

**Die Rolle von Dendritischen Zellen und der von ihnen exprimierten  
Chemokinrezeptoren in Homöostase und Nephritis**

**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)**

**der**

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der**

**Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

**vorgelegt von**

**Katharina Hochheiser**

**aus**

**Wilhelmshaven**

**Bonn, Juli 2013**

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Christian Kurts
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Irmgard Förster

Tag der Promotion: 29.11.2013

Erscheinungsjahr: 2013

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
2.1	INNATES UND ADAPTIVES IMMUNSYSTEM	6
2.2	ZYTOKINE	7
2.3	ANTIGEN-PRÄSENTATION	8
2.4	MHC-II-BELADUNG	8
2.5	DENDRITISCHE ZELLEN	9
2.6	MAKROPHAGEN	10
2.7	T-ZELLEN	11
2.8	T-ZELL-AKTIVIERUNG	12
2.9	HYPERSENSITIVÄTS-REAKTIONEN	13
2.10	ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DER NIERE	14
2.11	ENTZÜNDLICHE NIERENERKRANKUNGEN	16
2.12	DCs IN DER NIERE	19
2.13	CHEMOKINE	20
2.14	CX <sub>3</sub> CR1 UND CX <sub>3</sub> CL1	21
2.15	CX <sub>3</sub> CR1 UND CX <sub>3</sub> CL1 IN DER NIERE	22
2.16	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>23</b>
3.1	GERÄTE	23
3.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	24
3.3	REAGENZIEN	24
3.4	ANTIKÖRPER	26
3.5	KITS	27
3.6	PRIMER SEQUENZEN	27
3.7	SOFTWARE	28
3.8	PUFFER UND LÖSUNGEN	28
3.9	MÄUSE	29
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>30</b>
4.1	ISOLATION PRIMÄRER ZELLEN	30
4.1.1	SEPARATION VON NIERENRINDE UND NIERENMARK	30
4.1.2	HERSTELLUNG VON EINZELZELLSUSPENSIONEN AUS VERSCHIEDENEN GEWEBEN	30
4.1.3	ERYTHROZYTEN-LYSE	31

