nicht stagniert oder sich zurückbildet (59).

Der Wechsel zu TH1-Zellen wird auch über das vermehrt vorhandene proinflammatorische IL-12 gefördert (64). Als APC für die TH1-Zellen fungieren die renalen DC, wobei vermehrt kostimulatorische Moleküle exprimiert werden (21). Die nun aktivierten TH1-Zellen wiederum aktivieren über IFN- γ Monozyten zur Differenzierung zu gewebsschädigenden Makrophagen (64). Sie stimulieren renale Zellen, wie Endothelzellen, mittels IL-1 zur Produktion von TNF- α und Stickstoffmonoxid (63,64). Über T-Zellen und Makrophagen als Effektorzellen vermitteln die CD4+TH1-Zellen demnach eine Immunantwort gegen Ablagerungen der heterologen Antikörper, die der verzögerten Hypersensitivitätsreaktion (DTH) ähnlich ist (64). Lokale Fibrinablagerung trägt zur Halbmondbildung bei und ist zusammen mit den zellulären Entzündungsmediatoren mit der DTH assoziiert (64).

An der Entstehung der Halbmonde sind auch Parietal- und Immunzellen beteiligt indem sie proliferieren (21). Den Stimulus dafür stellt die Aktivierung der TH1-Zellen dar, denn sie geschieht in enger räumlicher Beziehung zu diesen im periglomerulären Raum (15,21). Die Schwere der initialen Schädigung legt fest, inwiefern die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen T-Zellen im Gewebe gewährleistet werden kann und damit ob die renale Schädigung reversibel ist oder fortschreitet (21).

Zu einem späteren Zeitpunkt können CCR6+ und CCR7+ T_{reg} den zellvermittelten Schaden reduzieren (14). Denn sie produzieren IL-10 sowie den Programmed-Cell-Death-Ligand 1 (21). Vermutlich regulieren T_{reg} vorrangig die TH1-Zell vermittelte Immunantwort, wodurch von den TH1-Zellen weniger IFN- γ produziert wird (65). Sowohl in geschädigtem Nierengewebe als auch in renalen Lymphknoten fördern T_{reg} antiinflammatorische Immunreaktionen (65).

1.5 IL-33/ST2

1.5.1 Die Physiologie der IL-33/ST2 Achse

IL-33 wird seit 2005 als Mitglied der Familie der IL-1-Zytokine klassifiziert, nachdem es bei der Erstbeschreibung 1999 als Protein erkannt wurde (66,67). Zu den elf Mitgliedern der IL-1-Zytokin-Superfamilie zählen unter anderem IL-1 α , IL-1 β und IL-18, die stark inflammatorisch wirken (66). Die beiden letzteren werden von Makrophagen auf inflammatorische Reize hin produziert (49). IL-33 wird vorrangig von Zellen mit Barrierefunktion wie Epithel- und Endothelzellen produziert (66). Auch glatte Muskelzellen produzieren IL-33 (49). In Mäusen sind hohe IL-33 Level auf messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) in Magen, Lunge, Rückenmark, Gehirn und Haut nachweisbar, während niedrige Level in lymphatischem Gewebe, Milz, Pankreas, Niere und Herz nachweisbar sind (66).

Auch in ruhenden DC sowie aktivierten Makrophagen ist IL-33 im murinen System nachweisbar (66). Im Menschen ist IL-33 mRNA vorrangig in glatten Muskelzellen und Epithelzellen nachweisbar, in Fibroblasten und Keratinozyten lösen TNF- α und IL-1 β die IL-33 Expression aus (66). Im Gegensatz zu den murinen Zellen findet sich in menschlichen Zellen in aktivierten DC und nicht aktivierten Makrophagen IL-33 mRNA (66). Die genannten Zellen lagern es in ihrem Zellkern, wobei das ungekürzte Full-length-IL-33 vermutlich intranukleär genregulatorisch wirkt (68,69). Experimentelles Abschalten des Lokalisierungssignales von IL-33 hat zur Folge, dass es statt in den Zellkern zu gelangen konstitutiv sezerniert wird und somit stark erhöhte IL-33 Serumspiegel bedingt, die zu einer eosinophil betonten letalen systemischen Entzündungsreaktion führen (70). Nukleäres IL-33 dämpft die durch NF- κ B ausgelöste proinflammatorische Genexpression, indem es mit dem Transkriptionsfaktor interagiert (71). Es beeinflusst demnach die Transkriptionsregulation (70). Gleichzeitig fungiert IL-33 als nukleäres Alarmin und wird auf schädigende Stimuli hin transloziert und sezerniert (67). Im Rahmen dessen wird reifes IL-33 als extrazelluläres Zytokin von geschädigten Zellen passiv freigesetzt (68). Immunzellen sezernieren IL-33 aktiv, wobei die Basalrate während Entzündungsvorgängen gesteigert wird (67,68). Dies wird gesteigert durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IFN- γ , IL-4 und PAMPs (72).

Die zugehörigen Rezeptoren zu IL der IL-1-Superfamilie nennt man TLR-IL-1-Rezeptoren (TLR-IL-1R), sie aktivieren unter anderem den Transkriptionsfaktor NF κ B und Mitogen-activated protein (MAP)-Kinasen, die ihrerseits die Entzündungsreaktion fördern (49,66). Einer dieser Rezeptoren ist der Suppression of Tumorigenicity 2 Rezeptor (ST2) (68). Es handelt sich um einen gewebständigen Transmembranrezeptor (67). Er kommt hauptsächlich auf Mastzellen und TH2-Zellen vor (66). Weitere Zellen, die ihn exprimieren sind neben Kardiomyozyten die invarianten natürlichen Killer T-Zellen (iNKT), neutrophile Granulozyten, CD4⁺T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen, Endothelzellen, ILC und M2-Makrophagen (67) auch Fibroblasten, DC, eosinophile und basophile Granulozyten (73). Neben regulatorischer Eigenschaften bezüglich des TLR-IL-1R-Signalweges wird dem ST2-Rezeptor eine Rolle als Effektormolekül der Typ-2-Immunantwort zugeschrieben (66). IL-33 bindet spezifisch an den ST2-Rezeptor und vermittelt konträr zur intranukleären genregulatorischen Funktion dadurch unter anderem die Aktivierung von NF κ B sowie von MAP-Kinasen und löst eine Typ-2-Immunantwort aus, indem es Th2-Zellen zur Produktion der TH2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 stimuliert (49,66,72). Hierbei sind vorrangig ILC2 und CD4⁺-Zellen von Bedeutung (74). Die TH2-Immunantwort wird demnach über ST2+T-

Zellen verstärkt (75). Dahingegen vermitteln ST2+Makrophagen antiinflammatorische Reaktionen (75). Denn indem ILC2 aktiviert und Makrophagen polarisiert werden, beeinflusst die IL-33/ST2 Achse auch T_{reg}, wodurch die Immunantwort reguliert und Gewebereparaturvorgänge gefördert werden (72). Weiters kann IL-33 die TH1-Immunantwort unterstützen (72). Indem es die Differenzierung zu TH1- und TH17-Zellen anregt, fördert es die Expression von TNF- α , IFN- γ , IL-17A und IL-1 β (76).

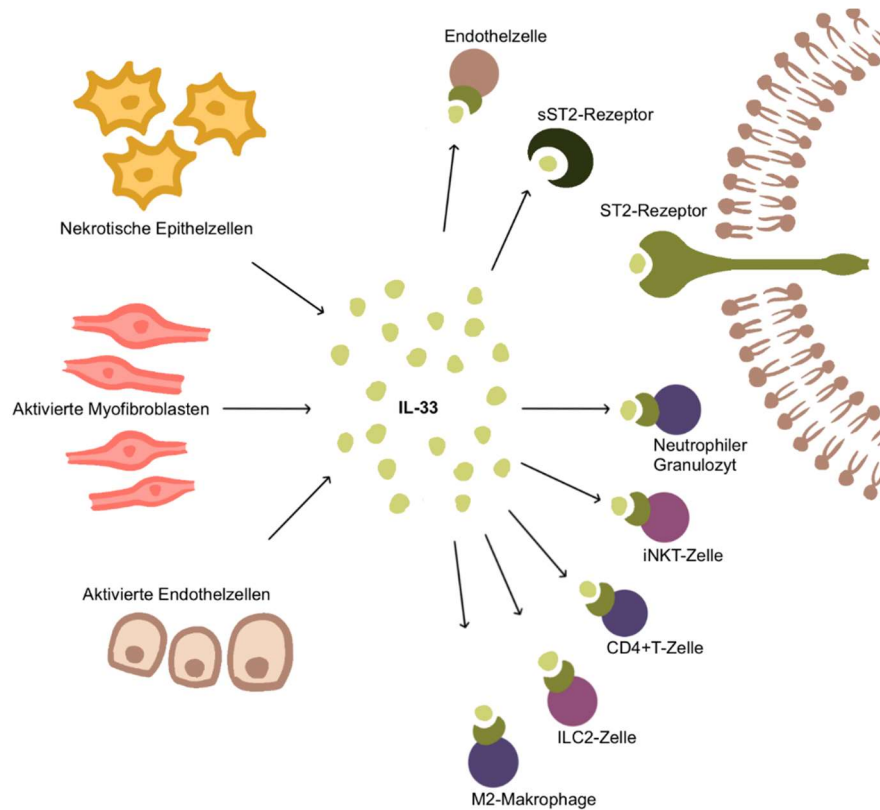


Abbildung 10: Beispiele IL-33 produzierender Zellen und ST2 exprimierender Zellen.

IL-33 wird passiv/aktiv sezerniert von geschädigten Epithelzellen, aktivierten Myofibroblasten und aktivierten Endothelzellen. Es bindet spezifisch an den ST2-Rezeptor, der unter anderem auf Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten, iNKT-Zellen, CD4+T-Zellen, ILC2 und M2-Makrophagen exprimiert wird. Der lösliche sST2-Rezeptor bindet IL-33 als Decoy-Rezeptor. Modifiziert nach Chen et. al (67).

Die Aktivität von IL wie IL-1 oder IL-18 wird durch lösliche Rezeptoren und spezifisch an sie bindende antagonistische Proteine, wie dem IL-18-bindenden-Protein, reguliert (66). Analog dazu gibt es hinsichtlich IL-33 den sST2-Rezeptor als lösliche Variante des ST2-Rezeptors, der im Gegensatz zu seinem gewebständigen Pendant keine Transmembrandomäne aufweist (67,72). Als Decoy-Rezeptor bindet er spezifisch an IL-33, ohne nachfolgende Aktivierung eines Signalweges (67). Dadurch wird die Aktivität von IL-33 am ST2-Rezeptor reguliert, denn das durch sST2 gebundene IL-33 kann dort keine Wirkung mehr entfalten (67).

So weist der IL-33/ST2-Signalweg sowohl antiinflammatorische und antiproliferative als auch inflammatorische und fibrogene Wirkungen auf (68). Nukleäres IL-33 wirkt antiinflammatorisch, indem es mit NF- κ B interagiert und dessen Wirkungen dämpft, während sezerniertes IL-33 über den ST2-Rezeptor NF- κ B aktiviert und dadurch proinflammatorische Effekte begünstigt (66,71). Im folgenden Kapitel wird diese Dualität anhand von Studien zur Funktion von IL-33/ST2 in Lunge, Leber und Herz erläutert um anschließend genauer auf die renale Funktion von IL-33/ST2 einzugehen.

1.5.2 IL-33/ST2 in der Lunge

Als Vermittler der Typ-2-Immunantwort spielt IL-33 eine Rolle in allergischen Atemwegserkrankungen, sowohl das immanente als auch das adaptive Immunsystem sind dabei involviert (74,77). Als Reaktion auf Allergene wird IL-33 im murinen System von Epithelzellen sezerniert und beeinflusst nachfolgend verschiedene Immunzellen (74). IL-33 führt sowohl in murinen als auch humanen naiven CD4⁺T-Zellen als Reaktion auf Allergene zu Proliferation und Differenzierung dieser und regt sie zur Produktion von IL-5 und IL-13 an (78). Im Sinne einer positiven Rückkopplung fördert dies ihre Proliferation, und erhöht durch Steigerung der ST2-Expression deren Sensibilität für IL-33 (74,78). Dies geschieht im murinen System einerseits über ILC2s, die auf IL-33 Stimulus hin die B-Zellproliferation steigern und wiederum Zytokine wie IL-5 und IL-13 produzieren (77). Andererseits aktiviert IL-33 dort ST2⁺ Zellen wie ILC und DC, welche zur Produktion von IL-6, TNF und IL1 β angeregt werden, wodurch vermehrt MHC II und kostimulatorische Moleküle exprimiert werden und CD4⁺T-Zellen wiederum zur Produktion von IL-5 und IL-13 angeregt werden (79). Weiters kann IL-33 die Funktion von T_{reg} dahingehend beeinträchtigen, dass sie die Proliferation von Effektor-CD4⁺T-Zellen weniger effektiv unterdrücken können (80). Dem entgegen steht die Begünstigung der Expansion und Funktion von T_{reg} durch IL-2, welches auf Stimulus von IL-33 von ILC2s, DC und Mastzellen produziert wird (81). Bei akuter Schädigung wird die Homöostase des Gewebes aufrechterhalten, indem IL-33 mit ILC2-Zellen interagiert, hierbei stehen antiinflammatorische Wirkungen im Vordergrund (49,74). IL-33 trägt jedoch auch zu chronischen Entzündungen über DC, TH2-Zellen, T_{FH}-Zellen und T_{reg} bei, wodurch proinflammatorische Vorgänge und Gewebeumbau begünstigt werden (74). Das von beschädigten Zellen sezernierte reife IL-33 verstärkt eine profibrogene Typ-2-Immunantwort über die Aktivierung von Makrophagen und ST2, wodurch Makrophagen vermehrt nicht-klassisch aktiviert werden (67). Dadurch tragen sie zu TH2-induzierter-

Atemwegsentzündung bei, während unreifes IL-33 unabhängig von Makrophagen und ST2 an pulmonaler Fibrose beteiligt ist (68). Der Gewebeumbau wird von IL-33 vermutlich über Fibroblasten, ILC2 und T_{reg} vermittelt (74).

1.5.3 IL-33/ST2 im Herzen

IL-33 wirkt über den ST2-Rezeptor kardioprotektiv, antihypertroph und antifibrotisch auf Kardiomyozyten (68). Die Behandlung mit IL-33 erschwert es in Ratten in einem Modell der kardialen Ischämie kardialen Fibroblasten, in gestresste Myokardareale einzuwandern (82). Hierbei induziert IL-33 anti-apoptotische Proteine und reduziert somit die Apoptose von Kardiomyozyten, die Größe des Infarktareals und das Ausmaß an Fibrosierung (82). Weiters hemmt IL-33 kardiale Fibroblasten und reduziert demnach profibrotische Reaktionen (83). Außerdem hat es bei der Hypoxie-induzierten Apoptose protektive Wirkung auf Kardiomyozyten (83). In isolierten Kardiomyozyten von Ratten inhibiert der Decoy Rezeptor sST2 diesen Effekt teilweise (68). Dessen Serumspiegel korreliert positiv mit dem Schweregrad an kardialer Fibrose, daher gilt sST2 als Marker für kardiale Fibrosierung (68). Bei Patient*innen mit kardiovaskulären Erkrankungen sind erhöhte sST2 Spiegel mit höherer Mortalität assoziiert (84). IL-33 wird eine protektive Rolle bezüglich der Formation atherosklerotischer Plaques zugeschrieben (85).

1.5.4 IL-33/ST2 in der Leber

Die Expression von IL-33 und ST2 ist sowohl in murinem als auch in humanem hepatischem Gewebe in fibrotisch verändertem Gewebe signifikant höher als in gesundem und korreliert mit dem Grad an Fibrose (68,86). Bei akuter massiver Schädigung der Leber zeigt IL-33 protektive Eigenschaften in murinem und humanem hepatischem Gewebe, während es bei chronischer Schädigung eher Fibrosierung des Gewebes zu begünstigen scheint (87). Die Gabe von IL-33 mildert in einem ernährungsinduziertem nicht-alkoholische Fettleber Modell im murinen System zwar die ernährungsinduzierte Verfettung der Leber, verschlimmert jedoch über den ST2-Rezeptor den Grad an Leberfibrose (88). Vermutlich wird in der Leber IL-33 vorwiegend von sinusoidalen Endothelzellen produziert, wobei in fibrotisch geschädigter Leber, wie Daten aus einem Gallengangs-Ligatur Modell zu hepatischer Fibrose zeigen, auch Hepatozyten (89) und Kupfferzellen eine wichtige Quelle zu sein scheinen (87). Letztere exprimieren den ST2 Rezeptor, dessen Aktivierung in isolierten murinen Kupfferzellen zu Sezernierung von Zytokinen und Kollagen führt (89). Die IL-33 vermittelte TH2-Immunantwort regt diese zur Proliferation an, was analog zur Lunge die Produktion von profibrotischem IL-4, IL-5 und IL-13 verstärkt (87). IL-13 regt

wiederrum die Kupfferzellen zur Differenzierung an und aktiviert sie, wodurch vermehrt Kollagen exprimiert wird (68,86,89). Über den ST2-Rezeptor werden außerdem ILC2s aktiviert, was wiederum zur Sezernierung der TH2-Zytokine IL-5 und IL-13 führt (86). ST2-Rezeptor-defiziente Mäuse zeigen in einem Karbontetrachlorid abhängigen Modell der hepatischen Fibrose einen reduzierten hepatozellulären Schaden, eine reduzierte Einwanderung proinflammatorischer Zellen sowie weniger Fibrose (86).

1.5.5 IL-33/ST2 in der Niere

Als Reaktion auf renale Noxen wie Ischämie, Urämie, Bakteriämie und nephrotoxische Medikamente folgen Entzündungs- und Gewebereparaturvorgänge, die unter anderem von IL-33 vermittelt werden (67). Sobald es von geschädigten Zellen sezerniert wurde, macht IL-33 als nukleäres Alarmin benachbarte Zellen über ST2 auf Gewebeschaden aufmerksam und spielt damit auch in der Niere in der Initiierung immanenter und adaptiver Immunantworten eine Rolle (67).

Die IL-33/ST2-Achse scheint neben der Vermittlung von Typ-2-Immunantworten im Rahmen entzündlicher Erkrankungen überdies zur Entstehung von Autoimmunität beizutragen, indem es das Verhältnis von TH1/TH17-T-Zellen zu T_{reg} beeinflusst, welches bei Autoimmunerkrankungen gestört ist (76). Diese Zellpopulationen sind wesentlich in der Pathogenese der NTS (21). Verschiedenste Studien untersuchten bereits die Rolle von IL-33/ST2 in experimentellen Modellen von Nierenschädigung in Mäusen, die Ergebnisse werden im Nachfolgenden dargestellt. Zuerst wird die Lokalisation von IL-33 produzierender Zellen und ST2 exprimierender Zellen in der Niere erläutert. Danach werden Studiendaten zu proinflammatorischer Rolle des Signalweges den Studiendaten zu antiinflammatorischer Rolle gegenübergestellt.

1.5.5.1 Lokalisation IL-33 produzierender Zellen und des ST2-Rezeptors in der Niere

In murinen Nieren aus cDNA-Libraries sind niedrige Spiegel an IL-33 mRNA nachweisbar (66). IL-33 wird in der Maus von aktivierten Endothelzellen in entzündetem Gewebe exprimiert, wobei keine konstitutive Expression, wie sie sich in Menschen zeigt, nachweisbar ist (90). Im murinen Modell der Unilateralen Urinalen Obstruktion (UUO) ist IL-33 mittels IF in tubulointerstitiellen Zellen mit Koexpression von Vimentin und α -Smooth Muscle Actin, also Myofibroblasten, nachgewiesen (69,91). Hier nimmt die IL-33 Expression mit fortschreitender Dauer der UUO zu (69,91). Diese Myofibroblasten sind in der Nierenrinde und dem Bereich der Rinden-Mark-Grenze lokalisiert (69). Perizyten, die

als kontraktile Zellen unter anderem in Kapillarwänden vorkommen, exprimieren auch IL-33 (69). Chen et al. identifizieren peritubuläre Endothelzellen als Quelle von IL-33, während Gatti et al. in diesen Zellen kein IL-33 nachweisen können (69,91). In glomerulären Zellen ist bisher kein IL-33 nachweisbar (67). Mittels IHC zeigt sich in einem UUO Modell in murinen Nieren hohe Expression von IL-33 in Tubulusepithelzellen (92). Ferhat et al. weisen in periglomerulären und peritubulären Zellen IL-33 nach, welches innerhalb einer Stunde nach Auslösen des Ischemia-Reperfusion-Modells (IRI) bereits zu einem Großteil aus diesen Zellen sezerniert wird (93). Ebenso zeigen sich Leukozyten in UUO ohne Nachweis für IL-33 (69). In menschlichen Nieren exprimieren Endothelzellen peritubulärer Kapillaren konstitutiv IL-33 (94). Bei Patient*innen mit systemischer Sklerose bleibt dies jedoch in fibrosierten Nieren aus (95).

Zur Lokalisierung des ST2 Rezeptors zeigt sich in Patient*innen mit Abstoßungsreaktion auf ihr Nierentransplantat mittels IHC höhere renale ST2 Expression im Bereich des Tubulussystems und des Interstitiums (96). In der Niere von Patient*innen mit systemischer Sklerose wird ST2 glomerulär, tubulär und in peritubulären Kapillaren exprimiert, während in gesunden Kontrollen wenig bis keine ST2 Expression nachgewiesen werden kann (95). Die Expression von ST2 ist in verschiedenen Immunzellen nachweisbar, die auch in der Niere vorkommen, wie etwa Mastzellen und TH2-Zellen (97). Dazu zählen weiters T_{reg} Zellen, die durch IL-33 über IL-2 von DC zur Expansion angeregt werden (81,98). Weiterhin exprimieren eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten, DC, iNKT-Zellen und Makrophagen ST2 (73). In der murinen Niere wird nach UUO im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermehrt ST2 in Makrophagen, ILCs, neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert (99). Es ist derzeit jedoch noch nicht gänzlich geklärt, welche Zellen in der Niere ST2 exprimieren können und welche Rolle diese dabei spielen (67,100).

In einem human-murinen Graft-Versus-Host-Disease-Modell sind als Quelle für sST2 sowohl TH1-, TH2-, TH17-Zellen, intestinale Stromazellen sowie Endothelzellen identifiziert (101). Auch Fibroblasten, Mastzellen und Epithelzellen exprimieren sST2 (100).

1.5.5.2 IL-33 und immanente lymphoide Zellen in der Niere

ILC2s sind gewebsständige Zellen, die auch in der Niere vorhanden sind (49). Lokalisiert werden diese mittels IHC tubulointerstitiell sowohl in der Nähe als auch Ferne von peritubulären Kapillaren sowie in Glomeruli (102).

In gesundem Gewebe reagieren diese über den ST2 Rezeptor auf IL-33, während in inflammatorischem Gewebe hauptsächlich IL-25 die Proliferation von ST2-negativen inflammatorischen ILC2s anregt, welche unter anderem als Vorläuferzellen für ST2+ILC2s zu dienen scheinen (103). ILC2s begünstigen eine Typ-2-Immunantwort, die sich auf Nierenschädigung protektiv auswirkt (103). Generell tragen ILC2s zur M2-Aktivierung von Makrophagen über IL-13 bei, es sind allerdings TH2-Zellen hierfür unabdingbar, denn ILC2s alleine können dies nicht aufrecht erhalten (49). Die M2-Makrophagen schwächen inflammatorische Reaktionen und tragen zu Gewebereparaturvorgängen bei (103). ILC2s fördern weiterhin die Differenzierung von T-Zellen zu TH2-Zellen sowie deren Expansion und Aktivierung, letzteres gilt auch für T_{reg} (103). Da sie MHC II exprimieren, können sie als APC fungieren und wiederum das adaptive Immunsystem aktivieren (103).

ILC2s begünstigen in der Niere in einem Modell zu IRI auf Stimulus von IL-25 über vermehrte Ausschüttung von TH2-Zytokinen eine Polarisierung von Makrophagen zum M2 Phänotyp (104). Da diese protektiv auf geschädigte Tubulusepithelzellen wirken, schwächen ILCs den renalen IRI bedingten Schaden (104). Weiters verminderte der adoptive Transfer von ILC2s die IRI-bedingte Schädigung in der Niere (104). In der Lunge vermittelt IL-33 über die ST2+ILC2s Gewebereparaturvorgänge (74). Dies wurde auch in der Niere in einem Modell zu Adriamycin-induzierter Glomerulosklerose durch eine Population von ST2+ILC2 gezeigt (102).

1.5.5.3 Daten zu antiinflammatorischer Wirkung

Zwei Studien zeigen eine antiinflammatorische Wirkung von IL-33, zum einen in einem Modell des murinen renalen IRI und zum anderen im Modell der Adriamycin induzierten Glomerulosklerose (102,105). Hierbei vermindert die kurzzeitige Verabreichung von IL-33 den renalen Schaden über die Expansion von ILC2s und indem eine Typ-2-Immunreaktion begünstigt wird (102,105).

Riedel et al. zeigen eine ST2+ILC2 Population in der gesunden menschlichen und murinen Niere (102). Diese wird durch kurzzeitige Behandlung mit IL-33 fünf Tage nach Induktion der Schädigung zur Expansion angeregt, wodurch die Adriamycin-induzierte Glomerulosklerose und der Grad an Nierenfunktionseinschränkung gemildert werden (102). Eosinophile Granulozyten sind im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt vorhanden und für die protektive Wirkung von ILC2s und damit IL-33 unbedingt notwendig (102). Die gezeigte Vermehrung an eosinophilen Granulozyten und von M2-Makrophagen zusammen mit verminderter Infiltration an neutrophilen Granulozyten und mononukleären Phagozyten

deuten auf eine Veränderung der Immunantwort durch ILC2s zu antiinflammatorischem Milieu hin (102). Die erhöhten Spiegel an IL-5 und IL-13 werden den ILC2s zugeschrieben (102). T_{reg} sind nach IL-33 Gabe vermehrt in Niere, Milz und Blut vorhanden, während $\gamma\delta T$ -Zellen vermindert sind (102). In Adriamycin induzierter Glomerulosklerose hatte kurzzeitige Gabe von IL-33 demnach eine protektive, antiinflammatorische Wirkung (102). Cao et al. beschreiben ebenfalls eine nephroprotektive Wirkung für die IL-33 induzierte Expansion von renalen ILC2s (105). Die kurzzeitige Gabe von niedrigdosiertem (0,3 μ g) rekombinantem IL-33 für fünf Tage konsekutiv mit nachfolgendem Auslösen des renalen IRI verhindert strukturellen und funktionellen Nierenschaden und reduziert die Mortalität (105). Die IL-33 Gabe führt zu vermehrtem Vorkommen von ILC2, T_{reg} und M2-Makrophagen (105). ILC2 kommt eine besondere Bedeutung zu, denn in Mäusen ohne ILC2 Expression ist der protektive Effekt von IL-33 auf IRI vollständig aufgehoben (105). Bei fehlender Expression von T_{reg} ist dies nicht der Fall und in Makrophagen-defizienten Mäusen nur teilweise (105). Daher wird den ILC2s die protektive Wirkung zugeschrieben (105). Der protektive Effekt von IL-33/ILC2s wird hauptsächlich auf M2-Makrophagen sowie die Produktion von Amphiregulin durch die ILC2s zurückgeführt (105). Verminderte Expression von Markern für Kollagensynthese und Myofibroblasten 28 Tage nach Auslösen des renalen IRI mit vorangegangener IL-33 Gabe deutet auf eine antifibrotische Wirkung von niedrigdosiertem kurzzeitig verabreichten IL-33 hin (105). Die protektive Wirkung der Verabreichung von IL-33 wird in diesen beiden Untersuchungen demnach der Expansion von renalen gewebsständigen ILC2s zugeschrieben (102,105).

Matta et al. zeigen in Lymphknoten und der Milz die Expansion von ST2+ T_{reg} durch IL-2 auf einen Stimulus mit IL-33 (81). IL-33 regt DC zur Ausschüttung von IL-2 an, was in weiterer Folge neben der Expansion von ST2+ T_{reg} auch die Expression des ST2 Rezeptors auf T_{reg} und DC erhöht (81). IL-33 begünstigt darüber hinaus über DC die TH2-Immunantwort in CD4+T-Zellen, die dadurch weniger TH1- und TH17-assoziierte Zytokine ausschütten (81).

Stremska et al. untersuchten die Verabreichung von IL-2 und IL-33 zusammen in renalem IRI, wobei Mäuse durch Verabreichung der Zytokine in kombinierter Form vor IRI besser geschützt sind als durch die Gabe jedes der Zytokine einzeln (98). In lymphatischen Organen zeigt sich eine Vermehrung von T_{reg} (98). Die Gabe des Hybridzytokins IL233 erzielt eine noch stärkere Milderung des IRI-induzierten Schadens (98). Die hierbei beobachtete erniedrigte Anzahl an T_{reg} in der Milz bei jedoch erhöhter Anzahl an T_{reg} in der Niere legt nahe, dass durch IL233 T_{reg} aus der Milz in die geschädigten Nieren rekrutiert wurden (98).