4.1.4	ANREICHERUNG VON ZELLEN MITTELS MAGNETISCHER ZELLSORTIERUNG (MACS) .....	31
<b>4.2</b>	<b>DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....</b>	<b>32</b>
4.2.1	OBERFLÄCHENFÄRBUNG .....	32
4.2.2	INTRAZELLULÄRFÄRBUNG .....	32
4.2.3	LEBEND-TOT-FÄRBUNG DURCH ANNEXIN UND HOECHST .....	33
4.2.4	ISOLIERUNG VON DCs MITTELS FLUORESZENS-AKTIVIERTER ZELLSORTIERUNG .....	33
<b>4.3</b>	<b>FUNKTIONELLE UND TRANSKRIPTIONELLE UNTERSUCHUNGEN VON DCs .....</b>	<b>34</b>
4.3.1	<i>IN VITRO</i> ENDOZYTÖSE-EXPERIMENTE .....	34
4.3.2	ANTIGEN-PROZESSIERUNGS-EXPERIMENTE .....	34
4.3.3	<i>IN VIVO</i> ENDOZYTÖSE-EXPERIMENTE .....	34
4.3.4	<i>IN VITRO</i> T-ZELL-AKTIVIERUNGS-EXPERIMENTE .....	35
<b>4.4</b>	<b>RNA- UND PROTEIN-EXPRESSIONS-ANALYSEMETHODEN .....</b>	<b>36</b>
4.4.1	TRANSKRIPTIONSANALYSE .....	36
4.4.2	ZYTOKINMESSUNGEN MIT DEM FLOWCYTOMIX KIT .....	37
<b>4.5</b>	<b>TIEREXPERIMENTELLE TECHNIKEN UND KRANKHEITSMODELLE .....</b>	<b>38</b>
4.5.1	INTRAPERITONEALE INJEKTION DES NEPHROTOXISCHEN SERUMS .....	38
4.5.2	GEWINNUNG VON SAMMELURIN .....	38
4.5.3	GEWINNUNG VON SERUM .....	38
4.5.4	BESTIMMUNG DER KREATININCLEARANCE .....	38
4.5.5	BESTIMMUNG DER ALBUMINKONZENTRATION DES URINS MITTELS SANDWICH-ELISA .....	39
4.5.6	DC-DEPLETION .....	39
4.5.7	KNOCHENMARK-PRÄPARATION UND ADOPTIVER TRANSFER .....	40
4.5.8	MESSUNG DER FUßSOHLENSCHWELLUNG .....	40
4.5.9	MILZZELLKULTUR .....	40
4.5.10	PYELONEPHRITIS-INDUKTION .....	40
4.5.11	BESTIMMUNG DER BAKTERIENLAST .....	41
<b>4.6</b>	<b>HISTOLOGIE .....</b>	<b>41</b>
4.6.1	FIXIERUNG UND EINBETTUNG DES GEWEBES IN PARAFFIN .....	41
4.6.2	PERIODSÄURE-SCHIFFS-REAGENZ-FÄRBUNG .....	41
4.6.3	MASSON-TRICHROM-FÄRBUNG .....	42
4.6.4	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN .....	42
<b>4.7</b>	<b>STATISTISCHE ANALYSE .....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>RENALE DCs REIFEN IM VERLAUF DER GLOMERULONEPHRITIS .....</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>RENALE DCs NEHMEN IN GLOMERULONEPHRITIS MEHR UND ANDERES ANTIGEN AUF .....</b>	<b>46</b>
<b>5.3</b>	<b>AN TAG 10 NACH IMMUNISIERUNG STIMULIEREN RENAL DCs CD4<sup>+</sup> T-ZELLE <i>EX VIVO</i> .....</b>	<b>47</b>
<b>5.4</b>	<b>DIE DEPLETION VON DCs AN TAG 7 NACH NTN-INDUKTION FÜHRT ZU EINER VERBESSERUNG DES KRANKHEITSBILDES .....</b>	<b>49</b>
<b>5.5</b>	<b>CORTIKALE, ABER NICHT MEDULLÄRE DCs AUS NEPHRITISCHEN MÄUSEN STIMULIEREN CD4<sup>+</sup> T-ZELLEN <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>51</b>

<b>5.6</b>	<b>MEDULLÄRE DCs PROZESSIEREN ANTIGEN WENIGER EFFIZIENT.....</b>	<b>53</b>
<b>5.7</b>	<b>MEDULLÄRE DCs REGULIEREN INNATE IMMUNITÄT IN DER NIERE .....</b>	<b>55</b>
<b>5.8</b>	<b>CX<sub>3</sub>CR1 IST ESSENTIELL FÜR DIE HOMÖOSTATISCHE DC-KOLONISATION DER NIERE.....</b>	<b>56</b>
<b>5.9</b>	<b>CX<sub>3</sub>CR1 BEEINFLUSST DIE INFILTRATION VON DCs UND MPs IN DER NTN .....</b>	<b>58</b>
<b>5.10</b>	<b>DAS KRANKHEITSBILD DER GLOMERULONEPHRITIS IST MILDER IN CX<sub>3</sub>CR1-DEFIZIENTEN MÄUSEN .....</b>	<b>60</b>
<b>5.11</b>	<b>ZELL-INTRINSISCHE DC-FUNKTIONEN SIND NICHT ABHÄNGIG VON CX<sub>3</sub>CR1 .....</b>	<b>63</b>
<b>5.12</b>	<b>DIE PYELONEPHRITIS IST IN CX<sub>3</sub>CR1-DEFIZIENTEN MÄUSEN NICHT SIGNIFIKANT VERSCHLIMMERT .....</b>	<b>65</b>
<b>5.13</b>	<b>DIE ABHÄNGIGKEIT DER DC-BESIEDLUNG VON CX<sub>3</sub>CR1 IST SPEZIFISCH FÜR DIE NIERE .....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b><u>DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>68</u></b>
<b>6.1</b>	<b>DC-REIFUNG IN NTN .....</b>	<b>68</b>
<b>6.2</b>	<b>PROTEINURIE UND NEPHRITIS-PROGRESSION.....</b>	<b>70</b>
<b>6.3</b>	<b>CORTIKALE DCs FÖRDERN DIE NTN-PROGRESSION .....</b>	<b>71</b>
<b>6.4</b>	<b>INNATE UND ADAPTIVE FUNKTIONEN MEDULLÄRER UND CORTIKALER DCs .....</b>	<b>72</b>
<b>6.5</b>	<b>CX<sub>3</sub>CR1-DEFIZIENZ REDUZIERT DIE HOMÖOSTATISCHE DC-KOLONISIERUNG DER NIEREN .....</b>	<b>74</b>
<b>6.6</b>	<b>CX<sub>3</sub>CR1 REKRUTIERT DC-VORLÄUFER IN DER NTN.....</b>	<b>75</b>
<b>6.7</b>	<b>DIE NTN IST IN CX<sub>3</sub>CR1-DEFIZIENTEN MÄUSEN VERRINGERT .....</b>	<b>76</b>
<b>6.8</b>	<b>DIE ANTIBAKTERIELLE IMMUNANTWORT IST IN CX<sub>3</sub>CR1-DEFIZIENTEN MÄUSEN NICHT BEEINTRÄCHTIGT.....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u></b>	<b><u>79</u></b>
<b>8</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>80</u></b>
<b>9</b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>88</u></b>
<b>10</b>	<b><u>PUBLIKATIONSLISTE .....</u></b>	<b><u>90</u></b>

## 2 Einleitung

### 2.1 Innates und adaptives Immunsystem

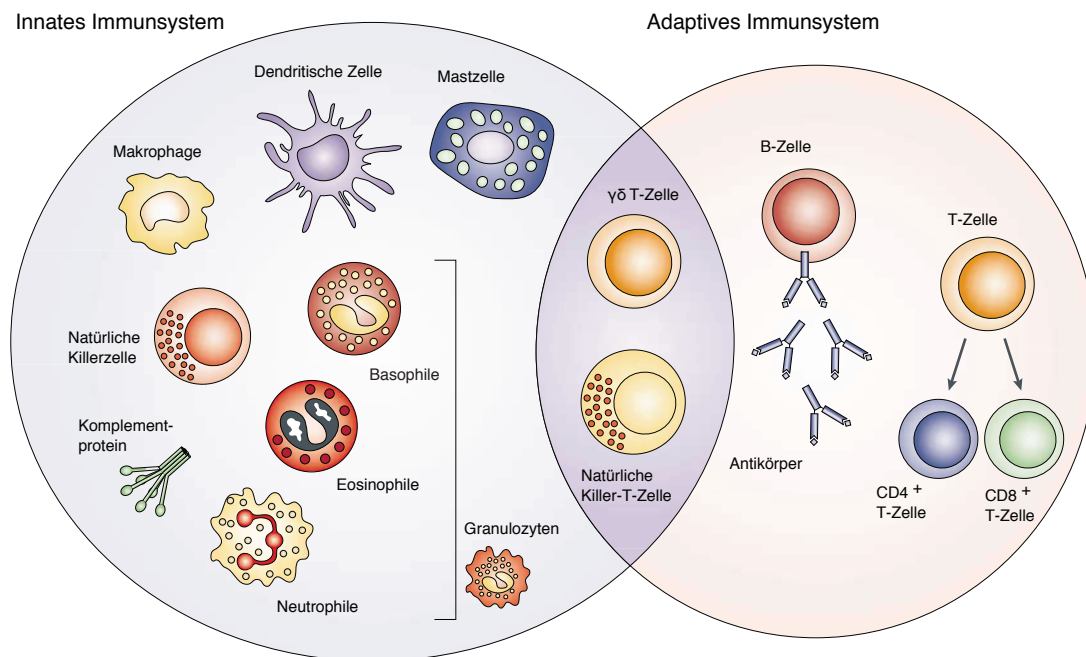
Das Immunsystem dient der Abwehr von in den Organismus eindringenden Toxinen und Pathoorganismen, wie z.B. Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, sowie der Eliminierung entarteter körpereigener Zellen. Es ist für die Integrität eines Organismus unentbehrlich, jedoch kann es bei Fehlregulation auch den Körper selbst angreifen und Erkrankungen hervorrufen. Gliedern lässt sich das Immunsystem in zwei Hauptbestandteile: das schnell aktivierbare angeborene oder innate Immunsystem und das hoch-spezifische erworbene oder adaptive Immunsystem (1).