Die T_{reg} der Mäuse, die das Hybridzytokin bekamen, können die CD4⁺T-Zell Proliferation effektiver unterdrücken als die der Kontrollen (98). Stremaska et al. zeigen eine ST2+T_{reg} Population in Mäusen, wobei IL-2 zu vermehrter Expression des IL-33 Rezeptors ST2 in T_{reg} führt (98). Dies kann vermutlich in Form eines Hybridzytokines effizient von dem unmittelbar vorhandenen IL-33 genutzt werden (98). Das Hybridzytokin führt weiterhin zu Vermehrung von ST2+ILC2s im Blut und in der Niere (98). Adoptiver Transfer dieser ILC2s Zellpopulation mildert den IRI-induzierten Schaden (98). Hier wirkt also IL-33 in Kombination mit IL-2 über Proliferation von T_{reg} sowie ILC2s protektiv in einem renalen Modell des IRI in Mäusen (98).

1.5.5.4 Daten zu proinflammatorischer Wirkung

Proinflammatorische Wirkung von IL-33 wurde bisher bereits in verschiedenen Modellen zu Nierenschädigung nachgewiesen, darunter Modelle zu SLE, toxischem Nierenversagen, IRI und UUO (100). Im Folgenden werden diese gruppiert nach Modellen dargestellt.

Li et al. weisen in einem murinen SLE-Modell für die Blockade von IL-33 einen protektiven Effekt nach (106). Hierbei wurden die kranken Mäuse von Woche 14 bis Woche 20 insgesamt sechs Wochen lang jeden zweiten Tag mit einem IL-33 Antikörper behandelt (106). Der protektive Effekt zeigt sich neben der Verminderung von anti-Doppelstrang-DNA-Serumspiegeln, Proteinurie und Immunkomplexablagerungen auch in verminderter Mortalität (106). Wie sich weiters in der Erhöhung von T_{reg} und myeloischen Suppressorzellen sowie der Verminderung an TH17-Zellen, IL-1 β , IL-6, und IL-17 durch die Verabreichung des IL-33 Antikörper zeigt, ist die protektive Wirkung der Blockade von IL-33 vermutlich auf eine Expansion von T_{reg} und myeloischen Suppressorzellen sowie die Inhibition von TH17-Zellen zurückzuführen (106).

Chen et al. zeigen eine vermehrte Expression von IL-33 in der Niere nach UUO (91,99). In der durch UUO geschädigten Niere sind neben Makrophagen, T-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten auch ILC2s vermehrt vorhanden, wobei deren ST2 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne UUO erhöht ist (99). Sowohl in IL-33 defizienten Mäusen als auch in ST2 defizienten Mäusen wird eine Milderung der Urothelhyperplasie nachgewiesen (99). In IL-33 defizienten Mäusen zeigt sich eine Abschwächung der vermehrten Expression der Typ-2-Zytokine IL-5 und IL-13, die durch UUO ausgelöst wird (99). In IL-33 defizienten Mäusen ist ein geringerer Verlust an Tubulusepithelzellen nachweisbar (99). Demnach trägt IL-33 in UUO vermutlich durch die Typ-2-Immunantwort einen Teil zum Integritätsverlust des Urothels bei (99).

Li et al. weisen ebenfalls in UUO erhöhte Expression von IL-33 und ST2 nach (92). Die Verabreichung von IL-33 an dem Tag, an welchem die UUO durchgeführt wurde, verstärkt das Ausmaß an renaler Fibrose und führt zu vermehrter Infiltration der Nieren mit Makrophagen, welche vermehrt alternativ aktiviert sind und IL13 und TGF β 1 sezernieren (92). Demnach verschlimmert IL-33 den durch UUO bedingten Schaden über M2-Makrophagen (92).

Nach Zhu et al. bewirkt IL-33 dosisabhängig in vitro die Transformation von Monozyten, welche aus dem Knochenmark stammen, zu Fibroblasten, was sich in verstärkter Expression von α -SMA und Fibronectin zeigt (107). Durch Verabreichung des Signalwandler und Aktivator der Transkription 3-Inhibitors BP-1-102 kann diese Transformation in vitro vermindert werden (107). Weiters wird durch BP-1-102 die renale interstitielle Fibrose in UUO gemildert (107). IL-33 kann demnach einen profibrotischen Effekt in UUO haben (107).

Gatti et al. beschreiben in murinen Nieren in UUO für nukleäres IL-33 anfangs einen die Fibrose inhibierenden Effekt, wobei kontinuierliche Stimulation des Signalweges die Progression der renalen Schädigung und des fibrotischen Umbaus fördert (69). Auf mRNA Ebene zeigen sie eine konstant zunehmende IL-33 Expression an Tag eins, sieben und 21 nach Durchführung des UUO Modelles (69). Es wird vermutet, dass nukleäres IL-33 vermutlich antifibrotisch wirkt, indem es in interstitiellen Zellen die Transkription profibrotischer Gene und damit die Produktion extrazellulärer Matrix und die Aktivierung von Myofibroblasten hemmt (69). Dies zeigt sich durch die begünstigte Genexpression von Kollagen und Bestandteilen der Extrazellulärmatrix durch die Inhibition von IL-33 in Fibroblasten (69). Da dieser Effekt weder durch die Gabe von IL-33 Antikörpern noch in ST2 defizienten Mäusen reproduziert werden kann, wird der antifibrotische Effekt nukleärem und nicht extrazellulärem IL-33 zugeschrieben (69). TGF- β scheint als profibrotisches Zytokin die Hemmung von IL-33 zu beschleunigen (69). Nukleäres IL-33 wirkt also nach Gatti et al. möglicherweise proinflammatorisch, denn die Depletion von IL-33 unterdrückt Gene, die inflammatorische Reaktionen vermitteln (69). Dies zeigt sich in der Verminderung von IL-6+Zellen in IL-33 defizienten Mäusen (69). Anhaltender zellulärer Stress fördert jedoch die Sezernierung von IL-33 in den Extrazellulärraum, wodurch zum einen weniger IL-33 nukleär wirken kann und zum anderen über ST2 profibrotische Effekte gefördert werden, wie in UUO gezeigt wird (69). Laut Gatti et al. wird dadurch die antifibrotische Wirkung des nukleären IL-33 außer Kraft gesetzt (69).

Ferhat et al. beschreiben IL-33/ST2 als schädigend in murinem renalem IRI, da IL-33- und ST2 defiziente Mäuse verminderten frühen Schaden an Tubulusepithelzellen, verbessertes Überleben und eine erhaltene Nierenfunktion aufweisen (93). In IL-33 defizienten Mäusen infiltrieren weniger IFN- γ /IL-17A produzierende neutrophile Granulozyten die Niere, ebenso findet man weniger myeloische DC, NK- und iNKT-Zellen in diesen Mäusen (93). Vermutlich wird IL-33 bei renalem IRI rasch von Endothelzellen aus peritubulären und periglomerulären Kapillaren sezerniert (93). Nachfolgend rekrutiert und aktiviert dieses in renalem IRI in murinen Nieren ST2+iNKT-Zellen zur Produktion von IFN- γ und IL-17A, was die Infiltration von Nierengewebe durch neutrophile Granulozyten nach sich zieht, die ebenfalls IFN- γ und IL-17A produzieren (93).

Liang et al. beschreiben IL-33 als mitverantwortlich für IRI-induzierte renale Fibrose (108). Sie können erhöhte Spiegel an IL-33 im renalen Modell des IRI zeigen, sowie eine verstärkte renale Fibrose in diesem Modell in Mäusen nach Verabreichung von IL-33 gegenüber Mäusen ohne Behandlung mit IL-33 nachweisen (108). Die Gabe von sST2 für 14 Tage nach Induktion des renalen IRI mildert den renalen Funktionsverlust, die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, die Bildung von Myofibroblasten und damit das Ausmaß an renaler Fibrose (108).

Akçay et al. stellen im Modell des Cisplatin-induzierten akuten Nierenversagens die pathogene Rolle von IL-33/ST2 über die CD4+T-Zell mediierte Produktion von CXCL1 fest (109). Indem den Mäusen eine hohe Dosis an rekombinantem IL-33 verabreicht wird, verschlechtert sich das akute Nierenversagen, durch Erhöhung der CD4+T-Zell Infiltration, des Kreatininspiegels und der akuten Tubulusnekrose (109). Darunter ist der Spiegel des proinflammatorischen Zytokin CXCL1 in den Nieren dieser Mäuse erhöht (109). Die Gabe von sST2 bewirkt eine Verminderung der CD4+T-Zell Infiltration, der Glomerulosklerose, des Kreatininspiegels und der akuten Tubulusnekrose (109). In CD4+T-Zell defizienten Mäusen können die Ergebnisse durch Gabe von IL-33 nicht repliziert werden jedoch ist in CXCL1 defizienten Mäusen der Kreatininspiegel verringert, daher wird die Wirkung von IL-33 über CXCL1 auf CD4+T-Zellen zurückgeführt (109).

Park et al. weisen in einem Ovalbumin-induzierten Modell des akuten Nierenversagens eine Verminderung des tubulären Schadens durch Verabreichung von anti-IL-33 nach (110). Objektiviert wird dies anhand des Markerproteins für Nierenschaden Kidney-Injury-Molecule-1, dessen mRNA und Proteinmenge nach Gabe von anti-IL-33 reduziert nachweisbar ist (110).

Verstärkte Aktivierung des IL-33/ST2 Signalweges in der Niere trägt vermutlich zur Epithel-Mesenchym-Transition renaler Zelltypen wie Podozyten, Tubulusepithelzellen und auch Fibrozyten zu Fibrose bei (68,91).

Zum einen beeinflusst IL-33/ST2 demnach also Immunzellen zu proinflammatorischen und profibrotischen Effekten, zum anderen sind auch nicht-Immunzellen davon betroffen und werden zu profibrotischen Wirkungen angeregt.

1.5.5.5 Vordaten und Hypothese

Die Arbeitsgruppe Experimentelle Nephrologie Graz untersuchte die Funktion von IL-33/ST2 in der NTS in Wildtyp (WT) Mäusen. Mäuse, in denen die NTS induziert wurde, zeigen signifikant höhere Spiegel an IL-33 sowie ST2 an Tag 14 nach Induktion der NTS. Unter Verabreichung verschiedener Dosen an rekombinatem IL-33 (0,1-0,5µg) beginnend drei Tage nach Induktion der NTS für 14 Tage zeigte sich die NTS aggraviert. Mit steigender Dosis an IL-33 verstärkte sich der tubuläre Schaden, der Grad an Glomerulosklerose sowie die Anzahl infiltrierender Makrophagen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen.

Basierend auf diesen Vordaten wurde die Hypothese formuliert, dass der Aktivierung der IL-33/ST2 Achse im murinen Modell der NTS eine pathogene Rolle zukommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente geplant, um die Auswirkung der Defizienz von ST2 und damit die fehlende Aktivierung der IL-33/ST2 Achse in der NTS zu evaluieren.

Hierzu wurde in dieser Studie in St2^{-/-} und in WT Mäusen die NTS induziert und nachfolgend Nierenfunktionsparameter bestimmt. Weiters wurden die Nieren dieser Mäuse immunhistochemisch analysiert und es erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse verschiedener Zellen in Milz und Lymphknoten.

Mittels durchflusszytometrischer Analyse von Milzgewebe und Lymphknoten wurde außerdem das Expressionsmuster von ST2 in Zellpopulationen gesunder WT Mäuse dem nephritischer WT Mäuse gegenübergestellt, um den prozentualen Anteil an ST2 exprimierenden Zellen verschiedener Zellpopulationen aufzuzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Die Zusammenstellung der Versuchspopulation und Studiendesign

Als WT Mäuse wurden 8-12 Wochen alte männliche Mäuse mit C57BL/6J Hintergrund (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Männliche ST2 Knockout Mäuse (St2^{-/-}; zur Verfügung gestellt von Dr. Andrew McKenzie, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK (111)) waren ebenfalls auf C57BL/6J Hintergrund. St2^{-/-} Mäuse exprimieren weder den gewebständigen Rezeptor ST2 noch den löslichen Rezeptor sST2. St2^{-/-} Mäuse zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten zu WT Mäusen und haben eine normale Lebenserwartung. Das österreichische Ministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung hat, für die im Folgenden hier beschriebenen Tierversuche, eine Genehmigung erteilt (Nr.: BMWFW-66.010/055-WF/V/eb/2015).

St2^{-/-} Mäuse wurden am Zentrum für Biomedizinische Forschung der Medizinischen Universität Graz in het/het Verpaarungen gezüchtet. St2^{-/-} und WT Mäuse waren jeweils Wurfgeschwister. Sie wurden genotypisiert und bei Vorliegen des passenden Genotyps für das Experiment ausgewählt. Insgesamt wurden zehn St2^{-/-} Mäuse und neun WT Mäuse für die NTS Experimente und zehn WT Mäuse wurden für die Expressionsstudie ausgewählt.

Die Mäuse wurden stets artgerecht in einem pathogenfreien Raum im Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der medizinischen Universität Graz gehalten. Ein adäquater Tag-Nacht-Rhythmus von zwölf Stunden wurde ebenso gewährleistet, wie freier Zugang zu Wasser und geeignetem Standardfutter für Nagetiere.

In zwei voneinander unabhängigen Versuchsreihen wurden wie zuvor beschrieben in WT und St2^{-/-} Mäusen die NTS induziert, Urinproben an Tag 7 und 14 entnommen und die Tiere wurden 14 Tage nach Induktion der NTS mittels zervikaler Dislokation sakrifiziert. Es wurde die Milz, der inguinale und der paraaortale Lymphknoten und die Niere entnommen. Ein Drittel der Milz sowie die Lymphknoten wurden sofort für die weitere Evaluierung mittels Durchflusszytometrie verwendet. Die Nieren wurden in Formalin fixiert und in OCT gefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren gelagert. Die restlichen zwei Drittel Milz wurden in flüssigem Stickstoff weggefroren.

2.1.1 DNA-Genotypisierung

Mithilfe des DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) wurde die genomische DNA der Mäuse isoliert. Als Gewebeprobe dienten Gewebestücke, die zu Zwecken der Identifizierung aus dem Ohr der Mäuse gestanzt wurden. Diese Gewebestücke

wurden jeweils in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß platziert. Um die Zellyse zu induzieren, wurden je 180 µL ATL-Puffer hinzugefügt und 20 µL Proteinase K. Nachdem dies gut gemischt wurde, inkubierte es bei 56° im Thermozykler bis zum nächsten Tag. Direkt vor dem nächsten Schritt wurde es erneut für 15 Sekunden gut gemischt, dann wurden 200 µL AL-Puffer zugegeben. Wiederrum wurde gemischt und anschließend für 10 Minuten bei 56° inkubiert. Nun wurde in jedes Gefäß 200 µL Ethanol (96-100%) zugegeben und gut gemischt. Nachfolgend wurde der Gefäßinhalt in eine DNeasy Mini Spin Column, die in einem 2 mL fassenden Sammelröhrchen platziert ist, pipettiert und bei 6000 x g (8000 rpm) für eine Minute zentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand samt Sammelröhrchen wurde verworfen und die DNeasy Spin Column in ein neues 2 mL fassendes Sammelröhrchen platziert. Nun wurde in jedes Gefäß 500 µL AW1-Puffer pipettiert und im Anschluss ein weiteres Mal für eine Minute bei 6000 x g zentrifugiert. Wiederrum wurde der abzentrifugierte Überstand zusammen mit dem Sammelröhrchen entsorgt, damit die DNeasy spin column in ein neues Sammelröhrchen platziert werden konnte. Nun wurde in jedes Gefäß 500 µL AW2- Puffer pipettiert und die Gefäße wurden für drei Minuten bei 20000 x g (14.000 rpm) zentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand und das Sammelröhrchen wurden abermals verworfen. AW1 und AW2 Puffer eliminieren die überbleibenden Kontaminanten und Enzyminhibitoren. Die DNeasy spin column wurde anschließend in ein neues 1,5 mL fassendes Eppendorf-Röhrchen platziert, woraufhin in dasselbe Röhrchen 200 µL AE-Puffer (bestehend aus 10mM Tris-Cl, 0,5mM Ethylendiamintetraacetat, pH 9.0) pipettiert wurde. Im nächsten Schritt wurden die Gefäße für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert um danach bei 6000 x g (8000 rpm) für eine Minute zentrifugiert zu werden. Nun lag DNA vor, die im Anschluss mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) zur Genotypisierung herangezogen wurde.

2.1.2 Genotypisierungs-PCR und Gelelektrophorese

Die PCR diente hier zur genetischen Zuordnung der Mäuse zu der WT Gruppe (+/+), Heterozygoten-Gruppe (+/-) oder der Knockout-Gruppe (-/-). Sie funktioniert nach dem Prinzip der Vervielfältigung von Genabschnitten, die dann in einem Gel unterschiedlich weit wandern. Durch die Auswahl von Primern kann bestimmt werden, welche Genabschnitte amplifiziert werden sollen. Dies geschieht nur, wenn die entsprechende Erbinformation in der Probe vorhanden ist. Die PCR selbst setzt sich aus wiederholten Zyklen von drei Schritten zusammen. Im Denaturierungsschritt werden die beiden Stränge der vorliegenden DNA bei 94°C voneinander getrennt, im Annealingschritt lagern sich die Primer bei zumeist

55°C an die nun vorliegenden DNA-Einzelstränge an. Im Amplifikationsschritt werden bei 72°C durch die DNA-Polymerase an jeden DNA-Einzelstrang ausgehend von den Primern die passenden komplementären Basenpaare angelagert, die im Mastermix als Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) zugegeben werden. Dadurch entsteht aus jedem DNA-Einzel- ein DNA-Doppelstrang. Jeder durchlaufene Zyklus dieser drei Schritte verdoppelt also die vorliegende DNA. Hierbei beeinflusst die Magnesiumchloridkonzentration die Genauigkeit der Polymerase, sowie den Schmelzpunkt der dsDNA. Durch die Gelelektrophorese werden die zum Teil vervielfältigten DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt und bilden Banden, die durch UV-Licht sichtbar gemacht werden. Durch das Verwenden von DNA-Leiter, Positiv-, Negativ- und WT-Kontrolle sowie die Kenntnis der Größe der gesuchten Genabschnitte konnten die Proben hinsichtlich des Vorhandenseins des ST2-Rezeptors analysiert und miteinander verglichen werden. (112)

Der für die PCR benötigte Mastermix enthielt folgende Substanzen: 24 µL dNTP (Invitrogen Corporation, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Kalifornien, USA) [10 mM]; 1,2 µL 10xPCR-Puffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA); 0,6 µL Primer 1 (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland) [20 µM]; 0,6 µL Primer 2 (Eurofins Genomics Germany GmbH) [20 µM]; 0,3 µL MgCl₂ (Invitrogen Corporation) [50 mM]; 7,0µL H₂O und 0,3 µL RedTaq Polymerase (Sigma-Aldrich). Die Primer enthielten die Sequenzen:

mST2-39422S: 5'-GAC CTG TAT AAT TGG ACA GCA CCT G-3'

Neo 610 S: 5'- CTA TTC GGC TAT GAC TGG GCA CAA C-3'

mST2-39825A: 5'- GGG TAG GAA ATG CAA CCA GAA GTG C-3'

Der Mastermix für die WT PCR enthielt den mST2-39422S Primer und den mST2-39825A Primer, die Produkte weisen eine Größe von 404 bp auf. Der Mastermix für die St2^{-/-} PCR enthielt den Neo 610 S Primer und den mST2-39825A Primer, die Produkte hier weisen eine Größe von 1000 bp auf.

Für jede Probe wurden je zwei 0,2 mL PCR-Reaktionsröhrchen (Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Österreich) vorbereitet. Zu 10 µL des Mastermixes wurden je 2 µL DNA gegeben. Zusätzlich wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle sowie eine bekannte WT Kontrolle zu je 2 µL mit 10 µL Mastermix gemischt. Die Proben wurden in den Thermozykler gegeben und anschließend wurde so mit dem für die RedTaq-Polymerase und den Primern passendem Programm die PCR durchlaufen. Für die verwendeten Primer wurde zyklisch für 35 s auf 94°C, gefolgt von 35 s auf 60°C erwärmt. Für die

Gelelektrophorese wurde zuerst das benötigte Gel hergestellt. So wurden 2g Agarose in 100ml 0,5% TRIS-Acetat-EDTA-Puffer aufgelöst, sowie 10 μ L GelRed (Biotium, Inc., Fremont, Kalifornien, USA) hinzugefügt, sodass es in einer Konzentration von 1:10000 in den 100mL vorlag. Nachdem es für zwei Minuten in der Mikrowelle erhitzt wurde, wurde es in eine Kammer gegossen, die zwei Kämme enthielt. Während das Gel für 45 Minuten abkühlte, bildeten sich durch diese Kämme insgesamt 40 kleine Vertiefungen. Das abgekühlte feste Gel wurde in eine Elektrophorese Kammer gegeben, welche mit 0,5% TRIS-Acetat-EDTA-Puffer angefüllt war. Jede Probe wurde mit 2 μ L Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) beladen, die Mischung wurde suspendiert. Anschließend wurden von jeder Probe, der Negativ- und der Positivkontrolle 10 μ L in je eine Vertiefung im Gel pipettiert. Außerdem wurden 3 μ L der DNA-Leiter in die erste Vertiefung jeder Reihe pipettiert. Diese enthielt 100 verschiedene Basenpaare, die eine Leiter an DNA-Banden bildeten, welche als Vergleich für die Proben zur Auswertung dienten. Die Kammer wurde bei 80V und 400A für 45 Minuten lang unter Strom gesetzt. Im Anschluss wurde das Gel in die UV-Kammer des Bio Rad ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, Kalifornien, USA) transferiert. Jede Probe wurde auf diese Weise hinsichtlich ihrer genetischen Ausprägung des ST2-Rezeptors analysiert.

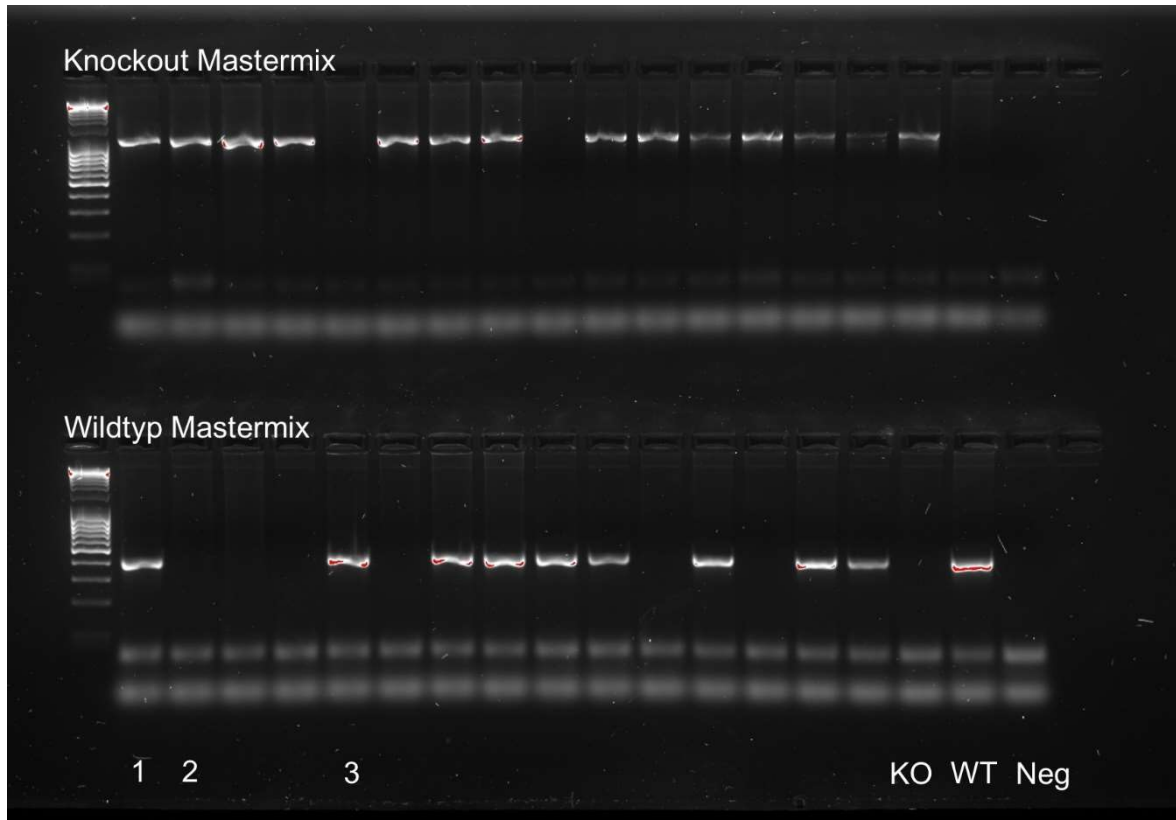


Abbildung 11: Gelelektrophorese, Gel unter UV-Licht.

1: Heterozygot (+/-). 2: Homozygot Knockout (-/-). 3: Homozygot WT (+/+). KO: Knockout Kontrolle. WT: WT Kontrolle. Neg: Negativkontrolle.

2.2 Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis

Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, wurde zuerst die Immunisierung der Mäuse gegen Kaninchen-IgG an Tag -3 durchgeführt. Danach erfolgte die Induktion der NTS an Tag 0. Für die Immunisierung der Mäuse gegen Kaninchen-IgG wurde ein Immunisationsmix hergestellt, welcher sich aus 1 ml Freund Adjuvans (Sigma-Aldrich), 820 μ L PBS, 180 μ L Kaninchen-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) und 0,01 g nicht vitalem Mycobakterium tuberculosis H37a (Difco Laboratories, Franklin Lakes, New Jersey, USA) zusammensetzte. Der Immunisationsmix enthielt Kaninchen-IgG in einer Konzentration von 2 mg/ml. Für die Immunisierung wurden 100 μ L des Immunisationsmixes subkutan in den rechten Fuß einer jeden Maus appliziert. Schließlich wurde für die Induktion der NTS jeder Maus 100 μ L des Kaninchen Anti-GBM-Serums in die Kaudalvene verabreicht.

2.3 Bestimmung des Quotienten aus Albumin und Kreatinin aus Harn

Der Quotient aus dem im Harn befindlichen Albumin und Kreatinin (Albumin/Kreatinin-Ratio, ACR) dient in der experimentellen GN vorrangig dazu, die Permeabilitätssteigerung der glomerulären Filtrationsbarriere zu quantifizieren. Je geschädigter die Barriere ist, desto mehr Albumin kann passieren und in weiterer Folge detektiert werden. Da Albumin eine molekulare Größe von etwa 65 kDa aufweist, deutet das Vorhandensein von Albumin im Harn auf eine Schädigung hin, wobei die Menge positiv mit dem Schweregrad der Schädigung korreliert. Um diesen Wert an die jeweilige Urinflussrate anzupassen, wird auch das Kreatinin bestimmt. Denn auch die Flussrate zeigt eine positive Korrelation mit der Menge an Albumin im Harn. Kreatinin kann als Indikator für diese Urinflussrate herangezogen werden. Der Albumin-Kreatinin-Quotient korrigiert demnach die Menge an Albumin anhand der Einbeziehung der Urinflussrate und somit können Proben von unterschiedlichen Mäusen an unterschiedlichen Tagen miteinander verglichen werden. Anzumerken ist, dass die Verwendung von Kreatinin zu diesem Zweck allerdings nicht optimal ist, da in der Maus bis zu 50% des Kreatinins tubulär sezerniert wird. Aufgrund des technischen Aufwandes und der erhöhten Belastung für die Tiere, die mit einer Urinsammlung über 12- oder 24h einhergeht, wurde für die Normalisierung jedoch das Kreatinin verwendet.

2.3.1 Albumin-ELISA

Mittels Double-Sandwich ELISA wurde die Menge Albumin im Harn unterschiedlicher Proben quantifiziert.

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte (NUNC Edge, Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) wurde mit 1 mg/mL Anti-Maus-Albumin Ziegen-Antikörpern (Bethyl A90-134A-5, Bethyl Lab Inc., Montgomery, Texas, USA) ge-coated. Hierzu wurde zu 10 mL aus Natriumkarbonat und Natriumhydrogenkarbonat bestehendem Coating-Puffer 10 µL des Anti-Maus-Albumin Ziegen-Antikörpers hinzugefügt, um durch eine 1:1000 Verdünnung eine Konzentration von 1 µg/mL zu erreichen. 100 µL dieser Lösung wurde in jedes der 96 Wells pipettiert, um anschließend über Nacht bei 4° zu inkubieren. Als nächstes wurde jedes Well dreimal sukzessive mit 150 µg 0,05% PBS/Tween gewaschen. Letzteres bestand pro Liter aus 8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0,2 g KCl und 0,5 mL Tween 20/Polysorbat 20 (Sigma-Aldrich) gelöst in 1L sterilem Wasser, mit pH von 7,4. Nach dem Waschen wurden in jedes Well 125 µL einer PBS/Tween/BSA 0,5% Blocklösung pipettiert, welche aus 50 ml 0,05% PBS/Tween und 0,25 g BSA (Albumine Bovine Fraction, SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) zusammengesetzt ist. Die Anwendung der Blocklösung hindert unspezifische Proteinbestandteile einer Probe daran, an den Antikörper zu binden und damit die Rohdaten zu verfälschen. Die Mikrotiterplatte inkubierte anschließend für 30 min bei Raumtemperatur, um danach wiederum einen dem zuvor beschriebenen identen Waschvorgang mit 0,05% PBS/Tween zu durchlaufen.