Das innate Immunsystem ist als erste Abwehrlinie des Organismus schnell aktivierbar, aber dabei verglichen mit dem adaptiven Immunsystem relativ unspezifisch. Die Erkennung von Pathogenen durch das innate Immunsystem basiert auf einer beschränkten Anzahl von Rezeptoren, die vielen Mikroorganismen gemeinsame Strukturen binden (2). Neben verschiedenen in Blut, Extrazellulärflüssigkeit und epithelialen Sekreten gelösten Faktoren, die Krankheitserreger töten oder deren Pathogenität mildern können, besteht das innate Immunsystem aus Zellen, die durch die Erkennung von Pathogenmustern aktiviert werden und Infektionen über verschiedene Mechanismen eliminieren können (3, 4). Lösliche Bestandteile des innaten Immunsystems sind antibakterielle Proteine und Enzyme und das aus Plasmaproteinen bestehende Komplement-System, das Komplexe auf bakteriellen Oberflächen bilden kann, die zur Lyse der Bakterien oder zur Aufnahme und Abtötung durch Phagozyten führen (5). Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems werden Granulozyten (Eosinophile, Basophile und Neutrophile), Mastzellen, Natürliche Killerzellen und mononukleäre Zellen wie Makrophagen (MPs) und Dendritische Zellen (DCs) gezählt (1). Einige Zellen des innaten Immunsystems, insbesondere DCs, sind für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems essentiell (6, 7).

Das adaptive Immunsystem kommt zum Tragen, wenn ein Mikroorganismus lösliche und zelluläre Barrieren des innaten Immunsystems überwindet und durch diese nicht eliminiert werden kann (1). Auch dieser Teil des Immunsystems besteht zum einen aus löslichen Proteinen, den sogenannten Antikörpern, die hoch-spezifisch an extrazelluläre Pathogene oder Toxine binden und diese neutralisieren oder opsonieren können, und zum anderen aus Zellen, die über verschiedene Effektormechanismen zur Eliminierung extra- und intrazellulärer Infektionen beitragen. Die hohe Spezifität des adaptiven Immunsystems kommt durch die Generierung eines großen Repertoires von Rezeptoren zustande, die durch somatische Gen-Reorganisation in den Zellen entstehen und kleinste Unterschiede in verwandten Molekülen detektieren können (8). Die Erkennung eines Pathogens durch Zellen des adaptiven Immunsystems führt zu klonaler Expansion der reaktiven Zellen und zur

Differenzierung in Effektor- und Gedächtniszellen (9). Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sind Antikörper-bildende B-Zellen,  $CD8^+$  cytotoxische T-Zellen (CTLs) und  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen (Th-Zellen). Sowohl B-Zellen als auch T-Zellen können Gedächtniszellen bilden, die langanhaltende Immunität gegenüber wiederkehrenden Infektionen vermitteln (9).

Neben den Zellen des adaptiven und des innate Immunsystems gibt es einige Zellarten, die sich bezüglich ihrer Antigen-spezifität und ihrer Effektormechanismen nicht eindeutig dem einen oder anderen Teil des Immunsystems zuordnen lassen. Zu diesen Zellen gehören zum Beispiel NKT-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen (10).



**Abbildung 2.1:** Innates und adaptives Immunsystem, modifiziert mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer (10), copyright 2004.

## 2.2 Zytokine

Bei der Generierung von Immunantworten spielen Zytokine eine entscheidende Rolle, da sie (neben Zellmembran-gebundenen Faktoren) die Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen des Immunsystems vermitteln, die Migration von Zellen an ihren Wirkungsort regulieren und zentraler Bestandteil der Effektorfunktionen vieler innater und adaptiver Immunzellen sind. Zytokine sind lösliche Botenstoffe, die von vielen Zellen, häufig als Antwort auf aktivierende Stimuli, produziert und sezerniert werden können und die Zellfunktionen auto-, para- und in einigen Fällen sogar endokrin durch Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche beeinflussen können. Einige Zytokine stellen wichtige Wachstumsfaktoren für bestimmte Zelltypen dar, andere aktivieren Zellen in ihrer Funktion oder beeinflussen die Differenzierung eines Zelltyps (1).

## 2.3 Antigen-Präsentation

Antigen-präsentierende Zellen (APCs) bilden die Verbindungsachse zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem, denn die Initiierung einer adaptiven Immunantwort setzt die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen durch maturierte APCs voraus (Priming) (11). Aktivierte T-Zellen können dann wiederum die Funktionen von weiteren APCs unterstützen (12). Zu den APCs gehören unter anderem DCs und MPs. Dabei sind besonders DCs zur initialen Aktivierung naiver T-Zellen in der Initiations-Phase (Priming-Phase) einer Immunantwort in der Lage (13). Man bezeichnet sie darum auch als professionelle APCs. MPs präsentieren Antigene dagegen eher in der Effektorphase einer Immunantwort an aktivierte T-Zellen und werden daraufhin durch diese aktiviert (1, 14).

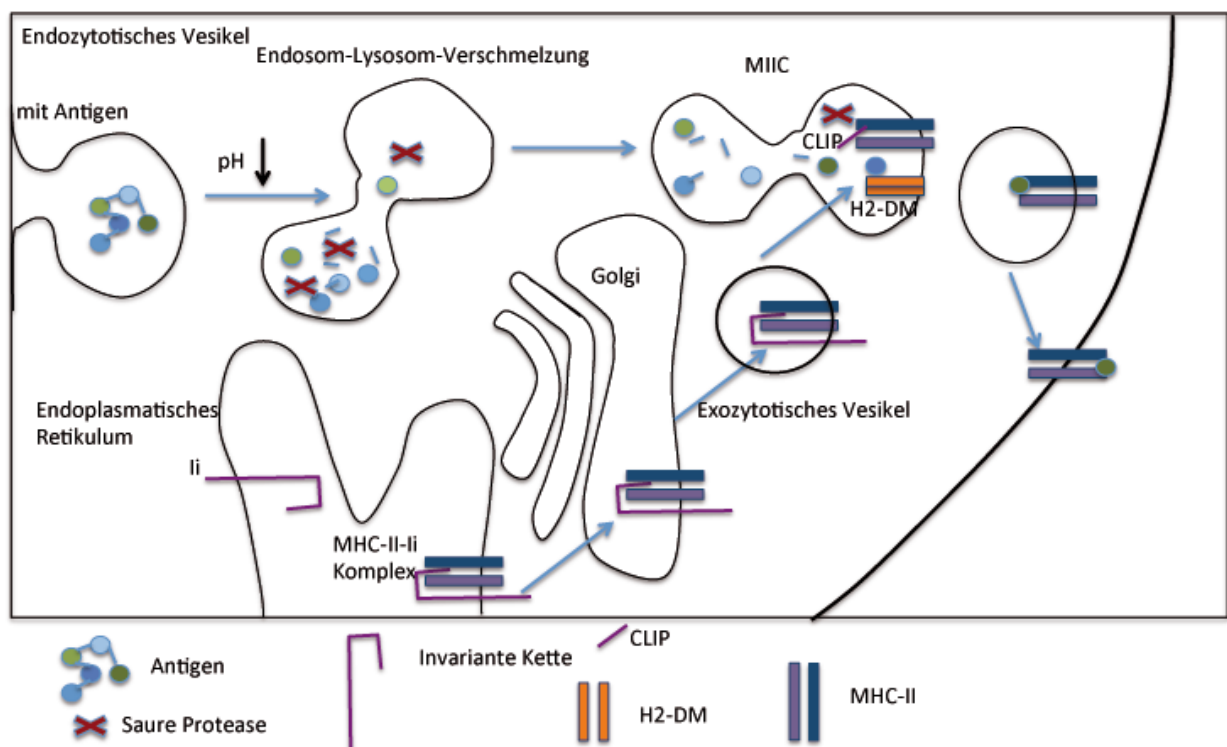
APCs zeichnen sich dadurch aus, dass sie sowohl intrazelluläre als auch aus dem Extrazellulärraum aufgenommene Antigene effizient prozessieren und auf Molekülen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes I und/oder II (Major Histocompatibility Complex (MHC)) auf ihrer Oberfläche präsentieren können. Diese Fähigkeit unterscheidet sie von den meisten somatischen Zellen. Diese bringen zwar konstitutiv kleine Mengen intrazellulärer Peptid-Fragmente auf MHC-I-Molekülen an die Zelloberfläche, extrazelluläre Antigene aufnehmen und auf MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentieren können die meisten somatischen Zellen aber nicht (1).