Im dritten Schritt wurden der Albumin-Standard und die Proben mit der Blocklösung verdünnt. Der Standard, bestehend aus Maus-Albumin 2 mg/ml, wurde in Konzentrationen von 0,0 µg/mL (Blank), 0,001 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL und 1 µg/mL hergestellt, um anhand der entsprechenden Werte eine Standardkurve errechnen zu können, die zur Errechnung des Albumingehaltes in den eigentlichen Proben diene. Die Urinproben der Mäuse wurden für Harn von Tag 0 in Verdünnungen von 1:100, 1:1000, 1:10000 und 1:100000, für Tag 7 in 1:1000, 1:10000, 1:100000 und 1:1000000 und für Tag 14 in 1:10000, 1:100000, 1:1000000 und 1:10000000 hergestellt. In Triplets wurden 100 µL/Well jeder Verdünnung auf die Mikrotiterplatte pipettiert, daraufhin inkubierte sie für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluss erfolgte erneut ein Waschvorgang mit dreimal 125 µg PBS/Tween pro Well.

Da im nächsten Schritt der Antikörper, der aufgrund der Konjugation mit einer Meerrettichperoxidase als Detektionsantikörper dient, hinzugefügt werden soll, wurden 1 µg des Ziegen Anti-Maus HRP Konjugates (Bethyl A90-134P-7, Bethyl Lab Inc.) in 10 ml

PBS/Tween verdünnt. 4 ml dieser Lösung wiederum wurden mit 16 ml PBS/Tween verdünnt, um durch eine 1:50000 Verdünnung eine Konzentration von 0,02 µg/mL zu erreichen. 100 µL der Lösung wurden in je ein Well pipettiert. Nachdem die Mikrotiterplatte für weitere zwei Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, wurde sie einem weiteren Waschgang mit 125 µL PBS/Tween pro Well unterzogen.

Als Nächstes wurde das Substrat zugegeben, um den Antigen-Antikörper-Komplex detektierbar zu machen. Hierzu wurde die TMB-Single-Solution (Life Technologies, Invitrogen Corporation) als Substrat für die Meerrettichperoxidase verwendet. In jedes Well wurden 100 µL davon pipettiert. Für 15 min wurde in einem nächsten Schritt die Mikrotiterplatte im Dunkeln inkubiert. Bei Farbumschlag ins Blaue wurde die Reaktion sodann mittels 50 µL 2M Schwefelsäure (H₂SO₄) abgestoppt. Die Mikrotiterplatte wurde daraufhin in das Spektrophotometer (FLUOstar Omega, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland) gegeben, um bei 450 nm die optische Dichte der Proben zu messen. Aus den bekannten Konzentrationen der Standardproben wurde mittels Regressionsanalyse eine semilogarithmische Standardkurve errechnet, mithilfe derer aus der gemessenen optischen Dichte auf den Albumingehalt der Urinproben der Mäuse rückgerechnet wurde.

2.3.2 Kreatinin-Assay

Benutzt wurde das SIGMA Kreatinin Assay Kit#555-A (Sigma-Aldrich), welches eine Pikrinsäure-basierte Methode ist. Nachdem die Proben aufgetaut waren, wurde die APS (Natriumhydroxid-Pikrat-) Lösung vorbereitet. Die hierzu angewendete Formel berechnete das benötigte Volumen APS Lösung anhand der Summe aus der Anzahl an vorhandenen Proben. Die APS Lösung setzte sich aus fünf Volumina alkalischem Farbreagens und einem Volumen Natriumhydroxid-Lösung zusammen, woraus sich eine 1:6 Verdünnung ergab. Nun verdünnte man die Proben im Verhältnis 1:10 in destilliertem Wasser.

In Tripletts wurden im Anschluss je 18 µL steriles Wasser, die Standardlösung und die verdünnten Proben auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One International) pipettiert. Mithilfe einer Titertek-Pipette wurde im Anschluss in jedes Well 176 µL der zuvor hergestellten APS Lösung hinzugegeben. Lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert die Mikrotiterplatte für zwölf Minuten, danach wurden in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 490 nm die Blank- und Rohdaten ausgelesen. Im nächsten Schritt wurden 6 µL des sauren Reagenzes (22,5 mL Vinegaracid und 2,5 mL H₂SH₄) in jedes der befüllten Wells gegeben, welche mit einer auf 50 µL eingestellten Titertek-Pipette durchmischt wurden. Nach weiteren fünf Minuten, in denen die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur

inkubierte, wurde sie erneut in dem Spektralphotometer ausgelesen. Zur Berechnung des Kreatiningehaltes der Proben wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Kreatinin} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{OD (\text{Probe T0}) - OD (\text{Probe T1})}{OD (\text{Standard T0}) - OD (\text{Standard T1})} * 0,3$$

Formel 3: Kreatiningehalt in mg/dl.

In der Formel stehen OD für die optische Dichte, T0 bezeichnet den Zeitpunkt T0 vor, T1 den Zeitpunkt nach Zugabe des sauren Reagenzes.

Von dem auf diese Weise erhaltenen Kreatininwert wurde auf den Kreatiningehalt der Probe zurückgerechnet. Hierzu wurde der finale Kreatininwert vom initialen subtrahiert. Auf diese Weise wurde auch der Kreatininstandard bestimmt. Nun wurde der Quotient aus dem so berechneten Kreatininwert jeder Probe und dem Standard errechnet. Dieser wurde mit 3 multipliziert. Um die Verdünnung gegenzurechnen, wurde mit 10 multipliziert. Für die Umrechnung in mg/ml wurde durch 100 geteilt. Für die ACR wurde abschließend der Quotient aus dem Albuminwert und dem Kreatininwert gebildet.

2.4 Bestimmung des IgG-Serumspiegels mittels IgG-ELISA

Vorab wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte (NUNC Edge) mit Coating-Puffer vorbereitet. Hierzu wurde in einen Karbonat/Bikarbonat Puffer mit einem pH von 9,5 pro ml Puffer 100 µg Hasen-IgG gegeben. Der Coating-Puffer enthielt demnach Hasen-IgG in einer Konzentration von 0,1 mg/ml. 100 µL davon wurden in jedes Well pipettiert. Nachdem die Platte über Nacht bei 4° inkubierte, wurde sie dreimal in Folge mit 125-150 µL PBS-Tween gewaschen. Im nächsten Schritt wurde eine 1% BSA/PBS-Tween Blocklösung hergestellt und 100 µL davon in jedes Well pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden erneut drei Waschvorgänge mit 125-150 µL PBS-Tween durchgeführt. Das murine Serum wurde für den nächsten Schritt in PBS-Tween 1:1600, 1:3200, 1:6400 und 1:12800 verdünnt. Hierzu wurden 1,25 µL des Serums in 1998,75 µL PBS-Tween pipettiert. Davon wurden wiederum 250 µL in 250 µL PBS-Tween verdünnt. Die weiteren Verdünnungen wurden nach demselben Prinzip hergestellt. 100 µL jeder Verdünnung wurden nun in Triplets auf die Platte pipettiert. Nach zwei Stunden Inkubation wurden ein weiteres Mal drei Waschvorgänge mit 125-150 µL PBS-Tween durchgeführt. Als zweiter Antikörper wurde HRP-konjugiertes Ziegen anti-Maus-IgG (DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) verwendet. Nachdem dieser Antikörper mit PBS-Tween 1:5000 verdünnt wurde, wurden 100 µL der Lösung in jedes der Wells pipettiert und anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten wieder drei Waschvorgänge mit

125-150 μL PBS-Tween. Als Substrat wurde der TMB-Single-Solution (Life Technologies, Invitrogen Corporation) Puffer verwendet. 100 μL wurden in je ein Well pipettiert, im Anschluss inkubierte die Platte für fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 50 μL 2,5M H_2SO_4 hinzugefügt. Wie vorangehend beschrieben, wurde die optische Dichte der Wells der Platte bei 450 nm mit dem Spektrophotometer (FLUOStar Omega) gemessen.

2.5 Immunhistochemische Färbungen der Niere für CD4, CD8, CD68, Ly6g

Um Gewebeschnitte hinsichtlich der genannten Zellen zu analysieren, werden in der IHC spezifische Antikörper gegen die jeweiligen Oberflächenmoleküle verwendet. So bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe, die direkt oder indirekt farblich sichtbar gemacht werden. Bei der direkten Methode wird ein Antikörper verwendet, der selbst beispielsweise fluoreszierend konjugiert ist, während bei der indirekten Methode an den ersten Antikörper ein zweiter bindet, welcher meist mit einem Enzym konjugiert ist, welches über ein zugegebenes Substrat den Antigen-Antikörper-Komplex farblich sichtbar macht. Das bei dieser Methodik verwendete Detektionsreagenz basiert auf Avidin. Daher wird weiters ein Avidin-Biotin-Komplex verwendet, welcher im untersuchten Gewebe die Gesamtheit der endogenen Bindungsstellen für Biotin, Biotinrezeptor und Avidin blockiert. Dadurch wird die unspezifische Bindung der Avidin-basierten Detektionsreagenzien an ebenjene Strukturen unterbunden (113).

Nachdem das benötigte Gewebe in OCT in flüssigem Stickstoff eingebettet wurde, wurden die benötigten Schnitte der zu färbenden Organe in einer Dicke von 4 μm mit einem Kryostat-Mikrotom hergestellt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurden sie bei Raumtemperatur für acht Minuten in 4° kaltem Aceton (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Danach wurden sie für eine Minute luftgetrocknet. Im Anschluss wurden die Schnitte jedes Objektträgers mit einem Fettstift (Dako-Pen, DAKO) umrandet. Im nächsten Schritt wurde die Blocklösung hergestellt. Sie setzte sich zu 70% aus PBS, zu 20% aus fetalem Kälberserum (Sigma-Aldrich), zu 10% aus dem Serum der Spezies des zweiten Antikörpers, hier hitzeinaktiviertes Ziegen Serum (Sigma-Aldrich) und aus vier Tropfen Avidin (Vector Laboratories Inc., Newark, Kalifornien, USA) pro ml Gesamtvolumen zusammen. Pro Schnitt wurden 200 μL Blocklösung benötigt. Nachdem die Schnitte mit aufgetragener Blocklösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubierten, wurden sie für je eine Minute zweimal in PBS gewaschen

und danach für zwei Minuten einmal in einer Gelatine Waschlösung (0,8 g Gelatine in 100 ml destilliertem Wasser mit 300 mL PBS) gewaschen. Als nächster Schritt wurde der Primärantikörper (Je nach gewünschter Färbung CD4, CD8, CD68, Ly6g) aufgetragen. (CD4: Ratten Anti-Maus Anti-CD4 Antikörper (Klon YTS191.1, Bio-Rad Laboratories); CD8: Ratten Anti-Maus Anti-CD8 Antikörper (Klon KT15, Bio-Rad); CD68: Ratten Anti-Maus-CD68 Antikörper (AbD Serotec, Bio-Rad, Kidlington, UK); Ly6g: Ratten Anti-Maus Anti-Neutrophil Antikörper (Klon NIMP-R14, Abcam plc, Cambridge, UK)) Hierzu wurden in einer Konzentration von 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ der jeweilige Antikörper mit PBS verdünnt und anschließend vier Tropfen Biotin (Vector Laboratories Inc.) pro mL Gesamtvolumen zugegeben. Pro Schnitt wurden 200 μL benötigt. Für 60 Minuten inkubierten die Schnitte nun in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur und wurden im Anschluss für je vier Minuten dreimal mit PBS gewaschen. Nun wurden auf alle Schnitte 200 μL des jeweiligen Sekundärantikörpers (Biotin-konjugierter Ziegen Anti-Ratten-Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories)) aufgetragen. In einer Konzentration von 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ wurde er mit PBS gemischt. Die Schnitte wurden zum Inkubieren für 45 Minuten bei Raumtemperatur wiederum in eine feuchte Kammer mit Deckel gegeben. Nun wurde mithilfe eines Vectastain® ABC Kit (Elite® PK-6100 Standard, Vector Laboratories Inc.) der Avidin-Biotin-Komplex vorbereitet, indem 10 μL der Lösung A in 1000 μL PBS gegeben wurden und danach 10 μL der Lösung B zugemischt wurden. Pro Schnitt wurden 200 μL benötigt. Der Avidin-Biotin-Komplex wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgten erneut drei vier-minütige Waschvorgänge mit PBS. Im nächsten Schritt wurden 200 μL des Avidin-Biotin-Komplexes pro Schnitt aufgetragen. Für 45 Minuten inkubierten danach die Schnitte in einer feuchten Kammer mit Deckel bei Raumtemperatur. Es wurde nun die chromogene AEC-Lösung vorbereitet. Diese bestand aus 3 ml AEC Stocklösung, 60 ml 0.1M Acetat-Puffer (300 ml 0.2M Natriumacetat (0.2M Natriumacetat besteht aus 27,21 g Natriumacetat und 1000 ml destilliertem Wasser), 100 ml Essigsäurelösung (Diese besteht aus 5,75 ml Essigsäure in 500 ml destilliertem Wasser) und 400 ml destilliertes Wasser) und 30 μL 30-prozentigem Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches erst kurz vor der Verwendung der Lösung hinzugefügt wurde. Die AEC Stocklösung wurde unter einer Abzugshaube in die vorgelegte Acetat-Pufferlösung pipettiert. Die Schnitte wurden, nachdem die 45 Minuten Inkubationszeit des Avidin-Biotin-Komplexes vorbei waren, wiederum dreimal für vier Minuten lang in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte einmal für drei Minuten in 0.1M 4°C kaltem Acetat-Puffer gewaschen. Unter der Abzugshaube wurden die Schnitte nun für sechs bis acht

Minuten in der AEC-Lösung entwickelt. Im Mikroskop wurde nach drei Minuten der Erfolg der Färbereaktion überprüft. Danach wurden die Schnitte dreimal für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen, um im Anschluss in Gill's Nr. 3 Hämatoxylin (bestehend aus zwei Teilen Gill's und einem Teil destilliertem Wasser) für zehn Sekunden gegengefärbt zu werden. Dreimal wurden die Schnitte anschließend mit Leitungswasser gespült, dann zweimal mit destilliertem Wasser. Abschließend wurden sie mit Aquatex (Merck KGaA) eingedeckt.

Die CD4+T-Helferzellen, die CD8+ zytotoxischen T-Zellen und die Ly6g-positiven neutrophilen Granulozyten wurden jeweils verblindet mikroskopisch analysiert. Hierzu wurde die Anzahl an positiven Zellen in Nierenrinde und Nierenmark in sechs benachbarten high-power-fields (HPF, 400-fache Vergrößerung), evaluiert.

Um die Anfärbung der CD68-positiven Makrophagen im Gewebe semiquantitativ auszuwerten, wurde in einer verblindeten mikroskopischen Analyse ein semiquantitativer Score ermittelt. Hierzu wurden sechs low-power-fields (LPF, 100-fache Vergrößerung) pro Schnitt hinsichtlich der enthaltenen positiven Zellen nach folgendem Schema mit einem Wert von 0 bis 4 bewertet.

0	0-4 positiv gefärbte Zellen
1	5-10 positiv gefärbte Zellen
2	11-50 positiv gefärbte Zellen
3	51-200 positiv gefärbte Zellen
4	>200 positiv gefärbte Zellen

Tabelle 2: Makrophagen-Score.

2.6 PAS-Reaktion

Die Abkürzung PAS steht für Periodsäure-Schiff-Reaktion (Periodic-Acid-Schiff reaction) und bezeichnet eine histochemische Färbemethode, die zum Nachweis von kohlenhydrathaltigen Teilen von Mikroorganismen oder auch Strukturen dient. Periodsäure oxidiert die Glykolgruppen verschiedenster Kohlenhydrate zu Aldehydgruppen, welche schließlich durch das Schiff-Reagens rot bis pink eingefärbt werden. Auch sklerotisch veränderte Anteile der Glomeruli der Nieren sind durch die PAS-Reaktion histomorphologisch nachweisbar.

Nierengewebe, welches zuvor mittels Formalin fixiert wurde, wurde in Paraffin eingebettet um 4 µm dicke Schnitte herzustellen. Diese wurden entparaffiniert mittels zwei Mal fünfminütiger Lagerung in Xylol und anschließend rehydriert mit einer absteigenden Alkoholreihe von 100% über 96% zu 70% Ethanol, für jeweils drei Minuten. Nachfolgend

erfolgte die Spülung mit destilliertem Wasser. Nun wurde jeder Schnitt mit Periodsäure (Merck KGaA) für fünf Minuten gefärbt, um danach für drei Minuten unter fließendem Leitungswasser und nachfolgend destilliertem Wasser gespült zu werden. Im Anschluss erfolgte die 15-minütige Färbung mit dem Schiff-Reagens (Merck KGaA). Erneut wurde jeder Schnitt gewaschen und weiters mit Hämatoxylin Gill III (Sigma-Aldrich) gefärbt. Es folgte ein weiterer Waschvorgang mit fließendem Leitungswasser. Zur nun folgenden Dehydrierung wurden die Schritte der Rehydrierung in umgekehrter Reihenfolge wiederholt. Die Schnitte wurden danach bei Raumtemperatur trocknen gelassen und mithilfe des Roti-Histokits (Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

Zur Auswertung wurden pro Schnitt 50 glomeruläre Querschnitte verblindet mikroskopisch nach dem unten angeführten Score ausgewertet.

G0: Nichtsklerotischer Glomerulus, keine PAS-Positivität

G1: Leicht sklerosierter Glomerulus, PAS-Positivität bis zu 1/3 des Glomerulus

G2: Mittelschwer sklerosierter Glomerulus, PAS-Positivität bis zu 2/3 des Glomerulus

G3: Schwer sklerosierter Glomerulus, PAS-Positivität bei mehr als 2/3 des Glomerulus.

$$PAS - Score = \frac{0 * G0 + 1 * G1 + 2 * G2 + 3 * G3}{G0 + G1 + G2 + G3}$$

Formel 4: PAS-Score.

2.7 Durchflusszytometrie der Milz und der Lymphknoten

2.7.1 Herstellen der Suspension und der Lösung und Färbung der Oberflächenantigene

Zunächst wurde die Milz gewogen, da für die Durchflusszytometrie nur ein Drittel der Milz verwendet wird. Die Lymphknoten wurden als Ganze verwendet. Mithilfe eines Spritzenstempels wurden die Proben einzeln durch ein 70 µm filterndes Sieb in ein 50 ml fassendes Gefäß gepresst. Dieses wurde mit 4° kaltem PBS auf 30 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Gefäße bei 250 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt, um das Zentrifugat in 500 µL MACS Puffer zu resuspendieren. Dieser besteht aus 0,5% BSA in PBS mit 2mM EDTA. Danach wurde jegliche überschüssige Flüssigkeit mittels einer Pipette entfernt. Das im Röhrchen zurückbleibende Zentrifugat wurde in 200 µL Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Puffer resuspendiert. Abschließend wurden 100 µL einer jeden Probe auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte

transferiert. Ein Well wurde mit 100 μL restlicher Zellen befüllt, um eine ungefärbte Kontrolle zu erhalten. Entsprechend der Anzahl an verwendeter Fluorophor-konjugierter Antikörper wurden zusätzliche Wells mit 100 μL an restlichen Zellen befüllt, um als Kontrollen für die einzelnen Fluorophore zu fungieren.

Die Färbung mit mehreren Farben (Multicolour Staining) wurde direkt in der zuvor erwähnten 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Hierzu pipettierte man 1 μL FC-Block (CD16/32) in jedes 100 μL Zellsuspension fassende Well. Nachdem die Platte für 15 Minuten inkubierte, wurde sie mit 300 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt. Nun wurde ein Waschschrift durchgeführt, indem in jedes befüllte Well 100 μL PBS hinzugefügt wurden und anschließend zentrifugierte man mit 300 g für 5 Minuten bei 4°C und entsorgte im Anschluss den Überstand. Nun wurden 100 μL der Mischung an Fluorophor-konjugierten Antikörpern sowie jeder Fluorophor-konjugierte Antikörper einzeln als Kontrolle zugegeben. Es wurde kein Fluorophor-konjugierter Antikörper in das Well gegeben, welches als ungefärbte Kontrolle diente. Die Platte inkubierte dann für 30 Minuten im Dunkeln. Danach wurde die Platte mit 300 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde erneut ein Waschschrift durchgeführt, indem in jedes befüllte Well 100 μL PBS gegeben wurden, die Platte im Anschluss bei 300 g für 5 Minuten inkubierte und der Überstand verworfen wurde. In jedes befüllte Well wurden 100 μL 0,4% Paraformaldehyd in PBS gegeben, um das Zentrifugat zu resuspendieren und in FACS-Röhrchen zu transferieren. In jedes davon wurden 400 μL 0,4% Paraformaldehyd in PBS hinzugefügt, um ein definites Volumen von 500 μL pro Röhrchen zu erlangen. Die Analyse erfolgte auf einem Cytoflex LX Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA).

2.7.2 Intrazelluläre Färbung von Foxp3 zur Darstellung der T_{reg}

Zur Darstellung der T_{reg} wurde das True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (BioLegend, Inc., San Diego, Kalifornien, USA) verwendet. Die Milz und die Lymphknoten wurden, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, verarbeitet. Nach dem letzten Waschschrift und vor der Resuspendierung in FACS-Puffer wurde der Überstand verworfen und das Zentrifugat gut gemischt. Nach Färbung der Oberflächenantigene wie zuvor beschrieben wurde in jedes Well 200 μL des True-Nuclear™ 1X Fix Konzentrates (BioLegend, Inc.) pipettiert und die Zellen darin resuspendiert. Für 45 Minuten inkubierte die Platte anschließend im Dunkeln. Danach zentrifugierte die Platte mit 300g bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, die Platte wurde gut gemischt, um das

Zellpellet aufzulösen. Nun wurden 200 µL des True-Nuclear™ 1X Perm Buffer (BioLegend, Inc.) in jedes Well zugegeben. Ein weiteres Mal wurde die Platte mit 300g bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert, um danach den Überstand zu verwerfen und die Platte wurde wiederrum gut gemischt, um das Zellpellet aufzulösen. Zwei weitere Male wurde ein Waschschriff mit True-Nuclear™ 1X Perm Buffer durchgeführt, indem 200 µL zugegeben wurden und anschließend die Platte zentrifugiert wurde. 100 µL der Verdünnung aus Foxp3 Fluorophor-konjugiertem Antikörper und True-Nuclear™ 1X Perm Buffer wurden in die entsprechenden Wells pipettiert. Für 30 Minuten inkubierte die Platte im Anschluss im Dunkeln. Es folgten drei weitere Waschschriffe mit 200 µL des True-Nuclear™ 1X Perm Buffer mit anschließender Zentrifugation der Platte mit 300g bei Raumtemperatur für 5 Minuten. In jedes befüllte Well wurden 100 µL PBS gegeben, um das Zentrifugat zu resuspendieren und in FACS-Röhrchen zu transferieren. In jedes davon wurden 400 µL PBS hinzugefügt, um ein definites Volumen von 500 µL pro Röhrchen zu erlangen. Die Analyse erfolgte auf einem Cytoflex LX Flow Cytometer (Beckman Coulter).

2.7.3 Antikörper Panels

Für die Experimente wurden verschiedene Antikörper Panels zusammengestellt, welche aus folgenden Fluorochrom-konjugierten Antikörpern in den folgenden Verdünnungen bestanden:

Panel 1: (Milz)

<i>Marker</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Farbe</i>
Ly6C	1:200	BV650
CD115	1:100	PE
Ly6G	1:200	BV605
CD11b	1:200	BV785
CD45	1:50	BUV395
ST2	1:100	APC
CD11c	1:200	APC-Cy7

Tabelle 3: Antikörper Panel 1 für die Analyse ST2-exprimierender Zellen aus der Milz in gesunden und nephritischen WT Mäusen.

Panel 2: (Lymphknoten, Milz)

<i>Marker</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Farbe</i>
CD4	1:200	BV650
CD8	1:100	BV421
CD45	1:100	PercpCy5.5
ST2	1:100	APC
CD69	1:200	BV510
B220	1:100	FITC

Tabelle 4: Antikörper Panel 2 für die Analyse ST2-exprimierender Zellen aus Lymphknoten und Milz in gesunden und nephritischen WT Mäusen.

Panel 3: (Milz)

<i>Marker</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Farbe</i>
Mouse CD1d PBS57 tetramer(114)	1:200	PE
CD3	1:100	BV421
CD45	1:100	PercpCy5.5
ST2	1:100	APC
CD11b	1:200	PeCy7
NK1.1	1:100	BV785

Tabelle 5: Antikörper Panel 3 für die Analyse ST2-exprimierender Zellen aus der Milz in gesunden und nephritischen WT Mäusen.

Panel 4: (Lymphknoten, Milz)

<i>Marker</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Farbe</i>
CD4	1:200	PE
CD25	1:100	BV605
ST2	1:100	APC
After Fix/Perm		
Foxp3	1:100	FITC

Tabelle 6: Antikörper Panel 4 für die Analyse ST2-exprimierender Zellen aus Lymphknoten und Milz in gesunden und nephritischen WT Mäusen.

Bei dem Experiment zur Darstellung der Verteilung der Zellpopulationen in Milz und Lymphknoten bei nephritischen WT und St2^{-/-} Mäusen wurde das folgende Antikörper Panel verwendet:

Panel 5: (Lymphknoten, Milz)

<i>Marker</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Farbe</i>
NK1.1	1:100	APC
CD11b	1:200	PeCy7
CD8	1:100	FITC
CD45	1:50	BUV395
CD3	1:100	PB (BV421)
CD4	1:100	BV650
Mouse CD1d PBS57 tetramer(114)	1:200	PE

Tabelle 7: Antikörper Panel 5 für die Analyse der Zellen aus Lymphknoten und Milz in nephritischen WT und St2^{-/-} Mäusen.

2.7.4 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit Flowjo Vers. 10.8.0 (Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

In gesunden und nephritischen WT Mäusen wurden die folgenden Gating-Strategien verwendet: Von allen Zellen wurden die Doubletten mittels FSC-Width und FSC-Height exkludiert. Ausgehend von diesem Gate wurden weitere Zellpopulationen identifiziert.

In *Panel 1* wurden Monozyten als CD45+CD11b+CD115+Ly6G-SSClow identifiziert. Diese wurden weiter unterschieden in CD45+CD11b+CD115+Ly6G-SSClow Ly6C+ klassische Monozyten und CD45+CD11b+CD115+Ly6G-SSClow Ly6C- nicht klassische Monozyten. Neutrophile Granulozyten wurden als CD45+CD11b+Ly6G+SSChigh identifiziert.

In *Panel 2* wurden zytotoxische T-Zellen als CD45+CD4-CD8+ und T-Helferzellen als CD45+CD4+CD8- identifiziert. B-Zellen wurden als CD45+CD220+ identifiziert.

In *Panel 3* wurden NK-Zellen als CD45+CD3-NK1.1+ dargestellt. Zur Identifizierung von iNKT-Zellen wurde das von der NIH Tetramer Core Facility zur Verfügung gestellte mCD1d PBS-57 Tetramer (114) verwendet. iNKT-Zellen wurden als CD45+CD3+Tetramer+ dargestellt und weiter unterschieden in NK1.1+ iNKT1-Zellen und NK1.1- iNKT2- und iNKT17-Zellen.

In *Panel 4* wurden T_{reg} als CD4+CD25+Foxp3+ identifiziert.

Jede genannte Zellpopulation der Panel 1-4 wurde sodann hinsichtlich ihrer Expression von ST2 untersucht.

In nephritischen WT und St2^{-/-} Mäusen wurden folgende Gating-Strategien verwendet: Von allen Zellen wurden die Doubletten mittels FSC-Width und FSC-Height exkludiert. Ausgehend von diesem Gate wurden weitere Zellpopulationen identifiziert. Zytotoxische T-Zellen wurden als CD45+CD4-CD8⁺ und T-Helferzellen als CD45+CD4+CD8⁻ identifiziert. NK-Zellen wurden als CD45+CD3-NK1.1⁺ dargestellt. iNKT-Zellen wurden als CD45+CD3+Tetramer⁺ dargestellt und weiter unterschieden in NK1.1⁺ iNKT1-Zellen und NK1.1⁻ iNKT2- und iNKT17-Zellen.

Gewebe von nephritischen WT und nephritischen St2^{-/-} Mäusen wurde mit Panel 5 evaluiert, während die Panels 1-4 in gesunden WT Mäusen und nephritischen WT Mäusen verwendet wurden. Bilder der Gating-Strategie wurden in Flowjo anhand des Layout-Editors sowie Tabellen mithilfe des Tabelleneditors extrahiert. Dargestellt wurden die positiven Zellen als prozentualer Anteil der Elternpopulation.

2.8 Statistik und Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Daten erfolgte mithilfe des Programmes GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA). Hierbei wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorow-Smirnow-Test zuerst geprüft, ob die Daten der beiden miteinander zu vergleichenden Gruppen normalverteilt waren. Normalverteilte Daten wurden mithilfe des parametrischen t-Tests für unabhängige Stichproben auf Signifikanz überprüft. Nicht normalverteilte Daten wurden mithilfe des nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Tests auf Signifikanz überprüft. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Alle Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler (SEM) angegeben.

Mittels der zuvor beschriebenen Scores wurden die immunhistochemischen Färbungen ausgewertet. Die Werte der ELISA wurden direkt aus dem 4-Parameter Fit als Blank-korrigierte Rohdaten ausgelesen. Ebenso wurde mit dem Kreatinin verfahren. In Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) wurde die ACR berechnet. Die mittels Tabellen-Editor erhaltenen Daten aus Flowjo wurden in Graphpad eingefügt und wie eingangs beschrieben als Mittelwert ± SEM graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse mit graphischen Darstellungen

3.1 Regulation der ST2 Expression in der NTS

3.1.1 ST2 Expression auf klassischen und nicht klassischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten in der NTS in der Milz

Die in Kapitel 2.7.3 beschriebenen Fluorophor-konjugierten Antikörper des Panel 1 wurden zur Evaluierung der Expression von ST2 auf klassischen Monozyten, nicht klassischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten verwendet.

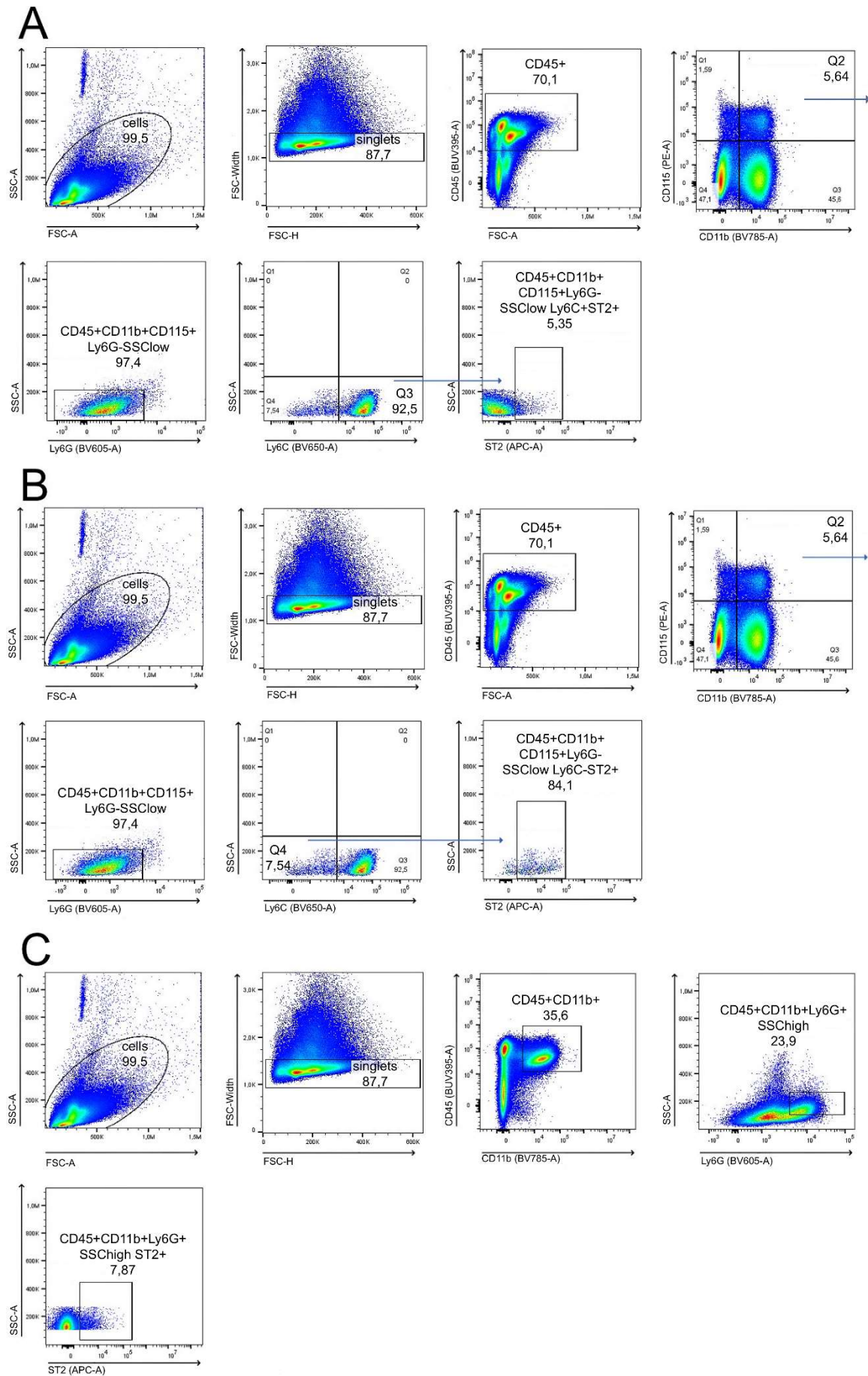


Abbildung 12: Panel 1 Gatingstrategie.

Für (A) $CD45+CD11b+CD115+Ly6G-SSC_{low} Ly6C+ST2+$ klassische Monozyten, (B) $CD45+CD11b+CD115+Ly6G-SSC_{low} Ly6C-ST2+$ nicht klassische Monozyten und (C) $CD45+CD11b+Ly6G+SSC_{high} ST2+$ neutrophile Granulozyten in der Milz in gesunden und nephritischen WT Mäusen.

Die angegebenen Werte sind der mittlere prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der Elterngeneration einer Gruppe. In Panel 1 wurden klassische Monozyten, nicht klassische Monozyten sowie neutrophile Granulozyten hinsichtlich ihrer ST2 Expression auf gesunden Mäusen (H) und Mäusen 14 Tage nach Induktion der NTS (NTS) analysiert.

In der Milz zeigte sich auf klassischen Monozyten der NTS Gruppe eine signifikant niedrigere prozentuale Expression an ST2 als in der H Gruppe (H Gruppe 47,38% n=5 (SEM=2,082); NTS-Gruppe 6,344% n=5 (SEM=0,9748) ($p<0,0001$)), wobei sich hier ebenfalls die ST2 MFI in der NTS Gruppe signifikant erniedrigt zeigte (H Gruppe 5069 n=5 (SEM=124,4); NTS-Gruppe 3012 n=5 (SEM=73,98) ($p<0,0001$)). Demnach exprimierten nephritische WT Mäuse in der Milz signifikant weniger ST2 auf klassischen Monozyten als gesunde WT Mäuse.

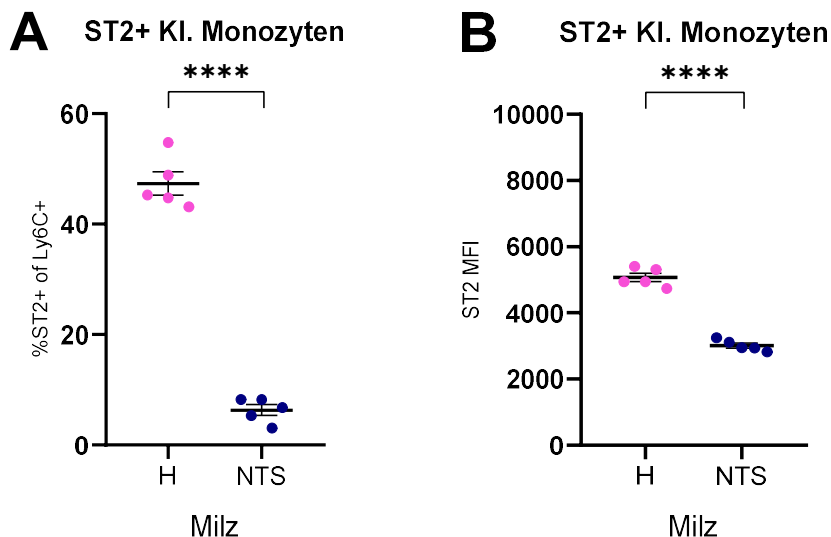


Abbildung 13: ST2 Expression auf klassischen Monozyten in H und NTS.

(A) Prozent der ST2+ klassischen Monozyten und (B) ST2 MFI in Milz. N=5/Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

In der Milz wurde auf nicht klassischen Monozyten der NTS Gruppe eine signifikant niedrigere prozentuale ST2 Expression im Vergleich zur H Gruppe errechnet (H Gruppe 95,16% n=5 (SEM=0,7763); NTS-Gruppe 72,18% n=5 (SEM=5,633) ($p=0,0037$)), auch zeigte sich hier die ST2 MFI in der NTS Gruppe signifikant erniedrigt (H Gruppe 12912 n=5 (SEM=894,7); NTS-Gruppe 6946 n=5 (SEM=407,8) ($p=0,0038$)). In der NTS exprimierte demnach die NTS Gruppe in der Milz auf nicht klassischen Monozyten signifikant weniger ST2 als die H Gruppe.

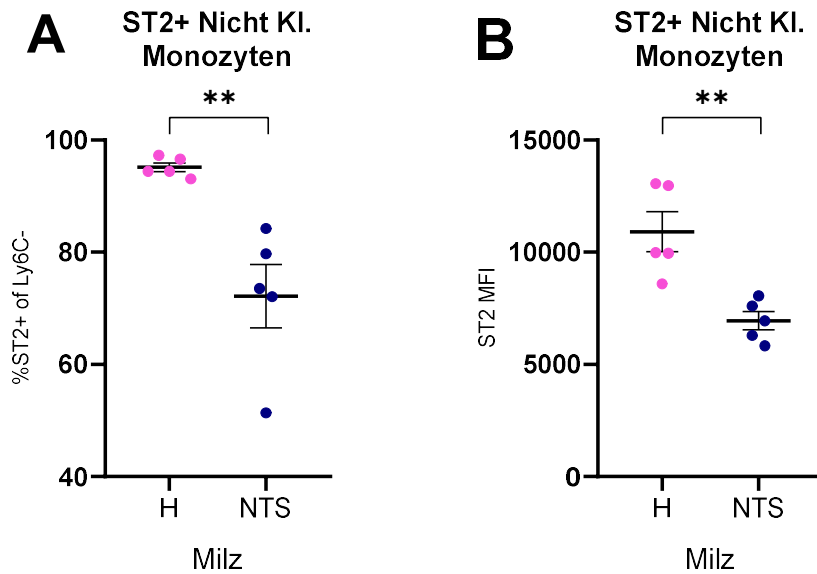


Abbildung 14: ST2 Expression auf nicht klassischen Monozyten in H und NTS. (A) Prozent der ST2+ nicht klassischen Monozyten und (B) ST2 MFI in Milz. N=5/Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

In der Milz zeigten neutrophile Granulozyten der NTS Gruppe eine signifikant niedrigere prozentuale ST2 Expression (H Gruppe 20,58% n=5 (SEM=1,282); NTS-Gruppe 6,912% n=5 (SEM=0,6824) ($p < 0,0001$)), wobei sich für die ST2 MFI kein signifikanter Unterschied errechnete (H Gruppe 2893 n=5 (SEM=278,1); NTS-Gruppe 2368 n=5 (SEM=195,1) ($p = 0,1604$)). Daher ist anzunehmen, dass zwar ein prozentualer Unterschied an ST2 exprimierenden neutrophilen Granulozyten besteht, sich die ST2 Expression pro Zelle in den beiden Gruppen jedoch nicht signifikant unterscheidet.

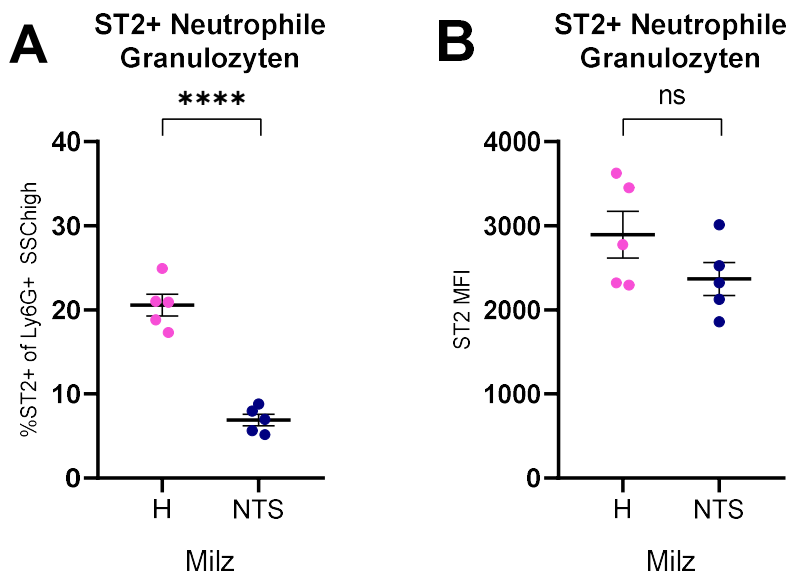


Abbildung 15: ST2 Expression auf neutrophilen Granulozyten in H und NTS. (A) Prozent der ST2+ neutrophilen Granulozyten und (B) ST2 MFI in Milz. N=5/Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

3.1.2 ST2 Expression auf B-Zellen, CD4+T-Zellen und CD8+T-Zellen in der NTS in Milz und Lymphknoten

Die in Kapitel 2.7.3 beschriebenen Fluorophor-konjugierten Antikörper des Panel 2 wurden zur Evaluierung der Expression von ST2 auf B-Zellen, CD4+T-Zellen und CD8+T-Zellen verwendet.

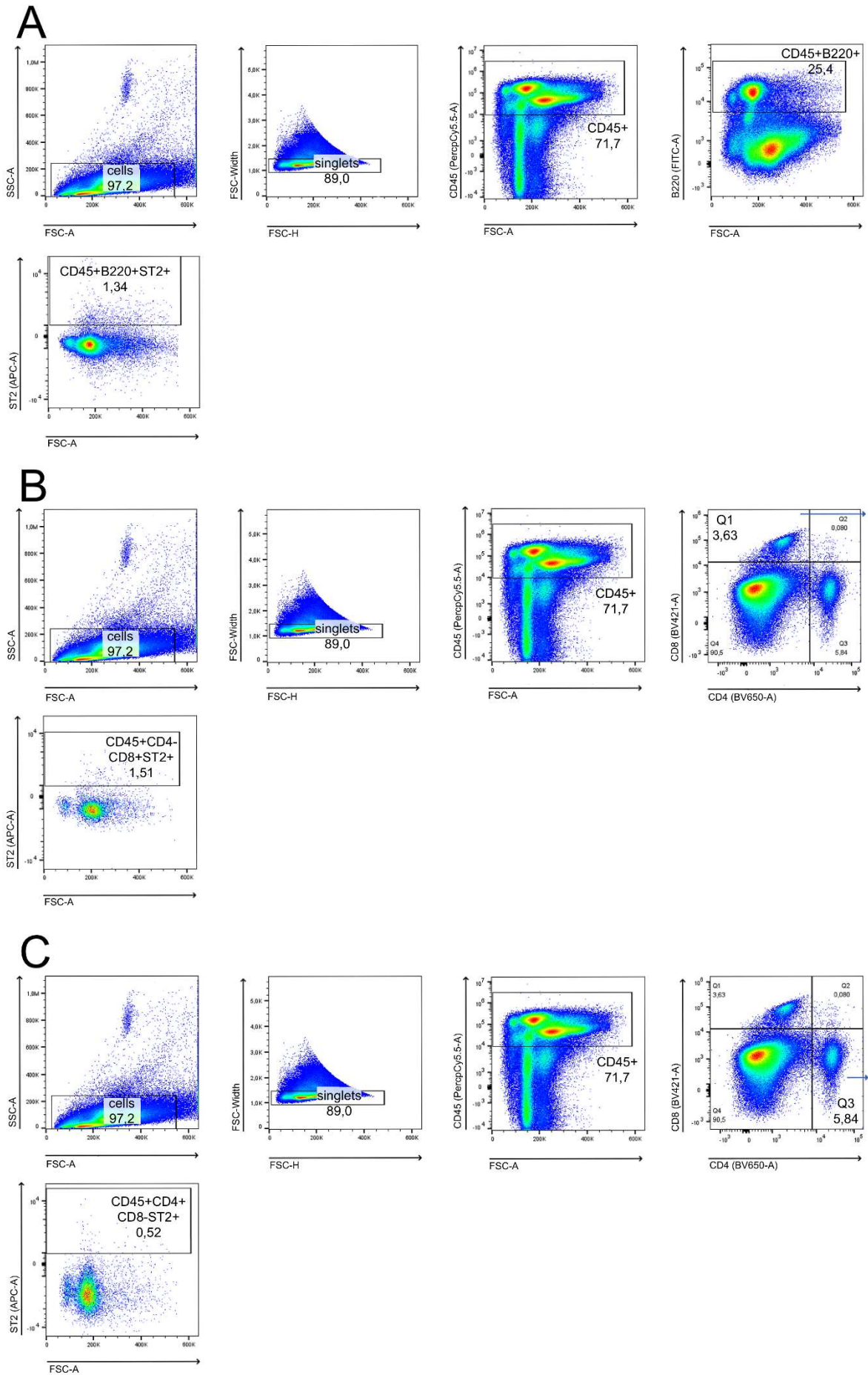


Abbildung 16: Panel 2 Gatingstrategie.

Für (A) CD45+B220+ST2+ B-Zellen, (B) CD45+CD4-CD8+ST2+ zytotoxische T-Zellen und (C) CD45+CD4+CD8-ST2+T-Helferzellen in Lymphknoten und Milz in gesunden und nephritischen WT Mäusen.

Die angegebenen Werte sind der mittlere prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der Elternpopulation einer Gruppe. In Panel 2 wurden B-Zellen, CD4+T-Zellen und CD8+T-Zellen hinsichtlich ihrer ST2+ Expression bei gesunden Mäusen (H) und Mäusen 14 Tage nach Induktion der NTS (NTS) analysiert.

Kein signifikanter Unterschied in der prozentualen Expression von ST2 ergab sich für B-Zellen in Lymphknoten (H Gruppe 1,422% n=5 (SEM=0,6634); NTS Gruppe 0,7800% n=5 (SEM=0,1246) (p=0,6905)), ebenso wurde hier kein signifikanter Unterschied in der ST2 MFI errechnet (H Gruppe 2706 n=5 (SEM=1536); NTS Gruppe 1165 n=5 (SEM=41,03) (p=0,5952)).

Im Gegensatz dazu zeigte sich auf B-Zellen in der Milz in der NTS Gruppe eine signifikant höhere prozentuale ST2 Expression (H Gruppe 0,4960% n=5 (SEM=0,03572); NTS Gruppe 1,260% n=5 (SEM=0,04690) (p<0,0001)), sowie eine signifikant niedrigere ST2 MFI in der NTS Gruppe (H Gruppe 2264 n=5 (SEM=86,86); NTS Gruppe 1725 n=5 (SEM=38,77) (p=0,0005)).

Der Anteil ST2+B-Zellen an der B-Zell Population ist in nephritischen Mäusen im Vergleich zu gesunden Mäusen erhöht, wenngleich die ST2 Expression der Zellen signifikant verringert ist.

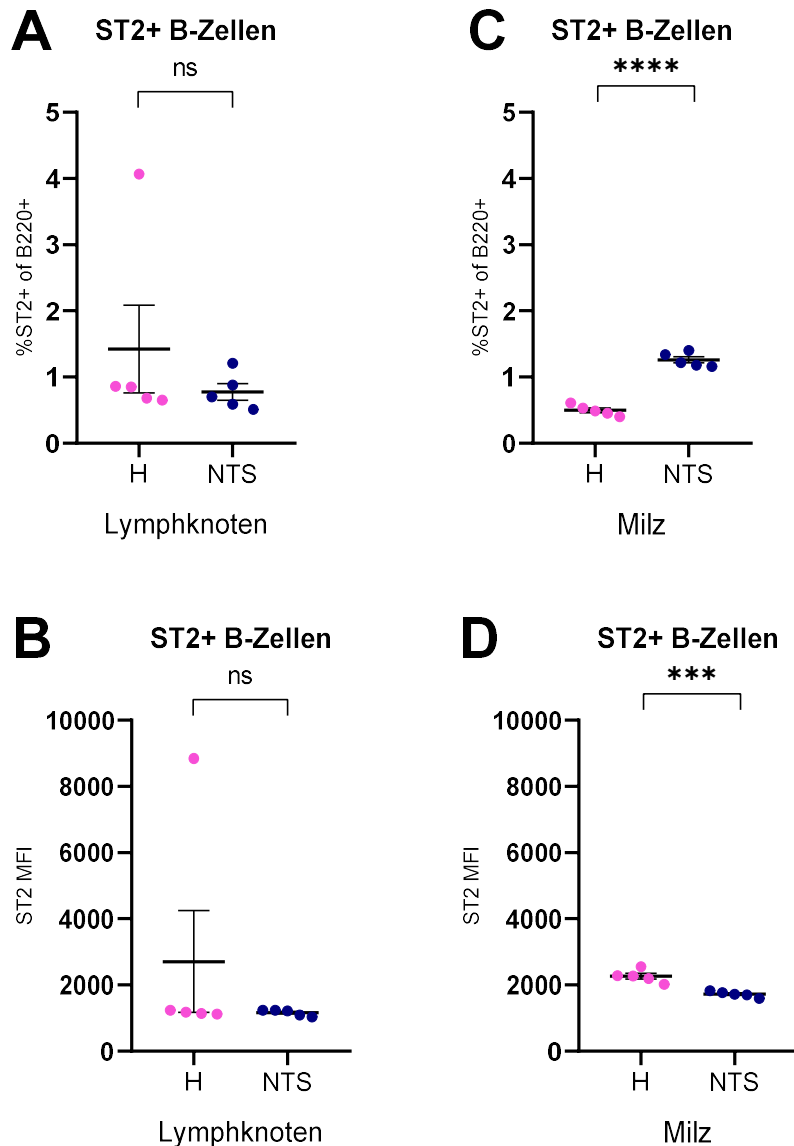


Abbildung 17: ST2 Expression auf B-Zellen in H und NTS.

(A) Prozent der ST2+B-Zellen und (B) ST2 MFI in Lymphknoten und (C) Prozent der ST2+B-Zellen und (D) ST2 MFI in der Milz. N=5/Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

Eine signifikant niedrigere prozentuale ST2 Expression auf CD4+T-Zellen ergab sich in der NTS Gruppe in Lymphknoten (H Gruppe 0,4640% n=5 (SEM=0,08447); NTS Gruppe 0,2180% n=5 (SEM=0,01393) (p=0,0207)), wobei hier für die ST2 MFI ein Trend, jedoch kein signifikanter Unterschied errechnet wurde (H Gruppe 2142 n=5 (SEM=233,2); NTS Gruppe 1697 n=5 (SEM=234,2) (p=0,2144)). Bei signifikant vermindertem Anteil ST2+CD4+T-Zellen am Pool der T-Helferzellen in der NTS Gruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ist in erster Linie nur von einem Trend zur geringeren ST2 Expression in der NTS auf CD4+T-Zellen in Lymphknoten auszugehen.

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der prozentualen ST2 Expression auf CD4+T-Zellen zeigte sich in der Milz (H Gruppe 0,6320% n=5 (SEM=0,1757); NTS Gruppe 0,8360% n=5 (SEM=0,1682) (p=0,4260)), ebenso wurde für die ST2 MFI hier kein signifikanter Unterschied errechnet (H Gruppe 1960 n=5 (SEM=91,72); NTS Gruppe 2156 n=5 (SEM=113,0) (p=0,2150)).

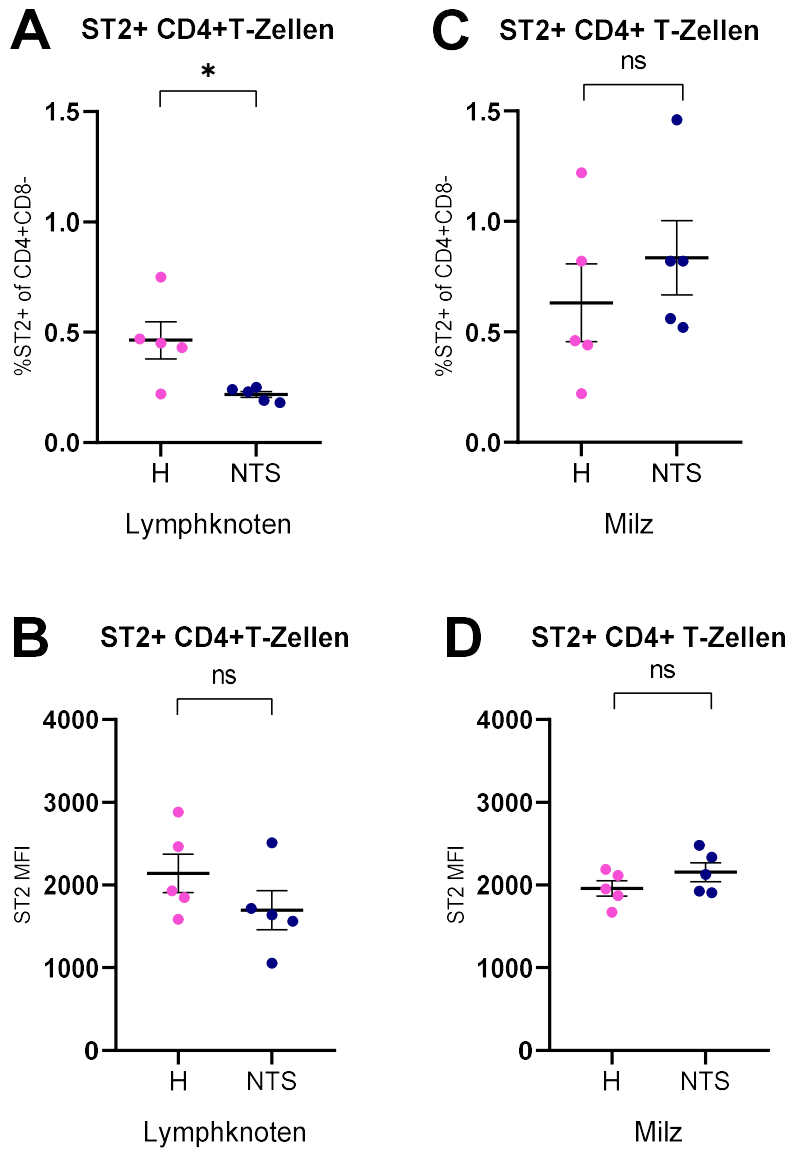


Abbildung 18: ST2 Expression auf CD4+T-Zellen in H und NTS. (A) Prozent der ST2+CD4+T-Zellen und (B) ST2 MFI in Lymphknoten und (C) Prozent der ST2+CD4+T-Zellen und (D) ST2 MFI in der Milz. N=5/Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der prozentualen Expression von ST2 auf CD8+T-Zellen in Lymphknoten (H Gruppe 0,2800% n=5 (SEM=0,02490); NTS Gruppe

0,2420% n=5 (SEM=0,04565) (p=0,4858)), ebenso verhielt es sich hier für die ST2 MFI (H Gruppe 1077 n=5 (SEM=34,19); NTS Gruppe 1097 n=5 (SEM=36,56) (p=0,6999)).

Jedoch wurde in der Milz eine signifikant höhere prozentuale Expression von ST2 auf CD8+T-Zellen für die NTS Gruppe errechnet (H Gruppe 0,06380% n=5 (SEM=0,01487); NTS Gruppe 1,080% n=5 (SEM=0,1141) (p<0,0001)), wobei die ST2 MFI ohne signifikanten Unterschied war (H Gruppe 1676 n=5 (SEM=306,9); NTS Gruppe 1709 n=5 (SEM=55,50) (p=0,2222)). Demnach zeigt sich zwar ein prozentual höherer Anteil an ST2 exprimierenden CD8+T-Zellen in der Milz in nephritischen Mäusen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, jedoch deutet der fehlende Unterschied in der ST2 MFI auf einen fehlenden Unterschied in der Expression der einzelnen Zellen hin.

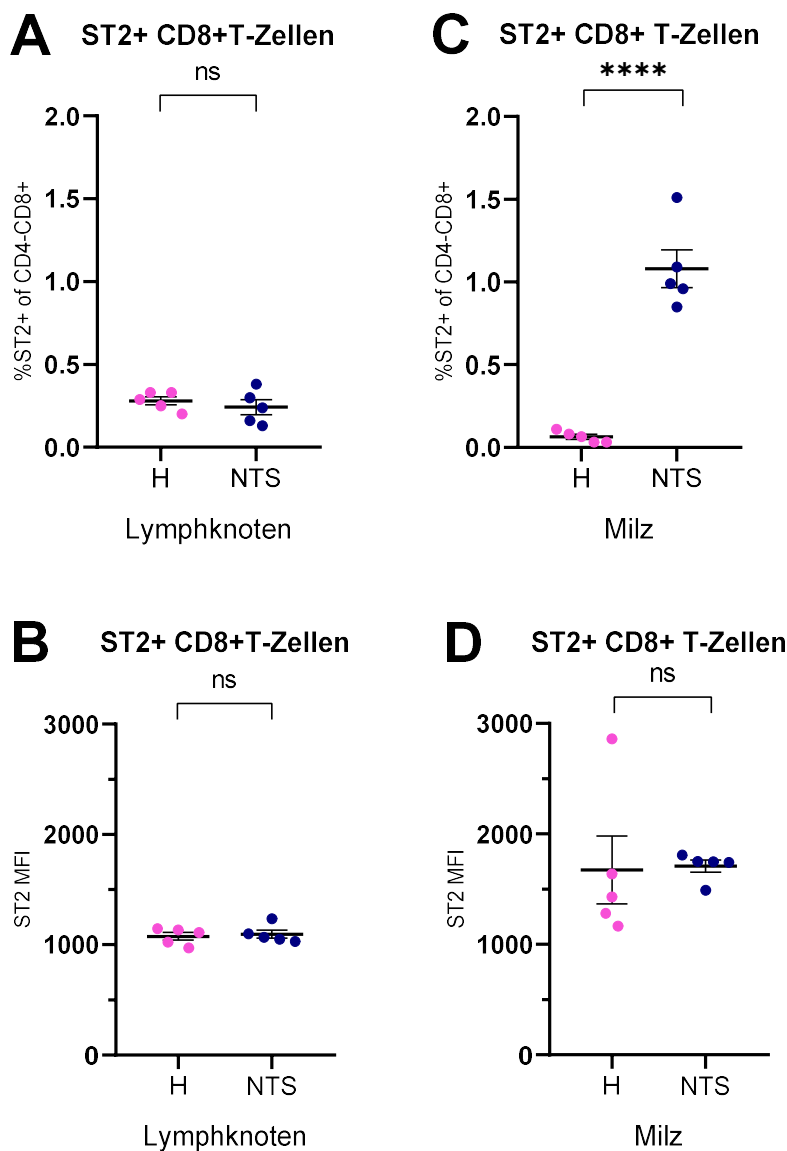


Abbildung 19: ST2 Expression auf CD8+T-Zellen in H und NTS.

(A) Prozent der ST2+CD8+T-Zellen und (B) ST2 MFI in Lymphknoten und (C) ST2+CD8+T-Zellen und (D) ST2 MFI in der Milz. N=5/Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

3.1.3 ST2 Expression auf NK-, iNKT-, iNKT1-, iNKT2- und iNKT17-Zellen in der NTS in der Milz

Die in Kapitel 2.7.3 beschriebenen Fluorophor-konjugierten Antikörper des Panel 3 wurden zur Evaluierung der Expression von ST2 auf NK-, iNKT-, iNKT1-, iNKT2- und iNKT17-Zellen verwendet.

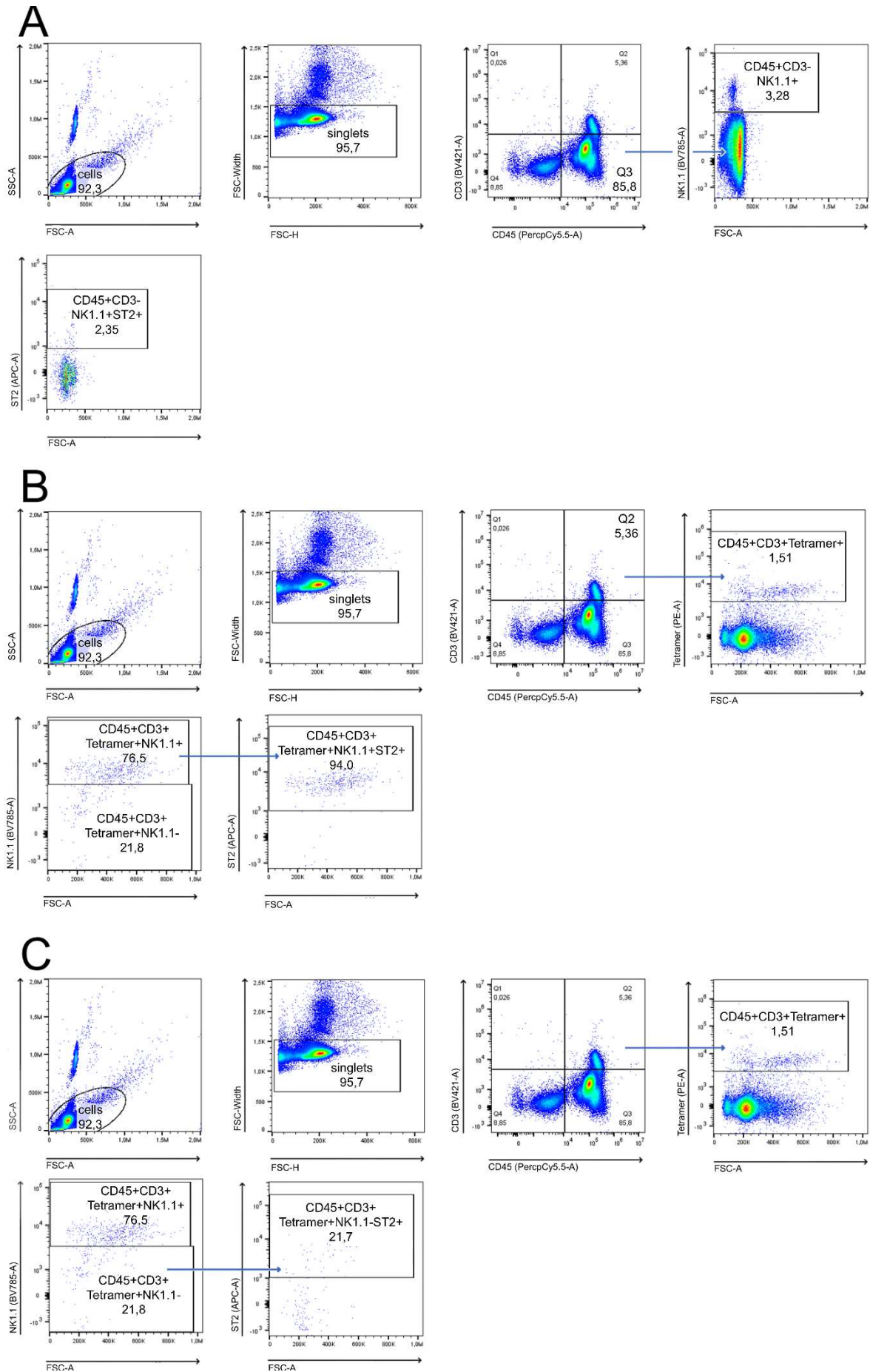


Abbildung 20: Panel 3 Gatingstrategie.

Für (A) $CD45+CD3-NK1.1+ST2+$ NK-Zellen, (B) $CD45+CD3+Tetramer+$ iNKT-Zellen, $CD45+CD3+Tetramer+NK1.1+ST2+$ iNKT1-Zellen und (C) $CD45+CD3+Tetramer+NK1.1+ST2+$ iNKT2- und iNKT17-Zellen in der Milz in gesunden und nephritischen WT Mäusen.

Die angegebenen Werte sind der mittlere prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der Elternpopulation einer Gruppe. In Panel 3 wurden NK-, iNKT-, iNKT1- und iNKT2- und iNKT17-Zellen hinsichtlich der prozentualen ST2 Expression bei gesunden WT Mäusen (H) und Mäusen 14 Tage nach Induktion der NTS (NTS) analysiert.

Es zeigte sich eine signifikant höhere prozentuale Expression von ST2 auf NK-Zellen in der NTS Gruppe in der Milz (H Gruppe 6,338% n=5 (SEM=1,297); NTS Gruppe 13,10% n=5 (SEM=2,341) ($p=0,0355$)), wobei hier für die ST2 MFI kein signifikanter Unterschied errechnet wurde (H Gruppe 3304 n=5 (SEM=98,29); NTS Gruppe 3849 n=5 (SEM=226,7) ($p=0,0582$)). Der prozentuale Anteil ST2 exprimierender NK-Zellen am gesamten NK-Zell Pool der Milz zeigt sich in der NTS signifikant erhöht. Ebenso zeigte sich die ST2 MFI auf NK-Zellen in der NTS in der Milz deutlich erhöht, wenngleich dieser Unterschied knapp nicht signifikant war.

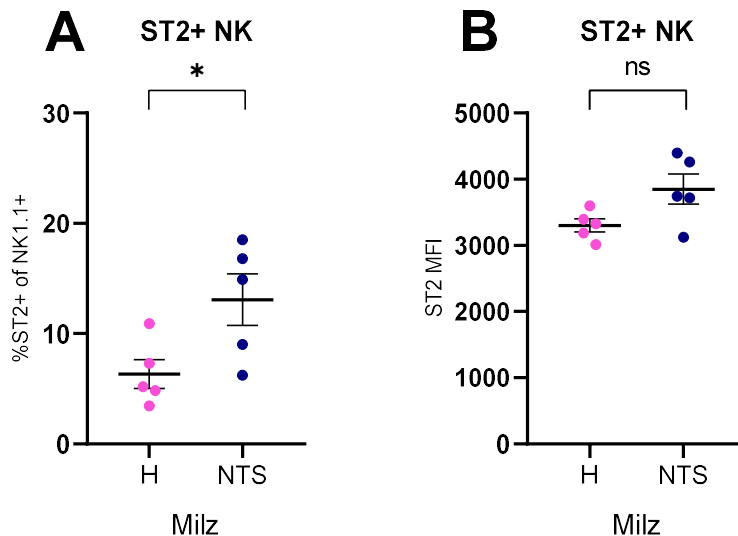


Abbildung 21: ST2 Expression auf NK-Zellen in H und NTS.

(A) Prozent der ST2+ NK-Zellen und (B) ST2 MFI in Milz. N=5/Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

In der Milz zeigte sich eine signifikant höhere prozentuale ST2 Expression auf iNKT-Zellen in der NTS Gruppe (H Gruppe 46,38% n=5 (SEM=5,848); NTS Gruppe 86,78% n=5 (SEM=2,522) ($p=0,0002$)), wobei für die ST2 MFI hier kein signifikanter Unterschied errechnet wurde (H Gruppe 5559 n=5 (SEM=247,5); NTS Gruppe 6227 n=5 (SEM=441,7) ($p=0,2236$)). Während der Anteil ST2+iNKT-Zellen an iNKT-Zellen der Milz in der NTS

signifikant erhöht war, ist die ST2 Expression der einzelnen Zellen unverändert zwischen den beiden Gruppen.

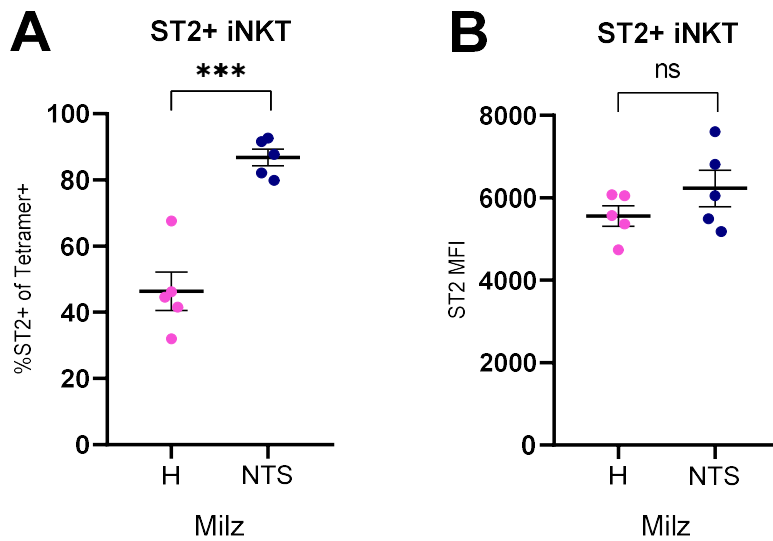


Abbildung 22: ST2 Expression auf iNKT-Zellen in H und NTS.

(A) Prozent der ST2+ iNKT-Zellen und (B) ST2 MFI in der Milz. N=5/Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

In der Milz wurde eine signifikant erhöhte prozentuale ST2 Expression auf iNKT1-Zellen in der NTS Gruppe errechnet (H Gruppe 89,78% n=5 (SEM=2,299); NTS Gruppe 96,56% n=5 (SEM=0,3855) (p=0,0196)), wobei sich kein signifikanter Unterschied in der ST2 MFI zeigte (H Gruppe 5689 n=5 (SEM=269,5); NTS Gruppe 6334 n=5 (SEM=459,2) (p=0,2600)). Während der Anteil ST2+iNKT1-Zellen an iNKT1-Zellen der Milz signifikant erhöht war, ist die ST2 Expression der einzelnen Zellen unverändert zwischen den Gruppen.

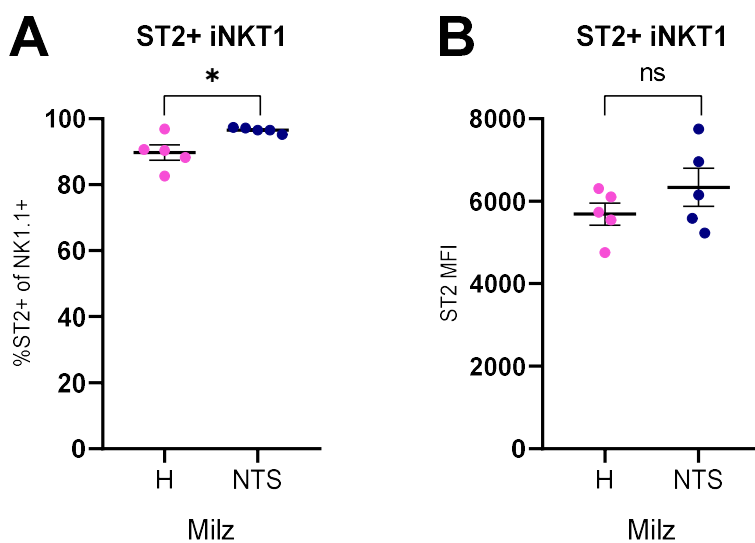


Abbildung 23: ST2 Expression auf iNKT1-Zellen in H und NTS.

(A) Prozent der ST2+iNKT1-Zellen und (B) ST2 MFI in der Milz. N=5/Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

Die prozentuale ST2 Expression auf iNKT2- und iNKT17-Zellen in der Milz zeigte sich in der NTS Gruppe signifikant erhöht (H Gruppe 4,784% n=5 (SEM=1,698); NTS Gruppe 27,34% n=5 (SEM=2,829) (p=0,0079)), während die ST2 MFI hier ohne signifikanten Unterschied war (H Gruppe 3551 n=5 (SEM=282,0); NTS Gruppe 4252 n=5 (SEM=426,8) (p=0,2080)). Während der Anteil ST2+iNKT2- und iNKT17-Zellen an iNKT2- und iNKT17-Zellen der Milz signifikant erhöht war, ist die ST2 Expression der einzelnen Zellen unverändert zwischen den beiden Gruppen.

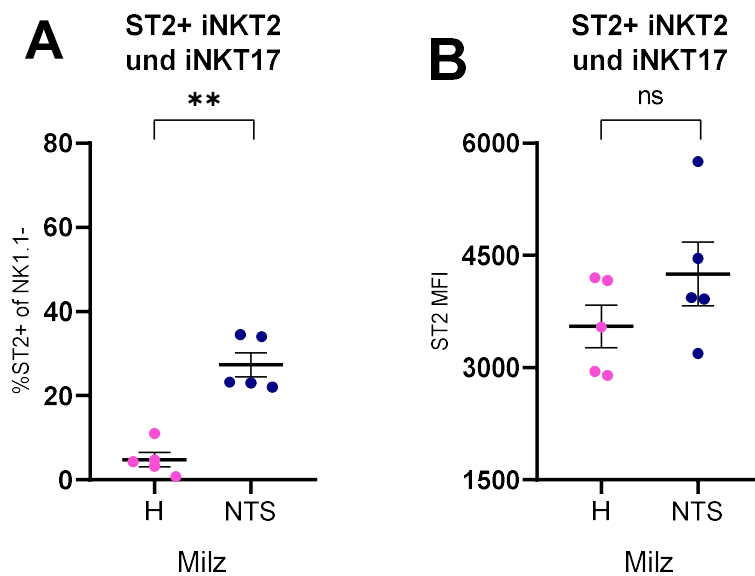


Abbildung 24: ST2 Expression auf iNKT2- und iNKT17-Zellen in H und NTS.
(A) Prozent der ST2+iNKT2- und iNKT17-Zellen und (B) ST2 MFI in der Milz. N=5/Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert ± SEM.

3.1.4 ST2 Expression auf T_{reg} in der NTS in Milz und Lymphknoten

Die in Kapitel 2.7.3 beschriebenen Fluorophor-konjugierten Antikörper des Panel 4 wurden zur Evaluierung der Expression von ST2 auf T_{reg} verwendet.

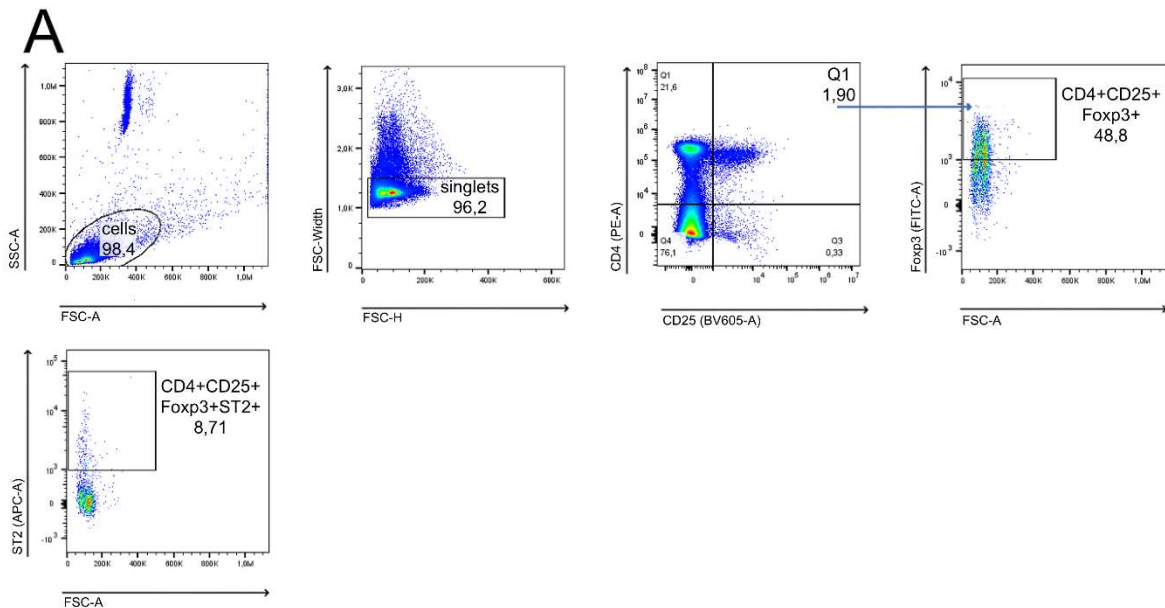


Abbildung 25: Panel 4 Gatingstrategie.

Für CD4+CD25+Foxp3+ST2+T_{reg} in Lymphknoten und der Milz in gesunden und nephritischen WT Mäusen.

Die angegebenen Werte sind der mittlere prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der Elterngeneration einer Gruppe. In Panel 4 wurden T_{reg} hinsichtlich ihrer ST2 Expression in gesunden (H) sowie kranken Mäusen 14 Tage nach Induktion der NTS (NTS) analysiert.

Kein signifikanter Unterschied in der prozentualen Expression von ST2 ergab sich für T_{reg} in Lymphknoten (H Gruppe 10,76% n=5 (SEM=1,418); NTS Gruppe 9,584% n=5 (SEM=2,199) (p=0,6645)), ebenso zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied in der ST2 MFI (H Gruppe 1889 n=5 (SEM=75,88); NTS Gruppe 2053 n=5 (SEM=108,8) (p=0,2531)). Auch für die prozentuale Expression von ST2 auf T_{reg} in der Milz wurde kein signifikanter Unterschied errechnet (H Gruppe 61,62% n=5 (SEM=7,227); NTS Gruppe 75,98% n=5 (SEM=0,9977) (p=0,0846)), ebenso zeigte sich hier für die ST2 MFI kein signifikanter Unterschied (H Gruppe 1772 n=5 (SEM=44,72); NTS Gruppe 1805 n=5 (SEM=45,55) (p=0,6187)).

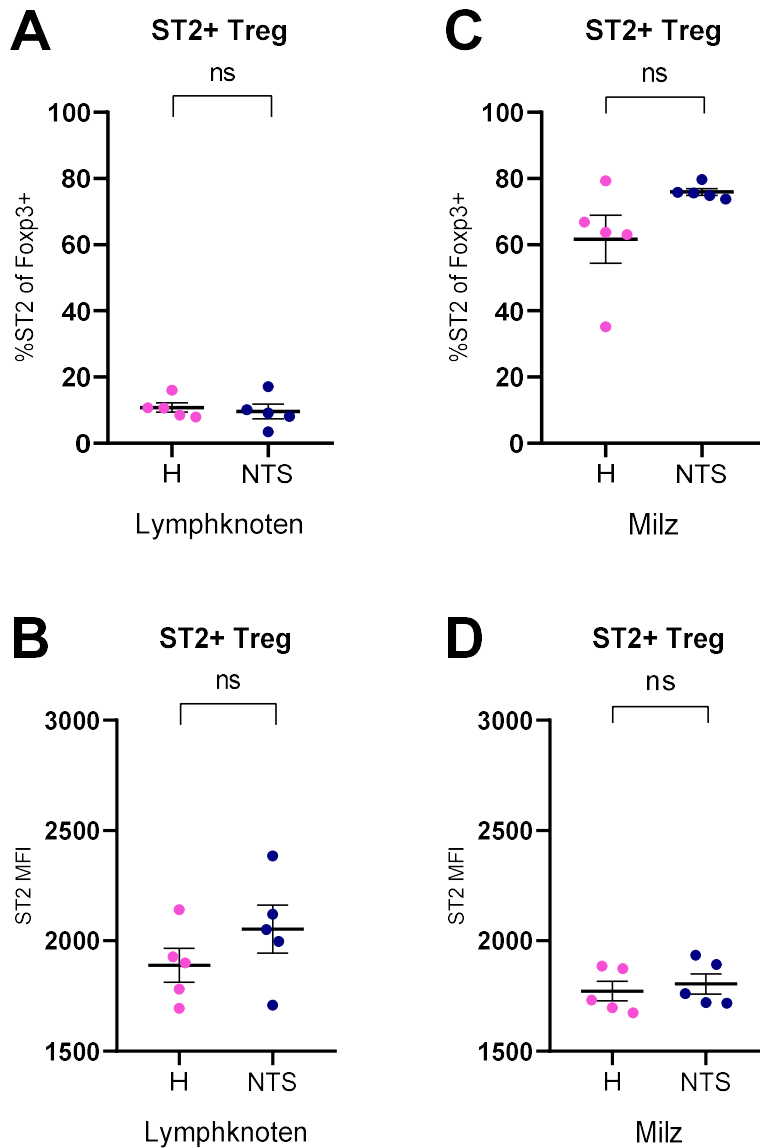


Abbildung 26: ST2 Expression auf T_{reg} in H und NTS.

(A) Prozent der ST2+ T_{reg} und (B) ST2 MFI in Lymphknoten und (C) Prozent der ST2+ T_{reg} und (D) ST2 MFI in der Milz. $N=5/$ Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

In der durchflusszytometrischen Untersuchung der ST2 Expression von H gegenüber NTS Mäusen zeigte sich demnach eine signifikant niedrigere Expression von ST2 auf klassischen und nicht klassischen Monozyten in der Milz in der NTS Gruppe gegenüber der H Gruppe. Der Anteil ST2+B-Zellen an der B-Zell Population in der Milz zeigte sich in der NTS Gruppe erhöht, während die ST2 Expression der Zellen signifikant verringert war. In der NTS zeigte sich weiters in der Milz der prozentuale Anteil ST2 exprimierender NK-Zellen am gesamten NK-Zell Pool der Milz signifikant erhöht, während die ST2 MFI hier zwar ebenso deutlich erhöht, jedoch knapp nicht signifikant war.

3.2 Verringerte Albuminurie in $St2^{-/-}$ Mäusen

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der ACR an den Messzeitpunkten Tag null (d0), Tag sieben (d7) und Tag 14 (d14) zwischen WT Mäusen und $St2^{-/-}$ Mäusen. Dennoch zeichnet sich ein Trend hin zu verringerter Albuminurie bei $St2^{-/-}$ Mäusen ab. Bei gepoolten Daten aus zwei unabhängigen Experimenten zeigte sich an d0 für die WT Gruppe eine mittlere ACR ($\mu\text{g}/\text{mg}$) von 24,30 $n=9$ (SEM=5,005), für die $St2^{-/-}$ Gruppe 44,17 $n=10$ (SEM=26,41) ($p=0,7197$). An d7 zeigte sich für die WT Gruppe eine mittlere ACR ($\mu\text{g}/\text{mg}$) von 44979 $n=9$ (SEM=22655), für die $St2^{-/-}$ Gruppe 23320 $n=8$ (SEM=6716) ($p=0,5414$). An d14 zeigte sich für die WT Gruppe eine mittlere ACR ($\mu\text{g}/\text{mg}$) von 158011 $n=8$ (SEM=54263), für die $St2^{-/-}$ Gruppe 51416 $n=8$ (SEM=13053) ($p=0,0650$).

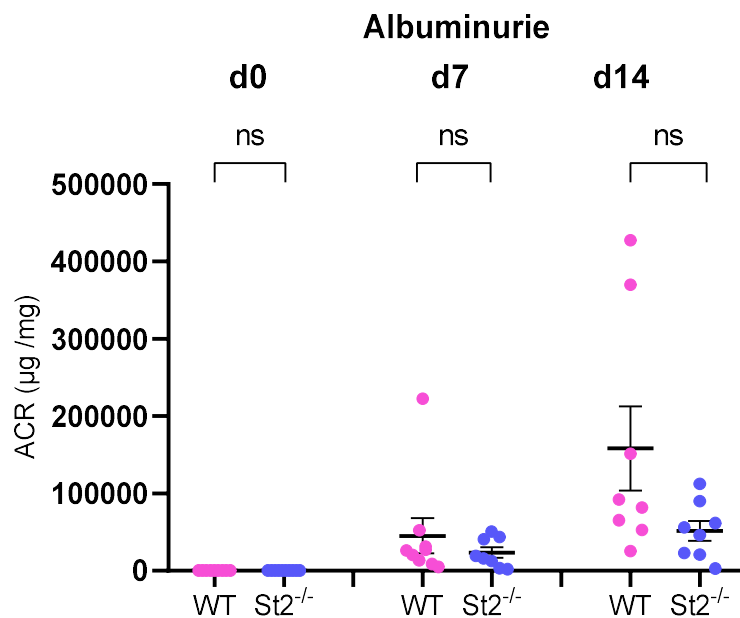


Abbildung 27: Albuminurie in nephritischen WT und $St2^{-/-}$ Mäusen.

ACR in $\mu\text{g}/\text{mg}$. Gemessen an Tag d0, d7 und d14 nach Induktion der NTS in WT und $St2^{-/-}$ Mäusen. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben; d0 $n=9$ WT Gruppe, $n=10$ $St2^{-/-}$ Gruppe; d7 $n=9$ WT Gruppe, $n=8$ $St2^{-/-}$ Gruppe; d14 $n=8$ /Gruppe; je aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.3 Histologisch gleich starke glomeruläre Schädigung in WT und $St2^{-/-}$ Mäusen

Der PAS Score zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Für die WT Gruppe wurde ein mittlerer PAS-Score von 2,004 $n=8$ (SEM=0,05020) und für die $St2^{-/-}$ Gruppe 2,008 $n=9$ (SEM=0,07146) ($p=0,9706$) ermittelt. Demnach war der histologische glomeruläre Schaden in beiden Gruppen ähnlich stark ausgeprägt.

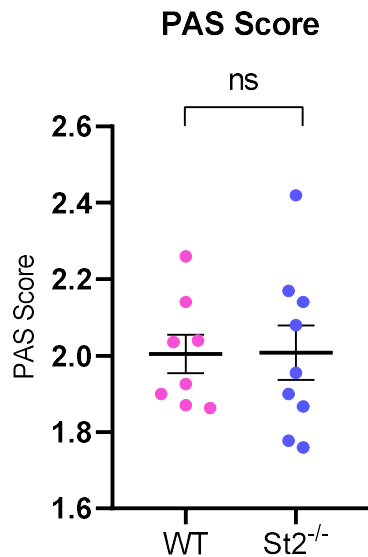


Abbildung 28: PAS Score nach d14.

PAS Score in Nieren nephritischer WT und $St2^{-/-}$ Mäuse. $n=8$ WT Gruppe, $n=9$ $St2^{-/-}$ Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

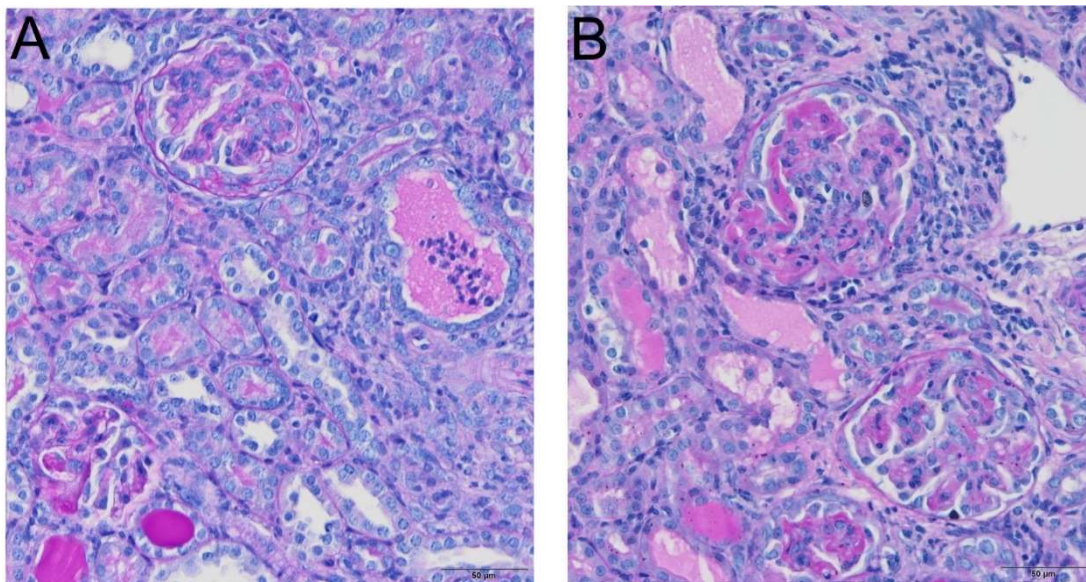


Abbildung 29: PAS Färbung von Nierenpräparaten.

(A) Repräsentative Glomeruli einer Maus der WT Gruppe. (B) Repräsentative Glomeruli einer Maus der $St2^{-/-}$ Gruppe. Der Maßstab entspricht $50\mu\text{m}$ (400-fache Vergrößerung).

3.4 Gesteigerte B-Zell Antwort in $St2^{-/-}$ Mäusen

14 Tage nach Induktion der NTS wurde die humorale Antwort durch die Bestimmung von Maus anti-Kaninchen IgG evaluiert. Bei einer Verdünnung von 1:1600 fand sich für die WT-Gruppe eine OD von 0,9988 nm (n=4) (SEM=0,05915) und für die $St2^{-/-}$ Gruppe eine OD von 1,569 nm (n=5) (SEM=0,08201). Der Unterschied ist signifikant mit einem p-Wert von 0,0011. In $St2^{-/-}$ Mäusen zeigt sich somit eine gesteigerte B-Zell Antwort im Vergleich zur WT Gruppe.

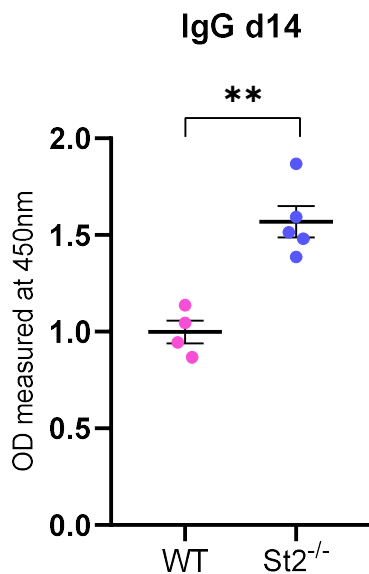


Abbildung 30: B-Zell Antwort nach d14.

OD von Maus anti-Kaninchen IgG in einer Verdünnung von 1:1600 an d14 nach Induktion der NTS in nephritischen WT und $St2^{-/-}$ Mäusen. N=4 WT Gruppe, n=5 $St2^{-/-}$ Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

3.5 $ST2$ Defizienz beeinflusst die renale Zellinfiltration nicht

In die Niere infiltrierende Zellen wurden mit immunhistochemischen Methoden gefärbt und anschließend verblindet quantifiziert. Die mikroskopischen Auswertungen der CD4+T-Zellen, CD8+T-Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ergaben jeweils kein signifikant unterschiedliches Ergebnis zwischen den beiden Gruppen. In für CD4 gefärbten Schnitten wurden im Durchschnitt pro sechs HPFs in der WT Gruppe 22,50 n=4 (SEM=6,964) und in der $St2^{-/-}$ Gruppe 23,87 n=5 (SEM=4,673) (p=0,8707) CD4+ Zellen gezählt. In für CD8 gefärbten Schnitten wurden im Durchschnitt pro sechs HPFs in der WT Gruppe 15,79 n=4 (SEM=3,524) und in der $St2^{-/-}$ Gruppe 17,60 n=5 (SEM=2,979) (p=0,7048) CD8+ Zellen gezählt. Die Makrophagen wurden mittels eines semiquantitativen Scores ausgewertet, hierfür ergab sich für die WT Gruppe ein mittlerer Wert von 2,813 n=4 (SEM=0,2135) und für die $St2^{-/-}$ Gruppe von 2,400 n=5 (SEM=0,2179) (p=0,2778). Die durchschnittlich in sechs HPFs ausgezählten Ly6g+ Zellen, welche indikativ für neutrophile

Granulozyten sind, beliefen sich in der WT Gruppe auf 22,96 n=4 (SEM=6,774) und in der $St2^{-/-}$ Gruppe auf 22,80 n=5 (SEM=4,792) ($p=0,9849$). Intraglomerulär wurden durchschnittlich pro zehn Glomeruli in jeder Maus in der WT-Gruppe 8,475 n=4 (SEM=1,500) und in der $St2^{-/-}$ Gruppe 8,800 n=5 (SEM=2,344) ($p=0,9158$) Ly6g+ Zellen gezählt.

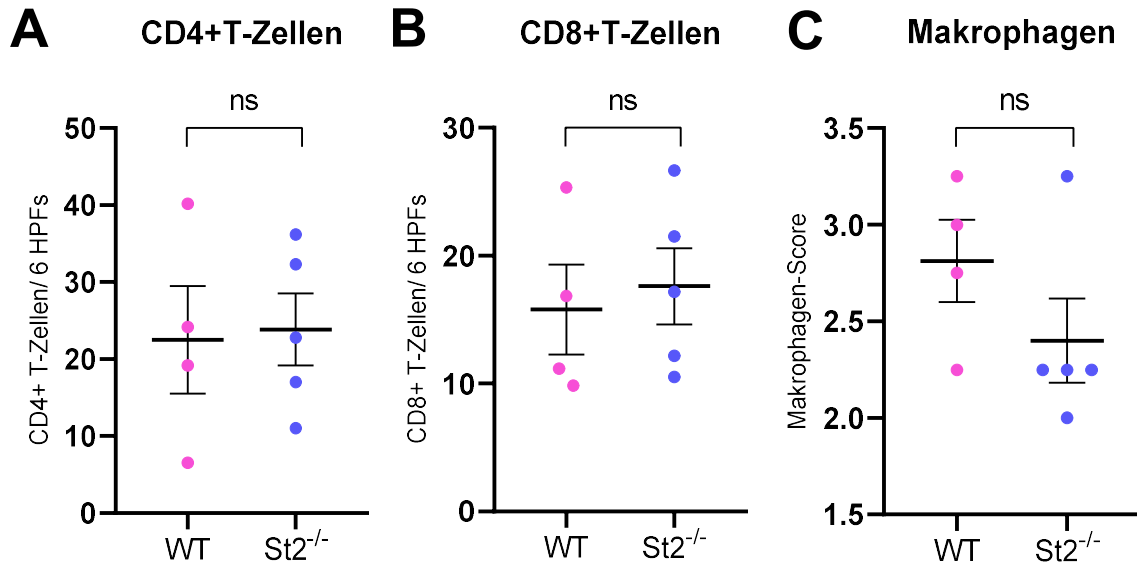


Abbildung 31: In die Niere infiltrierende Zellen in nephritischen WT und $St2^{-/-}$ Mäusen an d14. (A) CD4+T-Zellen/ 6 HPFs. (B) CD8+T-Zellen/ 6 HPFs. (C) Makrophagen-Score. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM. Alle Färbungen wurden auf Nierengewebschnitten analysiert. N=4 WT Gruppe, n=5 $St2^{-/-}$ Gruppe.

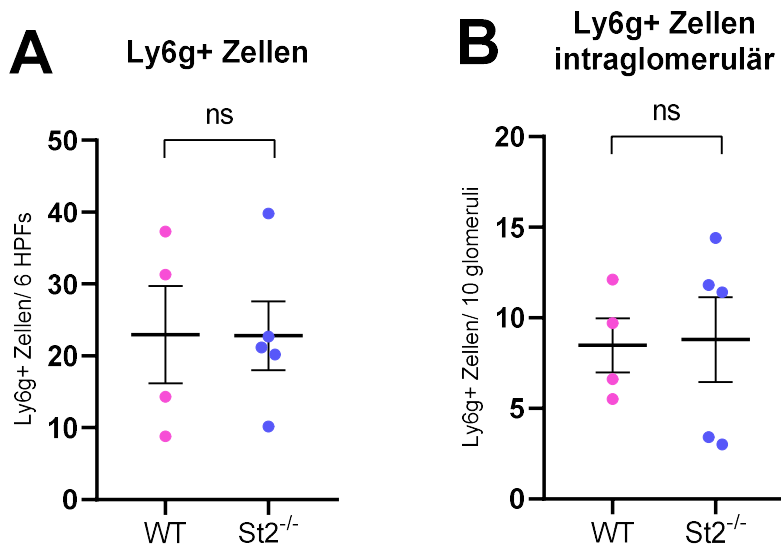


Abbildung 32: In die Niere infiltrierende Ly6g+ neutrophile Granulozyten an d14. (A) Ly6g+Zellen/ 6 HPFs. (B) Intraglomeruläre Ly6g+Zellen/ 6 HPF. Beide Färbungen wurden auf Nierengewebschnitten analysiert. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM. N=4 WT Gruppe, n=5 $St2^{-/-}$ Gruppe.

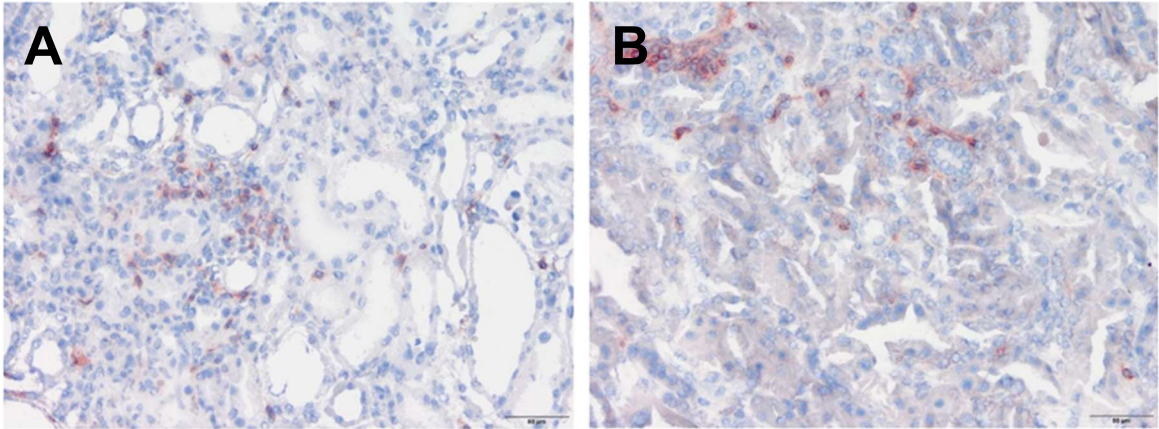


Abbildung 33: CD4 Färbung von Nierenpräparaten.

(A) Repräsentatives Nierengewebe mit CD4 Positivität einer Maus der WT Gruppe. (B) Repräsentatives Nierengewebe mit CD4 Positivität einer Maus der $St2^{-/-}$ Gruppe. Der Maßstab entspricht 50µm (400-fache Vergrößerung).

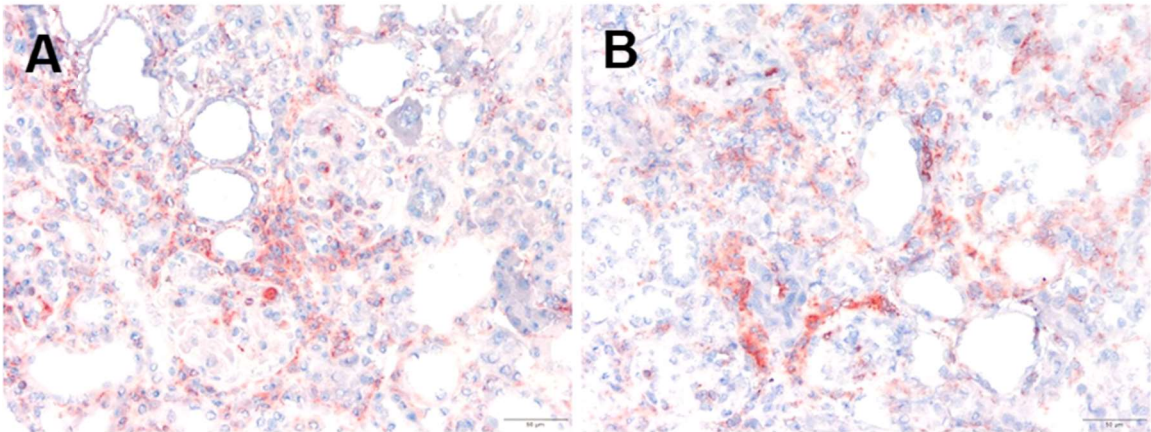


Abbildung 34: CD68 Färbung von Nierenpräparaten.

(A) Repräsentatives Nierengewebe mit CD68 Positivität einer Maus der WT Gruppe. (B) Repräsentatives Nierengewebe mit CD68 Positivität einer Maus der $St2^{-/-}$ Gruppe. Der Maßstab entspricht 50µm (400-fache Vergrößerung).

3.6 Prozentualer Anteil der NK-Zellen in *St2^{-/-}* Mäusen erhöht

Das in Kapitel 2.7.3 beschriebene Antikörper Panel und die in Kapitel 2.7.4 beschriebene Gatingstrategie wurden verwendet, um die Verteilung der Zellpopulationen darzustellen. T-Helferzellen wurden als CD45+CD4+CD8- und zytotoxische T-Zellen als CD45+CD4-CD8+ identifiziert. NK-Zellen wurden als CD45+CD3-NK1.1+ dargestellt. iNKT-Zellen wurden als CD45+CD3+Tetramer+ (114) dargestellt und weiter unterschieden in NK1.1+ iNKT1-Zellen und NK1.1- iNKT2- und iNKT17-Zellen.

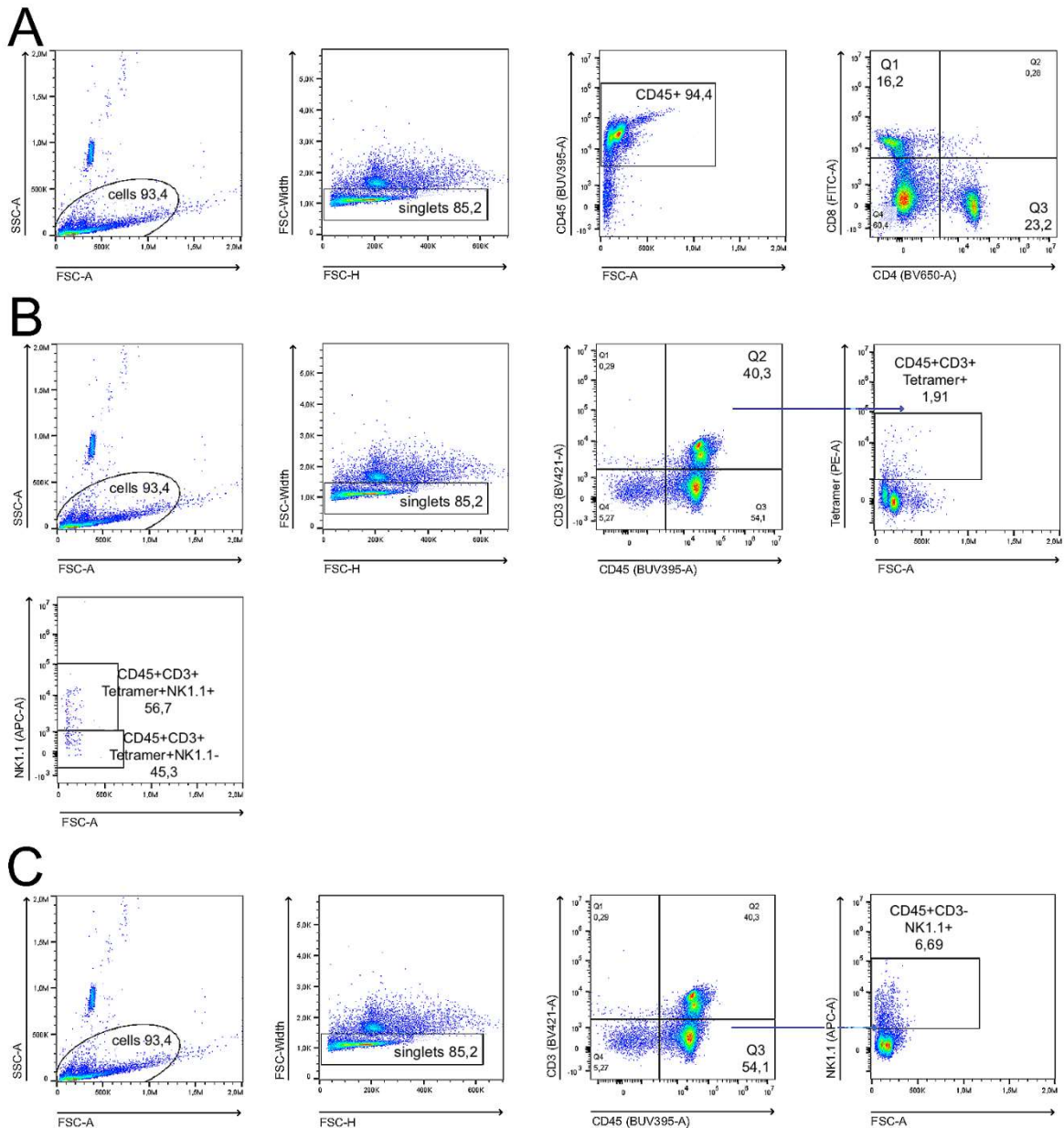


Abbildung 35: Gatingstrategie der Verteilung der Zellpopulationen in Milz und Lymphknoten bei nephritischen WT und *St2^{-/-}* Mäusen.

Für (A) CD45+CD4+CD8- T-Helferzellen und CD45+CD4-CD8+ Zytotoxische T-Zellen, (B) CD45+CD3+Tetramer+ iNKT-Zellen, CD45+CD3+Tetramer+NK1.1+ iNKT1-Zellen und CD45+CD3+Tetramer+NK1.1- iNKT2- und iNKT17-Zellen und (C) CD45+CD3-NK1.1+ NK-Zellen.

Die angegebenen Werte sind der mittlere prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der Elterngeneration einer Gruppe. Die statistische Auswertung dieser Daten ergab für Zellen aus den Lymphknoten keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der NK-Zellen (WT Gruppe 10,87% n=4 (SEM=2,794); St2^{-/-} Gruppe 15,60% n=5 (SEM=2,618) (p=0,2588)), jedoch wurde in der Milz ein statistisch signifikanter Unterschied für die NK-Zell Population errechnet (WT Gruppe 2,100% n=4 (SEM=0,4235); St2^{-/-} Gruppe 4,156% n=5 (SEM=0,9090) (p=0,0317)). Demnach zeigte sich der prozentuale Anteil der NK1.1 positiven Zellen an CD45+CD3⁻ Zellen in der Milz in der St2^{-/-} Gruppe im Vergleich zur WT Gruppe signifikant erhöht.

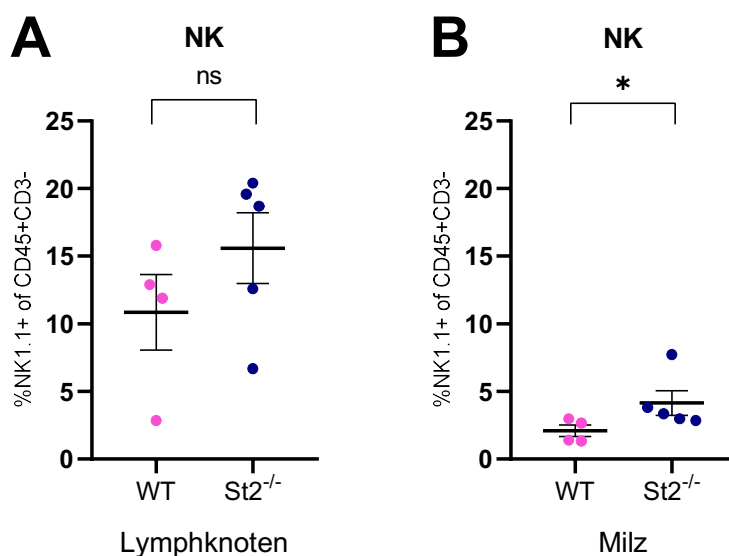


Abbildung 36: Prozent der NK1.1+ der CD45+CD3⁻ in (A) Lymphknoten und (B) Milz. N=4 WT Gruppe, n=5 St2^{-/-} Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert ± SEM.

Weiterhin zeigte sich in den Lymphknoten kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich der iNKT-Zellen (WT Gruppe 12,69% n=4 (SEM=3,204); St2^{-/-} Gruppe 11,12% n=5 (SEM=4,297) (p=0,7885)), ebenso wenig in der Milz (WT Gruppe 36,98% n=4 (SEM=5,747); St2^{-/-} Gruppe 30,90% n=5 (SEM=3,603) (p=0,3807)). Auch die iNKT1-Zellen zeigten sich zwischen den Gruppen ohne signifikanten Unterschied in Lymphknoten (WT Gruppe 49,78% n=4 (SEM=7,552); St2^{-/-} Gruppe 57,90% n=5 (SEM=5,742) (p=0,4110)) sowie der Milz (WT Gruppe 6,750% n=4 (SEM=0,7664); St2^{-/-} Gruppe 8,046% n=5 (SEM=0,8848) (p=0,3190)). Weiters wurde für die iNKT2- und iNKT17-Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen errechnet, weder in Lymphknoten (WT Gruppe 51,30% n=4 (SEM=7,445); St2^{-/-} Gruppe 43,42% n=5 (SEM=5,988) (p=0,4308)) noch in der Milz (WT Gruppe 93,25% n=4 (SEM=0,7773); St2^{-/-} Gruppe 91,96% n=5 (SEM=0,8824) (p=0,3222)).

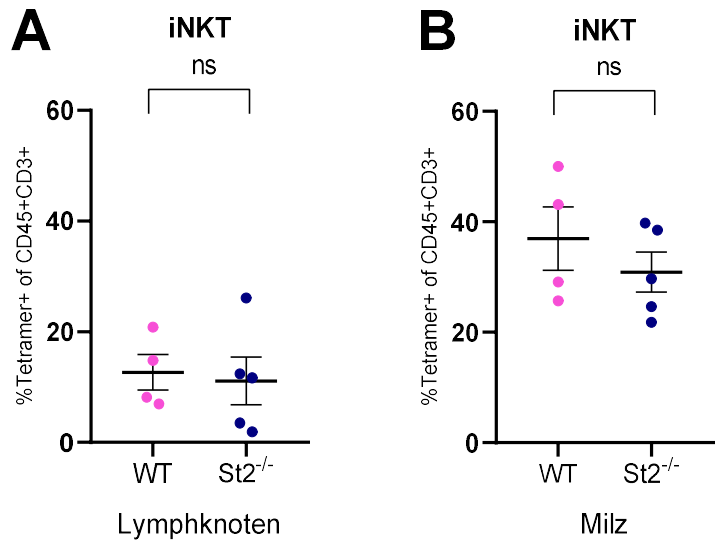


Abbildung 37: Prozent der Tetramer+ der CD45+CD3+ in (A) Lymphknoten und (B) Milz. N=4 WT Gruppe, n=5 St2^{-/-} Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert ± SEM.

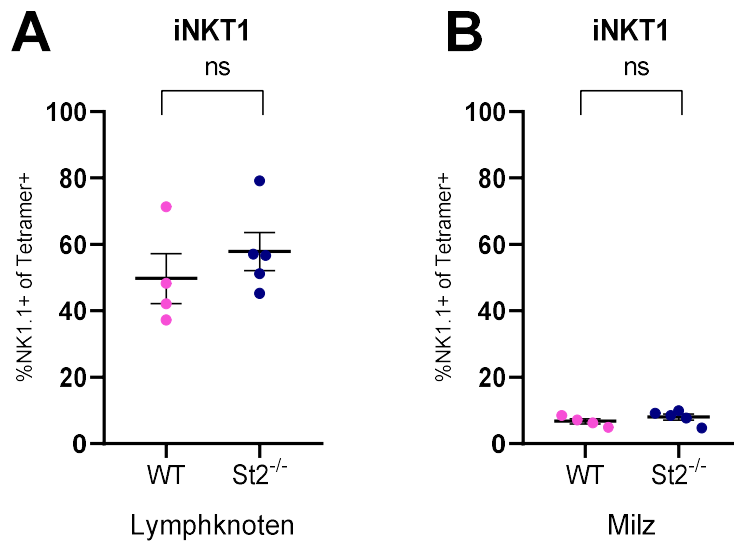


Abbildung 38: Prozent der NK1.1+ der Tetramer+ in (A) Lymphknoten und (B) Milz. N=4 WT Gruppe, n=5 St2^{-/-} Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert ± SEM.

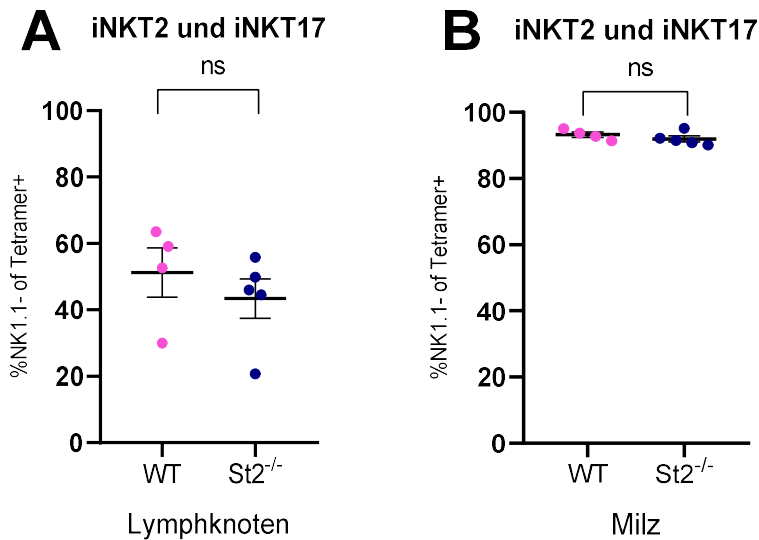


Abbildung 39: Prozent der NK1.1- der Tetramer+ in (A) Lymphknoten und (B) Milz. N=4 WT Gruppe, n=5 St2^{-/-} Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

Die statistische Auswertung der Daten ergab hinsichtlich der CD4+T-Zellen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in Lymphknoten (WT Gruppe 14,00% n=4 (SEM=1,173); St2^{-/-} Gruppe 16,36% n=5 (SEM=1,967) (p=0,3688)) sowie der Milz (WT Gruppe 7,480% n=4 (SEM=0,5125); St2^{-/-} Gruppe 6,234% n=5 (SEM=0,5089) (p=0,3730)).

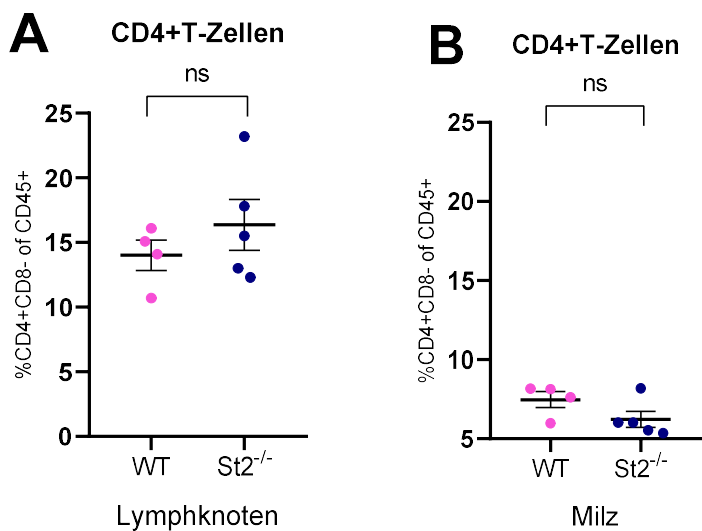


Abbildung 40: Prozent der CD4+CD8- der CD45+ in (A) Lymphknoten und (B) Milz. N=4 WT Gruppe, n=5 St2^{-/-} Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert \pm SEM.

Ebenso wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede errechnet für CD8+T-Zellen zwischen den Gruppen in Lymphknoten (WT Gruppe 10,00% n=4 (SEM=2,672); St2^{-/-} Gruppe 9,276% n=5 (SEM=1,938) (p=0,8277)) und der Milz (WT Gruppe 3,423% n=4

(SEM=0,3604); St2^{-/-} Gruppe 2,682% n=5 (SEM=0,2381) (p=0,1183)).

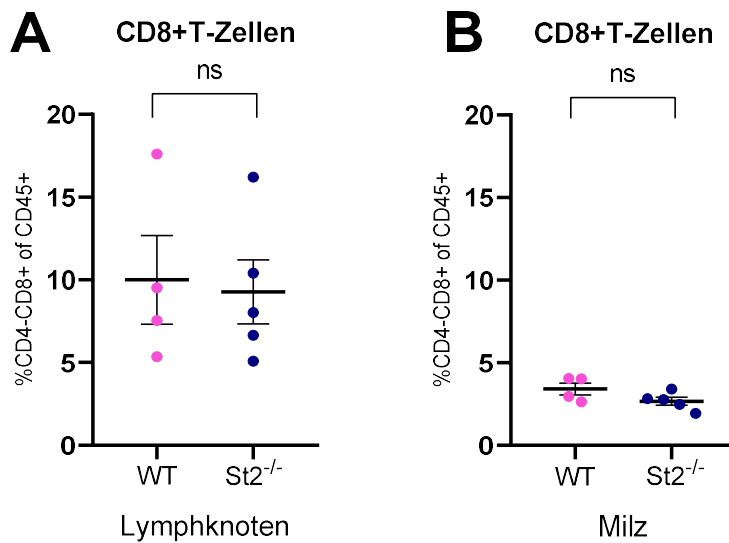


Abbildung 41: Prozent der CD4-CD8+ der CD45+ in (A) Lymphknoten und (B) Milz. N=4 WT Gruppe, n=5 St2^{-/-} Gruppe. Darstellung aller Daten als Mittelwert ± SEM.

Demnach zeigte das WT vs. St2^{-/-} Experiment einen Trend zu verminderter Albuminurie in St2^{-/-} Mäusen, jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Albuminurie der Mäuse an Tag 0, 7 oder 14. Keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse fanden sich ebenso in PAS-Score, den immunhistochemischen Färbungen und den meisten Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie in Lymphknoten und Milz. Die B-Zell Antwort gemessen als optische Dichte des autologen IgG und der prozentuale Anteil der NK-Zellen an dem Pool der CD45+CD3- Zellen in der Milz waren jeweils in den nephritischen St2^{-/-} Mäusen signifikant erhöht.

4 Diskussion

Die NTS ist ein potentes Modell der RPGN, in dem die IL-33/ST2 Achse potenziell sowohl protektive als auch pathogene Effekte haben kann. Immunregulative Effekte werden über den ST2 Rezeptor der ILC2s und T_{reg} sowie von intranukleärem IL-33 vermittelt, während pathogene Effekte vorrangig über den ST2 Rezeptor anderer Zellen, wie DC, Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, T-Zellen oder iNKT-Zellen vermittelt werden (93,106,109). Hierbei handelt es sich um Zellen, welche auch zur Pathogenese der NTS beitragen (21,115).

Um zu evaluieren, ob sich die Expression von ST2 auf Immunzellen zwischen gesunden Mäusen und Mäusen mit etablierter Nierenerkrankung unterscheidet, wurde die NTS in WT Mäusen induziert. Lymphknoten und Milz wurden für durchflusszytometrische Analysen verwendet. In der Milz wurde die Expression von ST2 auf klassischen und nicht klassischen Monozyten, neutrophilen Granulozyten, $CD4+$ und $CD8+T-$, B-, NK-, iNKT-, iNKT1-, iNKT2- und iNKT17-Zellen sowie T_{reg} untersucht. Die Expression von ST2 auf $CD4+$ und $CD8+T-$, B-Zellen und T_{reg} wurde ebenfalls in drainierenden Lymphknoten untersucht.

Nephritische WT Mäuse exprimierten im Vergleich zu gesunden WT Mäusen signifikant weniger ST2 auf klassischen ($p < 0,0001$) und nicht klassischen ($p = 0,0037$) Monozyten in der Milz. In der NTS werden Makrophagen rekrutiert, indem DC die T-Zellen zur Ausschüttung von Zytokinen anregen, welche neben $CD8+T$ -Zellen auch Makrophagen rekrutieren (60). Aktivierte TH1-Zellen regen über $IFN-\gamma$ Monozyten dazu an, zu gewebsschädigenden Makrophagen zu differenzieren (64). Außerdem rekrutieren $IFN-\gamma$ und IL-17A exprimierende iNKT-Zellen unter anderem Monozyten und Makrophagen und steigern deren Zytokinproduktion (93). IL-12 stimuliert die iNKT-Zellen dazu, $IFN-\gamma$ zu produzieren, in diesem Vorgang wird IL-33 als Kofaktor von IL-12 diskutiert (93). Da IL-33 über den ST2 Rezeptor seine Wirkung entfaltet, ist vermutlich auch dieser in der Rekrutierung von Monozyten über $IFN-\gamma$ von Bedeutung (93). Die Beobachtung des verminderten Anteils $ST2+$ Monozyten am Gesamtpool der Monozyten in der Milz in der NTS könnte auf eine vermehrte Rekrutierung $ST2+$ Monozyten in die Niere hindeuten, weshalb deren Anteil in der Milz vermindert ist. Um diese Hypothese weiter zu unterstützen, benötigen wir weitere Studien, um Nierengewebe durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression von ST2 auf klassischen und nicht klassischen Monozyten sowie in Makrophagen zu analysieren.

In unserem Experiment war der Anteil ST2⁺ neutrophiler Granulozyten in der Milz in nephritischen WT Mäusen im Vergleich zu gesunden WT Mäusen prozentual signifikant verringert ($p < 0,0001$), ohne Unterschied in der ST2 MFI. Die prozentuale Verminderung an ST2⁺ neutrophilen Granulozyten am Gesamtpool der neutrophilen Granulozyten in nephritischen Mäusen ohne Änderung der ST2 MFI kann durch eine Änderung der absoluten Anzahl ST2⁺ neutrophiler Granulozyten oder der Elternpopulation bedingt sein, weswegen insgesamt nicht von verminderter Expression gesprochen werden kann. Eine Limitation der Studie ist, dass auf die Quantifikation der absoluten Zellzahlen im Rahmen dieser Arbeit verzichtet wurde, da der Fokus dieser Studie auf der Expression von ST2 lag.

B-Zellen in der Milz exprimierten signifikant weniger ST2 in nephritischen WT Mäusen im Vergleich zu gesunden WT Mäusen ($p < 0,0005$), wobei bedacht werden muss, dass der prozentuale Anteil ST2 exprimierender B-Zellen an den gesamten B-Zellen der Milz signifikant erhöht war ($p < 0,0001$). Der Anteil der ST2⁺ Population an B-Zellen ist allerdings mit 1-2% verhältnismäßig klein. In Lymphknoten unterschied sich die Expression in gesunden und nephritischen Mäusen nicht. Bei der Bildung von IK an der GBM spielen auch autologe Ig eine Rolle (55). Jedoch erreicht die NTS auch in Abwesenheit antikörperproduzierender B-Zellen das volle histologische Ausprägungsbild (116), und wird von B-Zellen demnach nicht maßgeblich beeinflusst. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass B-Zellen die NTS verstärken können (55).

Der geringe Anteil ST2⁺CD4⁺T-Zellen an T-Helferzellen war in nephritischen Mäusen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe im Lymphknoten signifikant erniedrigt ($p = 0,0207$), während sich hinsichtlich der MFI ein nicht signifikanter Trend zeigte. Auf CD4⁺T-Zellen ist daher in erster Linie nur von einem Trend zur geringeren ST2 Expression in der NTS in Lymphknoten auszugehen. In der Milz unterschied sich die Expression in gesunden und nephritischen Mäusen nicht. In der Milz fand sich ein signifikant größerer Anteil ST2⁺CD8⁺T-Zellen in nephritischen WT Mäusen im Vergleich zu gesunden WT Mäusen ($p < 0,0001$), ohne Unterschied in der ST2 MFI, was in erster Linie durch eine Änderung der absoluten Zellzahlen und nicht durch die Expression selbst erklärt werden kann. In Lymphknoten unterschied sich die Expression nicht. In sekundär lymphatischen Organen unterscheidet sich die ST2 Expression weder auf CD4⁺T- noch auf CD8⁺T-Zellen signifikant zu der gesunder Mäuse. Die Untersuchung der ST2 Expression dieser Zellen direkt in der Niere könnte weiteren Aufschluss über deren Funktion geben.

Die Expression von ST2 war in nephritischen WT Mäusen im Vergleich zu gesunden WT Mäusen auf T_{reg} in Lymphknoten und der Milz nicht signifikant unterschiedlich. In der Milz zeigte sich hier ein Trend hin zu einem höheren Anteil in nephritischen WT Mäusen, der allerdings nicht signifikant (p=0,0846) war. In der NTS vermitteln T_{reg} antiinflammatorische Effekte (115). Vor Induktion der NTS transferierte T_{reg} mildern deren Verlauf, wobei sie vorrangig in Lymphknoten des renalen Abflussgebietes aufzufinden sind (14). In der späteren Phase der NTS infiltrieren sie die Niere und unterdrücken die TH1 Aktivierung (65). Im Gegensatz zu Li et al. zeigten Matta et al. in Lymphknoten und in der Milz, wie durch IL-33 Gabe die DC zu IL-2 Produktion angeregt werden, woraufhin ST2+T_{reg} expandierten (81). Die ST2 Expression auf DC und T_{reg} war in dieser Studie erhöht (81). Diese Steigerung der ST2 Expression zeigte sich in unserem Experiment in der NTS ohne zusätzliche Verabreichung von IL-33 nicht. IL-33 begünstigt über die DC auch die TH2 Immunantwort von CD4+T-Zellen (66,81). Stremaska et al. wiesen nach der Verabreichung von IL2 und IL-33 eine Vermehrung von ST2+T_{reg} in lymphatischen Organen im IRI Modell nach (98). Außerdem verabreichten sie in IRI und Cisplatin-induziertem Nierenversagen das Hybridzytokin IL2IL33 (98). Dadurch wurden ST2+T_{reg} effektiver in der Unterdrückung von CD4+T-Zellen und der renale Schaden wurde verringert (98). T_{reg} zeigten sich in der Milz erniedrigt, während sie in der Niere erhöht waren, vermutlich wanderten sie dorthin aus (98). Ihrer Theorie nach fungiert die Milz als Reservoir für T_{reg}, die durch die Expression von ST2 auf das Alarmsignal IL-33 reagieren können (98). Eine Untersuchung der ST2 Expression auf renalen T_{reg} in unserem Modell hat im Rahmen dieser Studie nicht stattgefunden. T_{reg} erfüllen ihre regulatorische Rolle in der NTS allerdings vorrangig in den Lymphknoten und hier zeigte sich kein Unterschied in der ST2 Expression von T_{reg} (115). Ob die IL-33/ST2 Achse dennoch die Funktion von T_{reg} in unserem Modell beeinflusst, kann erst in weiteren Studien mittels Suppressionsassays und Evaluierung von Transkriptionsfaktoren wie Foxp3 in diesem Knockout Modell festgestellt werden.

Unreife renale DC werden in der NTS neben iNKT-Zellen und T_{reg} als antiinflammatorischer Gegenpol angesehen (21). Ihre regulatorische Rolle nehmen DC in der NTS in einer frühen Phase ein, indem sie iNKT-Zellen über CXCL16 rekrutieren, wodurch in weiterer Folge die inflammatorische Wirkung von Effektor-T-Zellen unterdrückt wird (21,61). Ferhat et al. zeigten in IRI für IL-33 Defizienz die verminderte Infiltration neutrophiler Granulozyten, NK- und iNKT-Zellen in die Niere (93). Zuerst beobachteten sie eine vermehrte Expression von ST2 auf iNKT-Zellen, darauf folgte die iNKT-Zell vermittelte Infiltration mit

neutrophilen Granulozyten in die Niere (93). In diesem Modell spielen iNKT-Zellen eine pathogene Rolle. Der Anteil ST2+iNKT-Zellen in der Milz zeigte sich in unserem Modell in nephritischen WT Mäusen im Vergleich zu gesunden WT Mäusen signifikant erhöht ($p=0,0002$), ohne Unterschied in ST2 MFI. Ebenso zeigte sich der Anteil an ST2+iNKT1-Zellen ($p=0,0196$) und iNKT2- und iNKT17-Zellen ($p=0,0079$) in der Milz in nephritischen WT Mäusen im Vergleich zu gesunden WT Mäusen signifikant erhöht, ohne Unterschied in ST2 MFI. Demnach war in unserem Experiment die ST2 Expression der einzelnen Zellen unverändert zwischen den beiden Gruppen, jedoch liegt in erster Linie eine Änderung der Absolutzahlen der ST2+ Populationen vor. Der prozentuale Anteil an ST2 exprimierenden NK-Zellen am gesamten NK-Zell Pool der Milz in nephritischen WT Mäusen zeigte sich signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden WT Mäusen ($p=0,0355$). Ebenso zeigte sich die ST2 MFI hier erhöht, wenngleich dieser Unterschied knapp nicht signifikant war ($p=0,0582$). Es ist daher in erster Linie von einem Trend zur erhöhten ST2 Expression in der NTS in NK-Zellen in der Milz auszugehen. Da bei IL-33 Defizienz bereits eine verringerte Infiltration der Niere mit NK-Zellen beobachtet wurde, werden weitere Studien benötigt, um die ST2 Expression von NK-Zellen sowie die NK-Zell Infiltration in die Niere in der NTS durchflusszytometrisch zu analysieren.

Zusammenfassend fand sich die ST2 Expression in unserem Modell der NTS auf klassischen und nicht klassischen Monozyten in der Milz signifikant verringert und es zeigte sich ein Trend zu verringerter ST2 Expression auf CD4+T-Zellen in Lymphknoten. Knapp nicht signifikant erhöht war die Expression von ST2 auf NK-Zellen nephritischer Mäuse in der Milz. Der Anteil ST2+ klassischer und nicht klassischer Monozyten und ST2+ neutrophiler Granulozyten in der Milz sowie der Anteil ST2+CD4+T-Zellen an der jeweiligen Elternpopulation im Lymphknoten zeigte sich in der NTS verringert. Unterdessen fand sich der Anteil ST2+B-Zellen, ST2+CD8+T-Zellen, ST2+NK- sowie ST2+iNKT-, ST2+iNKT1-, ST2+iNKT2- und iNKT17-Zellen in der Milz nephritischer Mäuse erhöht.

Diese Expressionsstudie konnte deutlich zeigen, dass ST2 in der NTS auf verschiedenen Immunzellen reguliert ist. Daraus lässt sich jedoch zu diesem Zeitpunkt noch keine Aussage zur Funktion der betroffenen Zellen treffen.

Unsere Ergebnisse aus der ST2 Expressionsstudie in gesunden und nephritischen Mäusen legt eine Beteiligung der IL-33/ST2 Achse an der Pathogenese der NTS nahe. Unsere Arbeitsgruppe zeigte außerdem, dass die Verabreichung von rekombinantem IL-33 in der

NTS die dosisabhängige Verschlechterung der ACR, der Glomerulosklerose und der in die Niere infiltrierenden Makrophagen bedingt (Artinger et al., unpublizierte Daten). Hochdosierte Gabe von rekombinantem IL-33 induzierte eine akute Nierenschädigung mit erhöhten Spiegeln an Lipocalin-2 und tubulären Casts. Basierend auf diesen Vordaten wurde die Hypothese entwickelt, dass die Aktivierung der IL-33/ST2 Achse einen aggravierenden Effekt auf unser Modell der NTS hat.

Eine Möglichkeit, dies zu untersuchen, bieten $St2^{-/-}$ Mäuse, welche weder auf gewebsständigen Zellen noch auf Immunzellen ST2 exprimieren. Diese Mäuse ermöglichen die Evaluierung der globalen ST2 Defizienz *in vivo*, wodurch die Funktion von ST2 im murinen Modell der NTS genauer untersucht werden kann. Im Rahmen dieses Projektes wurde daher das Modell der NTS in WT und globalen $St2^{-/-}$ Mäusen induziert, um den Effekt der ST2 Deletion zu untersuchen.

In unseren Ergebnissen zeigte sich die B-Zell Antwort in ST2 defizienten Mäusen im Vergleich zu WT in der NTS gesteigert. In den $St2^{-/-}$ Mäusen zeigte sich ein Trend zur verminderten Albuminurie, welcher jedoch statistisch nicht signifikant war. Die Glomerulosklerose, gemessen als PAS-Score, zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen nephritischen $St2^{-/-}$ und WT Mäusen. Ebenso fand sich für die in die Niere infiltrierenden CD4⁺T-Zellen, CD8⁺T-Zellen sowie für Makrophagen und neutrophile Granulozyten kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Der prozentuale Anteil der NK1.1⁺ Zellen an CD45⁺CD3⁺-Zellen, also der NK-Zellen, zeigte sich erhöht in der Milz ST2 defizienter Mäuse in der NTS. Diesbezüglich zeigte sich in den Lymphknoten kein Unterschied. Ebenso zeigte sich kein Unterschied im prozentualen Anteil von iNKT-, iNKT1-, iNKT2- und iNKT17-, CD4⁺T- und CD8⁺ T-Zellen in Milz und Lymphknoten zwischen den beiden Gruppen.

Wie zuvor beschrieben, werden Makrophagen in der NTS über DC und T-Zellen rekrutiert (60). Monozyten werden von aktivierten TH1-Zellen und iNKT-Zellen über IFN- γ dazu angeregt, zu gewebsschädigenden Makrophagen zu differenzieren (64). Die iNKT-Zellen werden dazu durch IL-12 und das als Kofaktor fungierende IL-33 angeregt (93). Zhu et al. zeigten die Verstärkung renaler interstitieller Fibrose durch IL-33, denn es bewirkte die Transformation von Monozyten zu Fibroblasten im Knochenmark (107). Li et al. zeigten eine Verschlechterung des UUO Schadens durch IL-33 über nicht klassische Monozyten (106). Die ST2 Defizienz beeinflusste, nach der gemessenen Anzahl an in die Niere

infiltrierenden Makrophagen, die Wirkungskette wenig, in der IL-33 als Kofaktor iNKT-Zellen dazu stimuliert, in weiterer Folge über IFN- γ Makrophagen zu rekrutieren. Klassische und nicht klassische Monozyten exprimierten in der NTS signifikant weniger ST2 in der Milz. Möglicherweise werden vermehrt ST2+Monozyten in die Niere rekrutiert. Hier wäre wie bereits diskutiert eine Untersuchung zur ST2 Expression der in die Niere infiltrierenden klassischen und nicht klassischen Monozyten sowie der Makrophagen in nephritischen WT Mäusen interessant. Statistisch gesehen zeigten die renal infiltrierenden Makrophagen in der NTS bei ST2 Defizienz keinen Unterschied zu WT Mäusen. Aufgrund dieser Ergebnisse wäre es von Interesse im Rahmen weiterer Studien die in die Niere infiltrierenden klassischen und nicht klassischen Monozyten sowie iNKT-Zellen in nephritischen St2^{-/-} Mäusen zu analysieren.

Die St2^{-/-} Mäuse wiesen im Vergleich zu WT Mäusen in der NTS keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der in die Niere infiltrierenden neutrophilen Granulozyten auf. Diese werden in der NTS anfangs von $\gamma\delta$ -T-Zellen rekrutiert und schädigen glomeruläre Zellen (115). Darauf folgend werden sie von TH17-Zellen rekrutiert, wodurch sie zu interstitieller Schädigung der Niere beitragen (117). In Zellen von IL-33 defizienten Mäusen, die gegen mBSA immunisiert wurden, zeigte sich verminderte IL-17 Produktion in den drainierenden Lymphknoten im Vergleich zu WT Mäusen (118). Die TH17-Zellen wurden nach Li et al. durch die Verabreichung eines Anti-IL-33 Antikörpers in einem SLE Modell vermindert (106). Vermutlich trägt also IL-33 zur Rekrutierung der TH17-Zellen bei. TH17-Zellen wiederum produzieren IL-17 und IL-22, welche zur Aktivierung epithelialer Zellen mit Barrierefunktionen beitragen (49). Diese Zellen produzieren unter anderem IL-33 (66). IL-33 fungiert als nukleäres Alarmin und wird auf schädigende Stimuli hin transloziert und sezerniert (67). Über ST2 kann es nachfolgend Immunzellen wie auch TH17-Zellen aktivieren (49). Die TH17-Zellen, die sich in einem SLE Modell durch das Blockieren von IL-33 vermindert zeigten, rekrutieren in der NTS neutrophile Granulozyten in das renale Interstitium (117). In St2^{-/-} Mäusen könnte also erwartet werden, dass die verhinderte IL-33/ST2 Signaltransduktion über eine Verminderung von TH17-Zellen zu verringerter renaler Infiltration durch neutrophile Granulozyten führen würde. Dies konnte in unseren Experimenten mit St2^{-/-} Mäusen nicht beobachtet werden. Die IL-33/ST2 Achse scheint daher in der NTS wenig Einfluss auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zu haben, jedoch ist nicht auszuschließen, dass ein indirekter Einfluss auf diese über TH17-Zellen bestehen könnte. Um dies zu überprüfen, sollte die ST2 Expression in der NTS auf TH17-

Zellen untersucht werden und weiters, ob die ST2 Defizienz in der NTS einen Einfluss auf die Funktion der TH17-Zellen hat.

Immunhistochemisch stellte sich die ST2 Defizienz als wenig einflussreich auf die Infiltration der Niere mit CD4+T- und auch CD8+T-Zellen dar. Zwischen den Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Zwischen den nephritischen WT und St2^{-/-} Mäusen zeigte sich außerdem kein signifikanter Unterschied im Anteil der CD8+T-Zellen sowie der CD4+T-Zellen an dem gesamten T-Zell Pool in Lymphknoten und Milz. Allerdings scheint ein Ausreißer für das Ergebnis der CD4+T-Zellen in der Milz verantwortlich, da sich in St2^{-/-} Mäusen weniger CD4+T-Zellen in der Milz zeigten, wenn dieser nicht berücksichtigt würde. In der NTS werden inflammatorische Reaktionen vorrangig durch CD4+T-Zellen vermittelt, unter anderem bedingen sie die Halbmondbildung (64). Sie rekrutieren nicht nur weitere Phagozyten wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen an den Entzündungsort, sondern verstärken überdies deren phagozytische Aktivität (115). Während in einem Cisplatin-Modell des akuten Nierenversagens die Verabreichung von IL-33 zu erhöhtem Kreatinin Spiegel sowie vermehrter Infiltration der Niere mit CD4+T-Zellen führte, verringerte die Gabe von sST2 die Infiltration von CD4+T-Zellen in renales Gewebe und verbesserte den renalen tubulären Schaden (109). Daher wurde hier der IL-33 vermittelten Schaden auf CD4+T-Zellen zurückgeführt (109). Die Verabreichung von sST2 verhindert ähnlich wie ST2 Defizienz die Signalübertragung zwischen IL-33 und ST2. Für die NTS konnte im Gegensatz zu dem beschriebenen Cisplatin-Modell des akuten Nierenversagens hier weder eine Verringerung der renalen Infiltration mit CD4+T-Zellen noch eine Verbesserung des renalen Schadens gezeigt werden. Jedoch wurde gezeigt, dass die Verabreichung von IL-33 den renalen Schaden in der NTS verstärkt (Artinger et. al., unpubliziert).

Eine Wiederholung des St2^{-/-} Experimentes mit größeren Gruppen erscheint sinnvoll, um den Einfluss der Ausreißer der CD4+T-Zellen in der Milz in nephritischen St2^{-/-} Mäusen zu reevaluieren. Der Trend zur verringerten Albuminurie in der NTS in St2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen und der fehlende Unterschied bezüglich der in die Niere infiltrierenden CD4+T-Zellen deutet trotz allen Mutmaßungen darauf hin, dass der von CD4+T-Zellen vermittelte renale Schaden in der NTS nicht vorrangig über IL-33/ST2 vermittelt wird.

Anzumerken ist jedenfalls, dass unsere Untersuchungen der Zellpopulationen in der Niere quantitativ und in den sekundär lymphatischen Organen als Prozentsätze angegeben wurden.

Diese Analyse schließt eine Änderung der zellulären Funktionen durch die ST2 Defizienz nicht aus und sollte gegebenenfalls in weiteren Experimenten untersucht werden.

Die Stärke der B-Zell Antwort wurde im St2^{-/-} Experiment durch die Messung der optischen Dichte von autologem Gesamt IgG quantifiziert. In nephritischen St2^{-/-} Mäusen zeigte sich in der NTS eine signifikant gesteigerte B-Zell Antwort (OD IgG) gegenüber nephritischen WT Mäusen (p=0,0011). In einem Modell der Autoimmunarthritis führte die intraartikuläre Gabe von mBSA in IL-33 defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen nach 8 Tagen zu einer signifikant gesteigerten B-Zell Antwort, quantifiziert über den anti-BSA IgG2A Serumspiegel (118). An den restlichen Messzeitpunkten fanden sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (118). Außerdem bewirkte die IL-33 Defizienz erhöhte antigenspezifische IFN- γ Produktion (118). Endogenes IL-33 beeinflusste demnach zumindest die Ausprägung der Polarität der adaptiven Immunreaktion (118). Konkordant zu den Ergebnissen in dem beschriebenen Modell der IL-33 Defizienz war die humorale Immunantwort ebenso in unserem Experiment zur NTS bei ST2 Defizienz intensiviert. In den Modellen zu Autoimmunarthritis zeigte sich insgesamt keine signifikante Veränderung des Krankheitsverlaufes in IL-33 defizienten Mäusen (118). In unserem Experiment zeigte sich trotz der gesteigerten humoralen Immunantwort, die zur Bildung der in der NTS pathogenen Immunkomplexe beiträgt, ein Trend zur verringerten Albuminurie. Zusammen mit Daten, die zeigten wie die NTS auch in Abwesenheit antikörperproduzierender B-Zellen das volle histologische Ausprägungsbild erreicht (116), deutet dies darauf hin, dass die humorale Antwort in der NTS eine untergeordnete Rolle in der Pathophysiologie spielt. Denkbar wäre jedoch eine geringgradige Verschlechterung des Verlaufes durch die humorale Antwort, sodass andere, potenziell protektive Effekte der ST2 Defizienz, möglicherweise dadurch maskiert werden könnten.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den St2^{-/-} Mäusen und den WT Mäusen hinsichtlich der iNKT-, iNKT1-, iNKT2- und iNKT17-Zellen. Der prozentuale Anteil der NK1.1 positiven Zellen an CD45⁺CD3⁻ Zellen, also der NK-Zellen, war in der Milz in der St2^{-/-} Gruppe im Vergleich zur WT Gruppe signifikant erhöht (p=0,0317). In den Expressionsstudien in der NTS zeigte sich ein Trend zur erhöhten Expression von ST2 auf den NK-Zellen. Ferhat et al. zeigten in IRI für IL-33 defiziente Mäuse die verminderte Infiltration in die Niere durch neutrophile Granulozyten, NK- und iNKT-Zellen (93). Sie fanden außerdem eine signifikant verminderte Expression von IFN- γ und IL-17A durch NK-

Zellen in IL-33 defizienten Mäusen im Vergleich zu NK-Zellen in WT Mäusen (93). Hier wäre es von Interesse, in der NTS zu untersuchen, ob NK-Zellen ST2 defizienter Mäuse ebenso vermindert IFN- γ und IL-17A exprimieren. Möglicherweise stellt dies einen Mechanismus dar, über den ST2 Defizienz in der NTS protektiv wirken könnte. Den NK-Zellen wird bisher eine untergeordnete Rolle in der NTS zugeschrieben (21,115). Rickassel et al. zeigten für konventionelle NK-Zellen und ILC1 in der murinen Niere in der NTS keine signifikante Veränderung des Phänotyps (119). Außerdem veränderte die spezifische genetische Deletion von konventionellen NK-Zellen den klinischen Verlauf der NTS nicht (119). Interessanterweise konnten wir in unseren Experimenten einen signifikant erhöhten Anteil von NK-Zellen in der Milz in ST2 defizienten Mäusen zeigen, welche gleichzeitig einen Trend zur verringerten Albuminurie aufwiesen. Außerdem zeigte sich ein Trend zur gesteigerten ST2 Expression auf NK-Zellen in nephritischen WT Mäusen im Vergleich zu gesunden Mäusen. Es ist demnach nicht gänzlich auszuschließen, dass die ST2+NK-Zellen in der NTS eine Rolle spielen.

Zur Gruppe der ILC werden neben den NK-Zellen auch die ILC2 gezählt (49). Cao et al. zeigten die Expansion von renalen ILC2 auf die Verabreichung von IL-33 hin, was zu reduzierter Mortalität bei IRI und zu vermehrter Expression von T_{reg} und M2-Makrophagen führte (105). Riedel et al. zeigten für IL-33 einen kurzzeitig mildernden Effekt über ST2+ILC2s, wofür eosinophile Granulozyten unbedingt notwendig waren (102). M2-Makrophagen zeigten sich vermehrt, während weniger neutrophile Granulozyten und Makrophagen in die Niere infiltrierten (102). T_{reg} waren nach Verabreichung von IL-33 vermehrt nachweisbar (102). Es wurden ILC-, T- und B-Zell defiziente Mäuse gegenüber T- und B-Zell defizienten Mäusen in dem beschriebenen Experiment untersucht (102). Bei Letzteren konnte zwar histologisch der glomeruläre Schaden gemildert werden, nicht jedoch der renale Funktionsverlust (102).

Laut Gatti et al. ermöglicht die ST2 Defizienz in Mäusen weiterhin die uneingeschränkte intranukleäre Wirkung von IL-33, die als antifibrotisch beschrieben wurde (69). Sie zeigten die Funktion von nukleärem IL-33, Fibrosierung entgegenzusteuern, indem es die Deposition von extrazellulärer Matrix unterdrückte (69). Durch ST2 Defizienz war dies nicht reproduzierbar, daher schrieben sie die Wirkung intranukleärem IL-33 zu (69). Außerdem wiesen sie nach, wie anhaltender zellulärer Stress bei UUU die Sezernierung von IL-33 in den EZR förderte, wodurch nukleäres IL-33 nichtmehr ausreichend antifibrotisch wirken

konnte, sondern extrazellulär über ST2 profibrotisch und proinflammatorisch wirkte (69). Wie unsere Daten gezeigt haben, bewirkte die ST2 Defizienz auch in der NTS keine objektivierbare Verbesserung der Glomerulosklerose. Hypothetisch sollte IL-33 in den St2^{-/-} Mäusen weder pathogene noch regulatorische Wirkungen über ST2 entfalten können, jedoch intranukleär genregulatorische antifibrotische bewirken. Möglicherweise kommt es, wie auch Gatti et al. in UUO beobachteten (69), durch den starken zellulären Stress in unserem Modell zu vermehrter Sezernierung von IL-33 nach extrazellulär. Dort muss in St2^{-/-} Mäusen die profibrotische Wirkung, die IL-33 über ST2 vermittelt, aufgrund der ST2 Defizienz ausbleiben. Denkbar wäre, dass das nunmehr vermindert intranukleär vorhandene IL-33 seine dortigen antifibrotischen Effekte nur in geringerem Maße bewirken kann.

Limitationen dieser Studie ergeben sich aus der fehlenden Analyse von Makrophagen in der FACS-Analyse, da ST2+Makrophagen als alternativ aktivierte Makrophagen antiinflammatorische Reaktionen vermitteln (75). Makrophagen wird generell in der NTS eine pathogene Rolle zugesprochen (21). Weiters limitiert die fehlende Analyse von T_{reg}, ILC2, Monozyten und neutrophilen Granulozyten in den St2^{-/-} und WT Mäusen sowie die fehlende durchflusszytometrische Untersuchung aller beteiligter Zellpopulationen direkt in der Niere die Ergebnisse. Im Rahmen dieser Studie wurde außerdem auf eine gesonderte Analyse der Tubuluszellen, wo vermutlich ST2 exprimiert wird, verzichtet. Der Aufbau dieses Experimentes ermöglichte auch nicht, zwischen der Funktion von ST2 auf Immunzellen und der Funktion von ST2 auf gewebständigen Zellen zu differenzieren. Hierzu wären weitere Experimente mit zum Beispiel knochenmarkschimären Mäusen notwendig. Weiters wurden die Blut-Harnstoff-Stickstoffkonzentrationen und das Neutrophilen-Gelatinase-assoziierte Lipocalin, beides Parameter für akute Nierenschädigung, im Rahmen dieser Studie nicht analysiert. Limitationen der Methode ACR ergeben sich zum einen aus fehlenden Urinproben, denn an d7 fehlten zwei Urinproben aus der St2^{-/-} Gruppe und an d14 fehlten eine Probe aus der WT Gruppe und zwei Proben aus der St2^{-/-} Gruppe. Zum anderen ist die Methode zur Bestimmung der Kreatinin Konzentration eingeschränkt verwendbar in Urinproben von NTS Mäusen, da sie individuell unterschiedlich ausgeprägt sein kann und der Harn sehr konzentriert ist, was eine sehr hohe Verdünnung erforderlich macht. Dennoch stellt sie eine relativ zuverlässige Methode dar, um in Mäusen, die idealerweise Wurfgeschwister in nahezu identen Lebensbedingungen sind, den Grad an Proteinurie zu normalisieren (112). Die mikroskopische Auswertung der

immunhistochemischen Färbungen unterliegt trotz Verblindung und bestmöglicher Standardisierung interpersoneller Variabilität.

Während sich die Expression von ST2 auf Immunzellen in der NTS durchwegs unverändert oder vermindert zeigte, fanden wir einzig auf NK-Zellen eine gesteigerte ST2 Expression. Interessanterweise zeigte sich durch die ST2 Defizienz in der NTS der Anteil der NK-Zellen in der Milz erhöht und die humorale Immunantwort intensiviert, jedoch waren pathogene Zellen wie in die Niere infiltrierende CD4⁺T-Zellen und neutrophile Granulozyten durch die ST2 Defizienz nicht signifikant verändert. Ebenso zeigte sich der Zielparameter Glomerulosklerose unverändert zwischen den beiden Gruppen. Es zeigte sich ein Trend zu verringerter Albuminurie und ein Trend zu einem verringerten Anteil CD4⁺T-Zellen in der Milz in St2^{-/-} Mäusen. Möglicherweise führt eine globale ST2 Defizienz aufgrund der komplexen, zum Teil regulatorischen und zum Teil pathogenen, Wirkungen in der NTS weder zu einer signifikanten Verbesserung noch einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufes. So sollte IL-33 hypothetisch in den St2^{-/-} Mäusen weder pathogene noch regulatorische Wirkungen über ST2 entfalten können, wobei die intranukleäre genregulatorische antifibrotische Wirkung von IL-33 weiterhin erhalten bliebe.

Um gezielt den Verlauf der NTS mittels der IL-33/ST2 Achse beeinflussen zu können, ist es unabdingbar, deren Rolle noch genauer auf den betroffenen Zellen zu studieren. Um also die IL-33/ST2 Achse als therapeutisches Ziel in der Behandlung der RPGN zu evaluieren, bedarf es weiterer Forschung.

5 Literaturverzeichnis

1. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, u. a. Physiologie. 3., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017. 831 S. (Duale Reihe).
2. Field MJ, Pollock CA, Harris DC. Niere: integrative Grundlagen und Fälle. 1. deutsche Auflage. München: Elsevier; 2017. 161 S. (Organsysteme verstehen).
3. AMBOSS GmbH [Internet]. Niere. [zitiert 24. Juli 2022]. Verfügbar unter: https://next.amboss.com/de/article/jo0_bS?q=niere#Zec9db35c8000414a143d6d13865e492f
4. Brenner B, Burckhardt G, Draguhn A, Ehmke H, Eysel U, Mairbäurl H, u. a. Physiologie. 8., unveränderte Auflage. Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S, Klinker R, Gay R, Rothenburger A, Herausgeber. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2018. 1024 S.
5. Hashmi MS, Pandey J. Nephritic Syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [zitiert 10. November 2021]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562240/>
6. Herold G. Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung: 2020: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold; 2020. 1002 S.
7. Khanna R. Clinical presentation & management of glomerular diseases: hematuria, nephritic & nephrotic syndrome. *Mo Med*. Februar 2011;108(1):33–6.
8. Sethi S, Haas M, Markowitz GS, D'Agati VD, Rennke HG, Jennette JC, u. a. Mayo Clinic/Renal Pathology Society Consensus Report on Pathologic Classification, Diagnosis, and Reporting of GN. *J Am Soc Nephrol JASN*. Mai 2016;27(5):1278–87.
9. Tinawi M. Update on the etiology, classification, and management of glomerular diseases. *Avicenna J Med*. Juni 2020;10(2):61–7.
10. Couser WG. Pathogenesis and treatment of glomerulonephritis-an update. *J Bras Nefrol* [Internet]. 2016 [zitiert 12. November 2021];38(1). Verfügbar unter: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-28002016000100107
11. Ross JH. Renal biopsy and glomerulonephritis. *Postgrad Med J*. November 1959;35:604–10.
12. Johnson RJ, Shankland SJ, Lucia MS. A Systematic Method for Categorizing GN. *J Am Soc Nephrol JASN*. Mai 2016;27(5):1265–6.
13. Sethi S, Fervenza FC. Standardized classification and reporting of glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1. Februar 2019;34(2):193–9.
14. Wolf D, Hohegger K, Wolf AM, Rumpold HF, Gastl G, Tilg H, u. a. CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Inhibit Experimental Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis in Mice. *J Am Soc Nephrol*. Mai 2005;16(5):1360–70.
15. Charles Jennette J. Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*. März 2003;63(3):1164–77.
16. Naik RH, Shawar SH. Rapidly Progressive Glomerulonephritis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [zitiert 14. November 2021]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557430/>
17. Bonsib SM. Glomerular basement membrane necrosis and crescent organization. *Kidney Int*. Mai 1988;33(5):966–74.
18. Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol*. Februar 1999;65(2):137–50.

19. Yang JJ, Kettritz R, Falk RJ, Jennette JC, Gaido ML. Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase. *Am J Pathol*. November 1996;149(5):1617–26.
20. Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Schena FP. Tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin receptor expression in human crescentic glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. April 2000;35(4):726–38.
21. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol*. Oktober 2013;13(10):738–53.
22. Rodrigues JC, Haas M, Reich HN. IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 3. April 2017;12(4):677–86.
23. Magistroni R, D’Agati VD, Appel GB, Kiryluk K. New developments in the genetics, pathogenesis, and therapy of IgA nephropathy. *Kidney Int*. November 2015;88(5):974–89.
24. McGrogan A, Franssen CFM, de Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrol Dial Transplant*. 1. Februar 2011;26(2):414–30.
25. Coppo R, Troyanov S, Bellur S, Cattran D, Cook HT, Feehally J, u. a. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy in cohorts with different presentations and treatments. *Kidney Int*. Oktober 2014;86(4):828–36.
26. Lv J, Yang Y, Zhang H, Chen W, Pan X, Guo Z, u. a. Prediction of outcomes in crescentic IgA nephropathy in a multicenter cohort study. *J Am Soc Nephrol JASN*. Dezember 2013;24(12):2118–25.
27. Ibels LS, Györy AZ. IgA nephropathy: analysis of the natural history, important factors in the progression of renal disease, and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. März 1994;73(2):79–102.
28. Couser WG, Johnson RJ. The etiology of glomerulonephritis: roles of infection and autoimmunity. *Kidney Int*. November 2014;86(5):905–14.
29. Suzuki H, Fan R, Zhang Z, Brown R, Hall S, Julian BA, u. a. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J Clin Invest*. Juni 2009;119(6):1668–77.
30. Berthelot L, Papista C, Maciel TT, Biarnes-Pelicot M, Tissandie E, Wang PHM, u. a. Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J Exp Med*. 9. April 2012;209(4):793–806.
31. Nasr SH, D’Agati VD. IgA-dominant postinfectious glomerulonephritis: a new twist on an old disease. *Nephron Clin Pract*. 2011;119(1):c18-25; discussion c26.
32. Khalighi MA, Wang S, Henriksen KJ, Bock M, Keswani M, Meehan SM, u. a. Revisiting post-infectious glomerulonephritis in the emerging era of C3 glomerulopathy. *Clin Kidney J*. Juni 2016;9(3):397–402.
33. Rodriguez-Iturbe B, Musser JM. The Current State of Poststreptococcal Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. Oktober 2008;19(10):1855–64.
34. Kanjanabuch T, Kittikowit W, Eiam-Ong S. An update on acute postinfectious glomerulonephritis worldwide. *Nat Rev Nephrol*. Mai 2009;5(5):259–69.
35. Baikunje S, Vankalakunti M, Nikith A, Srivatsa A, Alva S, Kamath J. Post-infectious glomerulonephritis with crescents in adults: a retrospective study. *Clin Kidney J*. April 2016;9(2):222–6.
36. Almaani S, Meara A, Rovin BH. Update on Lupus Nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 8. Mai 2017;12(5):825–35.

37. Gasparotto M, Gatto M, Binda V, Doria A, Moroni G. Lupus nephritis: clinical presentations and outcomes in the 21st century. *Rheumatol Oxf Engl*. 5. Dezember 2020;59(Suppl5):v39–51.
38. Weening JJ, D'agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, u. a. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int*. Februar 2004;65(2):521–30.
39. Liu Y, Anders HJ. Lupus nephritis: from pathogenesis to targets for biologic treatment. *Nephron Clin Pract*. 2014;128(3–4):224–31.
40. Munroe ME, James JA. Genetics of Lupus Nephritis: Clinical Implications. *Semin Nephrol*. September 2015;35(5):396–409.
41. Yatim KM, Lakkis FG. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 7. Juli 2015;10(7):1274–81.
42. Pedchenko V, Bondar O, Fogo AB, Vanacore R, Voziyan P, Kitching AR, u. a. Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis. *N Engl J Med*. 22. Juli 2010;363(4):343–54.
43. McAdoo SP, Pusey CD. Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 7. Juli 2017;12(7):1162–72.
44. Canney M, O'Hara PV, McEvoy CM, Medani S, Connaughton DM, Abdalla AA, u. a. Spatial and Temporal Clustering of Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 8. August 2016;11(8):1392–9.
45. Arends J, Wu J, Borillo J, Troung L, Zhou C, Vigneswaran N, u. a. T Cell Epitope Mimicry in Antiglomerular Basement Membrane Disease. *J Immunol*. 15. Januar 2006;176(2):1252–8.
46. Lionaki S, Boletis JN. The Prevalence and Management of Pauci-Immune Glomerulonephritis and Vasculitis in Western Countries. *Kidney Dis Basel Switz*. März 2016;1(4):224–34.
47. Salmela A, Törnroth T, Poussa T, Ekstrand A. Prognostic Factors for Survival and Relapse in ANCA-Associated Vasculitis with Renal Involvement: A Clinical Long-Term Follow-Up Study. *Int J Nephrol*. 2018;2018:6369814.
48. Hilhorst M, Wilde B, van Breda Vriesman P, van Paassen P, Cohen Tervaert JW, Limburg Renal Registry. Estimating renal survival using the ANCA-associated GN classification. *J Am Soc Nephrol JASN*. September 2013;24(9):1371–5.
49. Murphy KM, Weaver C. *Janeway's immunobiology*. 9th edition. New York London: GS, Garland Science, Taylor & Francis Group; 2017. 904 S.
50. Ooi JD, Jiang JH, Eggenhuizen PJ, Chua LL, van Timmeren M, Loh KL, u. a. A plasmid-encoded peptide from *Staphylococcus aureus* induces anti-myeloperoxidase nephritogenic autoimmunity. *Nat Commun*. 29. Juli 2019;10(1):3392.
51. Almaani S, Fussner LA, Brodsky S, Meara AS, Jayne D. ANCA-Associated Vasculitis: An Update. *J Clin Med*. 1. April 2021;10(7):1446.
52. AMBOSS GmbH [Internet]. Spezifisches Immunsystem. [zitiert 25. Juli 2022]. Verfügbar unter:
<https://next.amboss.com/de/article/p60LNS?q=tcr#Z0c3980b7aff292f72da0f58297117fac>
53. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, u. a. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. März 2000;52(1):145–76.
54. Volkman BF, Liu TY, Peterson FC. Chapter 3. Lymphotactin structural dynamics. *Methods Enzymol*. 2009;461:51–70.

55. Assmann KJM, Tangelder MM, Lange WPJ, Schrijver G, Koene RA. Anti-GBM nephritis in the mouse: severe proteinuria in the heterologous phase. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1985;406(3):285–99.
56. Odobasic D, Ghali JR, O'Sullivan KM, Holdsworth SR, Kitching AR. Glomerulonephritis Induced by Heterologous Anti-GBM Globulin as a Planted Foreign Antigen. *Curr Protoc Immunol.* 1. August 2014;106:15.26.1-15.26.20.
57. Timoshanko JR, Kitching R, Semple TJ, Tipping PG, Holdsworth SR. A Pathogenetic Role for Mast Cells in Experimental Crescentic Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* Januar 2006;17(1):150–9.
58. Turner JE, Krebs C, Tittel AP, Paust HJ, Meyer-Schwesinger C, Bennstein SB, u. a. IL-17A production by renal $\gamma\delta$ T cells promotes kidney injury in crescentic GN. *J Am Soc Nephrol JASN.* September 2012;23(9):1486–95.
59. Menke J, Zeller GC, Kikawada E, Means TK, Huang XR, Lan HY, u. a. CXCL9, but not CXCL10, Promotes CXCR3-Dependent Immune-Mediated Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* Juni 2008;19(6):1177–89.
60. Heymann F, Meyer-Schwesinger C, Hamilton-Williams EE, Hammerich L, Panzer U, Kaden S, u. a. Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *J Clin Invest.* Mai 2009;119(5):1286–97.
61. Riedel JH, Paust HJ, Turner JE, Tittel AP, Krebs C, Disteldorf E, u. a. Immature Renal Dendritic Cells Recruit Regulatory CXCR6⁺ Invariant Natural Killer T Cells to Attenuate Crescentic GN. *J Am Soc Nephrol.* Dezember 2012;23(12):1987–2000.
62. Steinmetz OM, Summers SA, Gan PY, Semple T, Holdsworth SR, Kitching AR. The Th17-defining transcription factor ROR γ t promotes glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol JASN.* März 2011;22(3):472–83.
63. Paust HJ, Turner JE, Steinmetz OM, Peters A, Heymann F, Hölscher C, u. a. The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol JASN.* Mai 2009;20(5):969–79.
64. Tipping PG, Holdsworth SR. T cells in crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol JASN.* Mai 2006;17(5):1253–63.
65. Paust HJ, Ostmann A, Erhardt A, Turner JE, Velden J, Mittrücker HW, u. a. Regulatory T cells control the Th1 immune response in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* Juli 2011;80(2):154–64.
66. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, u. a. IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. *Immunity.* November 2005;23(5):479–90.
67. Chen WY, Li LC, Yang JL. Emerging Roles of IL-33/ST2 Axis in Renal Diseases. *Int J Mol Sci.* 7. April 2017;18(4):E783.
68. Kotsiou OS, Gourgoulis KI, Zarogiannis SG. IL-33/ST2 Axis in Organ Fibrosis. *Front Immunol.* 2018;9:2432.
69. Gatti F, Mia S, Hammarström C, Freker N, Fosby B, Wang J, u. a. Nuclear IL-33 restrains the early conversion of fibroblasts to an extracellular matrix-secreting phenotype. *Sci Rep.* 8. Januar 2021;11(1):108.
70. Bessa J, Meyer CA, de Vera Mudry MC, Schlicht S, Smith SH, Iglesias A, u. a. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun.* Dezember 2014;55:33–41.
71. Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, u. a. The Dual Function Cytokine IL-33 Interacts with the Transcription Factor NF- κ B To Dampen NF- κ B-Stimulated Gene Transcription. *J Immunol.* 15. August 2011;187(4):1609–16.

72. Pinto SM, Subbannayya Y, Rex D a. B, Raju R, Chatterjee O, Advani J, u. a. A network map of IL-33 signaling pathway. *J Cell Commun Signal*. September 2018;12(3):615–24.
73. Akimoto M, Takenaga K. Role of the IL-33/ST2L axis in colorectal cancer progression. *Cell Immunol*. September 2019;343:103740.
74. Drake LY, Kita H. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease. *Immunol Rev*. Juli 2017;278(1):173–84.
75. Yang F, Zhu P, Duan L, Yang L, Wang J. IL-33 and kidney disease (Review). *Mol Med Rep*. Januar 2016;13(1):3–8.
76. Liu X, Xiao Y, Pan Y, Li H, Zheng SG, Su W. The role of the IL-33/ST2 axis in autoimmune disorders: Friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev*. Dezember 2019;50:60–74.
77. Bartemes KR, Iijima K, Kobayashi T, Kephart GM, McKenzie AN, Kita H. IL-33-responsive lineage- CD25+ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. Februar 2012;188(3):1503–13.
78. Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, u. a. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. Oktober 2008;181(7):4780–90.
79. Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol*. Mai 2009;123(5):1047–54.
80. Chen CC, Kobayashi T, Iijima K, Hsu FC, Kita H. IL-33 dysregulates regulatory T cells and impairs established immunologic tolerance in the lungs. *J Allergy Clin Immunol*. November 2017;140(5):1351-1363.e7.
81. Matta BM, Lott JM, Mathews LR, Liu Q, Rosborough BR, Blazar BR, u. a. IL-33 is an unconventional Alarmin that stimulates IL-2 secretion by dendritic cells to selectively expand IL-33R/ST2+ regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Oktober 2014;193(8):4010–20.
82. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie ANJ, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest*. 1. Juni 2007;117(6):1538–49.
83. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhäuser ML, Handa V, Gannon; J, u. a. Interleukin-33 Prevents Apoptosis and Improves Survival After Experimental Myocardial Infarction Through ST2 Signaling. *Circ Heart Fail*. November 2009;2(6):684–91.
84. Sun Y, Pavey H, Wilkinson I, Fisk M. Role of the IL-33/ST2 axis in cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2021;16(11):e0259026.
85. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, u. a. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med*. 18. Februar 2008;205(2):339–46.
86. McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, u. a. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*. 22. August 2013;39(2):357–71.
87. Marvie P, Lisbonne M, L'helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, u. a. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med*. Juni 2010;14(6B):1726–39.
88. Gao Y, Liu Y, Yang M, Guo X, Zhang M, Li H, u. a. IL-33 treatment attenuated diet-induced hepatic steatosis but aggravated hepatic fibrosis. *Oncotarget*. 7. Juni 2016;7(23):33649–61.

89. Tan Z, Liu Q, Jiang R, Lv L, Shoto SS, Maillet I, u. a. Interleukin-33 drives hepatic fibrosis through activation of hepatic stellate cells. *Cell Mol Immunol*. April 2018;15(4):388–98.
90. Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, u. a. Endogenous IL-33 Is Highly Expressed in Mouse Epithelial Barrier Tissues, Lymphoid Organs, Brain, Embryos, and Inflamed Tissues: In Situ Analysis Using a Novel *Il-33-LacZ* Gene Trap Reporter Strain. *J Immunol*. 1. April 2012;188(7):3488–95.
91. Chen WY, Chang YJ, Su CH, Tsai TH, Chen SD, Hsing CH, u. a. Upregulation of Interleukin-33 in obstructive renal injury. *Biochem Biophys Res Commun*. Mai 2016;473(4):1026–32.
92. Li Y, Liu J, Yu T, Yan B, Li H. Interleukin-33 promotes obstructive renal injury via macrophages. *Mol Med Rep [Internet]*. 3. Juni 2019 [zitiert 26. April 2022]; Verfügbar unter: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2019.10324>
93. Ferhat M, Robin A, Giraud S, Sena S, Goujon JM, Touchard G, u. a. Endogenous IL-33 Contributes to Kidney Ischemia-Reperfusion Injury as an Alarmin. *J Am Soc Nephrol JASN*. April 2018;29(4):1272–88.
94. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel „alarmin“? *PLoS One*. 6. Oktober 2008;3(10):e3331.
95. Manetti M, Ibba-Manneschi L, Liakouli V, Guiducci S, Milia AF, Benelli G, u. a. The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. März 2010;69(3):598–605.
96. Yu MY, Kwon S, Moon JJ, Kim YC, Song EY, Lee H, u. a. Role of the IL-33/ST2 pathway in renal allograft rejection. *Exp Cell Res*. August 2021;405(2):112705.
97. Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, u. a. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9. Juni 1998;95(12):6930–5.
98. Stremaska ME, Jose S, Sabapathy V, Huang L, Bajwa A, Kinsey GR, u. a. IL233, A Novel IL-2 and IL-33 Hybrid Cytokine, Ameliorates Renal Injury. *J Am Soc Nephrol JASN*. September 2017;28(9):2681–93.
99. Chen WY, Yang JL, Wu YH, Li LC, Li RF, Chang YT, u. a. IL-33/ST2 axis mediates hyperplasia of intrarenal urothelium in obstructive renal injury. *Exp Mol Med*. April 2018;50(4):1–11.
100. Tan XY, Jing HY, Ma YR. Interleukin-33/ Suppression of Tumorigenicity 2 in Renal Fibrosis: Emerging Roles in Prognosis and Treatment. *Front Physiol*. 3. Januar 2022;12:792897.
101. Zhang J, Ramadan AM, Griesenauer B, Li W, Turner MJ, Liu C, u. a. ST2 blockade reduces sST2-producing T cells while maintaining protective mST2-expressing T cells during graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 7. Oktober 2015;7(308):308ra160.
102. Riedel JH, Becker M, Kopp K, Düster M, Brix SR, Meyer-Schwesinger C, u. a. IL-33-Mediated Expansion of Type 2 Innate Lymphoid Cells Protects from Progressive Glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol JASN*. Juli 2017;28(7):2068–80.
103. Cameron GJM, Jiang SH, Loering S, Deshpande AV, Hansbro PM, Starkey MR. Emerging therapeutic potential of group 2 innate lymphoid cells in acute kidney injury. *J Pathol*. Mai 2019;248(1):9–15.
104. Huang Q, Niu Z, Tan J, Yang J, Liu Y, Ma H, u. a. IL-25 Elicits Innate Lymphoid Cells and Multipotent Progenitor Type 2 Cells That Reduce Renal

- Ischemic/Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol JASN*. September 2015;26(9):2199–211.
105. Cao Q, Wang Y, Niu Z, Wang C, Wang R, Zhang Z, u. a. Potentiating Tissue-Resident Type 2 Innate Lymphoid Cells by IL-33 to Prevent Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol*. März 2018;29(3):961–76.
 106. Li P, Lin W, Zheng X. IL-33 neutralization suppresses lupus disease in lupus-prone mice. *Inflammation*. Juni 2014;37(3):824–32.
 107. Zhu F, Bai X, Hong Q, Cui S, Wang X, Xiao F, u. a. STAT3 Inhibition Partly Abolishes IL-33–Induced Bone Marrow–Derived Monocyte Phenotypic Transition into Fibroblast Precursor and Alleviates Experimental Renal Interstitial Fibrosis. *J Immunol*. 15. November 2019;203(10):2644–54.
 108. Liang H, Xu F, Wen XJ, Liu HZ, Wang HB, Zhong JY, u. a. Interleukin-33 signaling contributes to renal fibrosis following ischemia reperfusion. *Eur J Pharmacol*. Oktober 2017;812:18–27.
 109. Akcay A, Nguyen Q, He Z, Turkmen K, Won Lee D, Hernando AA, u. a. IL-33 exacerbates acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol JASN*. November 2011;22(11):2057–67.
 110. Park GH, Shinn HK, Kang JH, Na WJ, Kim YH, Park CS. Anti-interleukin-33 Reduces Ovalbumin-Induced Nephrotoxicity and Expression of Kidney Injury Molecule-1. *Int Neurourol J*. Juni 2016;20(2):114–21.
 111. Oswald E. *Material Transfer Agreement*. 2016.
 112. Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad.-Verlag; 2009. 316 S. (Der Experimentator).
 113. Vector Laboratories. Avidin/Biotin Blocking Kit – SP-2001 [Internet]. 2022. Verfügbar unter: <https://vectorlabs.com/avidin-biotin-blocking-kit.html>
 114. Corbett AJ, Eckle SBG, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, u. a. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature*. 15. Mai 2014;509(7500):361–5.
 115. Artinger K, Kirsch AH, Aringer I, Moschovaki-Filippidou F, Eller P, Rosenkranz AR, u. a. Innate and adaptive immunity in experimental glomerulonephritis: a pathfinder tale. *Pediatr Nephrol*. Juni 2017;32(6):943–7.
 116. Li S, Holdsworth SR, Tipping PG. Antibody independent crescentic glomerulonephritis in μ chain deficient mice. *Kidney Int*. März 1997;51(3):672–8.
 117. Disteldorf EM, Krebs CF, Paust HJ, Turner JE, Nouailles G, Tittel A, u. a. CXCL5 drives neutrophil recruitment in TH17-mediated GN. *J Am Soc Nephrol JASN*. Januar 2015;26(1):55–66.
 118. Talabot-Ayer D, Martin P, Seemayer CA, Vigne S, Lamacchia C, Finckh A, u. a. Immune-mediated experimental arthritis in IL-33 deficient mice. *Cytokine*. September 2014;69(1):68–74.
 119. Rickassel C, Gnirck AC, Shaikh N, Adamiak V, Waterhölter A, Tanriver Y, u. a. Conventional NK Cells and Type 1 Innate Lymphoid Cells Do Not Influence Pathogenesis of Experimental Glomerulonephritis. *J Immunol*. 1. April 2022;208(7):1585–94.