## 2.4 MHC-II-Beladung

Die Prozessierung von aufgenommenen Antigenen und die Beladung von MHC-II-Molekülen mit den generierten Peptid-Fragmenten in den APCs erfordern das Zusammenspiel verschiedener intrazellulärer Moleküle, die an diesen koordinierten Prozessen beteiligt sind. Wie effizient APCs Antigene präsentieren, hängt zum einen von der Endo-/Phagozytose-Aktivität und zum anderen von der Expression der an Prozessierung, Beladung und Präsentation beteiligten Proteine ab (15, 16). Die Generierung von Peptid-Fragmenten und die MHC-II-Beladung verlaufen in folgenden Schritten: Aufgenommene Antigene gelangen in Endo- oder Phagosomen, die auf ihrem Weg ins Zellinnere angesäuert werden und schließlich mit Lysosomen verschmelzen. Die Endo- und Lysosomen enthalten verschiedene Proteasen, welche durch die Absenkung des pH-Wertes aktiviert werden und die Antigene in kleine Fragmente zerschneiden (17). Zu diesen Säure-Proteasen gehören unter anderem die Cathepsine. MHC-II-Moleküle werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und binden dort an das Chaperonprotein Invariante Kette (Ii), das die Bindung von Peptiden an die MHC-II Moleküle innerhalb des ERs verhindert. Dies ist notwendig, da das ER gefüllt ist mit zelleigenen ungefalteten Peptidketten, die in Abwesenheit der Ii die Peptidbindungsstellen der MHC-II-Moleküle belegen würden. Ii-gebundene MHC-II-Moleküle werden aus dem ER geschleust und verschmelzen mit endosomalen Vesikeln, die die Antigen-stämmigen Peptide enthalten. Säure-Proteasen in diesen



verschmolzenen Vesikeln, die man auch als MHC-II Kompartimente (MIIC) bezeichnet, zerschneiden die Invariante Kette, so dass nur ein kleines Fragment in der Peptidbindungsstelle verbleibt, das als Klasse II assoziiertes Invariante-Kette-Peptid (class II-associated invariant chain peptide (CLIP)) bezeichnet wird. Der Austausch von CLIP durch ein Antigen-Peptid erfolgt mit Hilfe des MHC-II-ähnlichen Moleküls H2-DM. H2-DM stabilisiert außerdem leere MHC-II-Moleküle, die sonst aggregieren würden und katalysiert die Loslösung von instabil gebundenen MHC-II-Peptiden, damit sich stabilere Komplexe mit anderen Peptiden im MIIC bilden können. Durch diesen Austausch wird sichergestellt, dass MHC-II-Peptidkomplexe an der Zelloberfläche stabil sind und nicht sofort dissoziieren. Nach der Bildung eines stabilen MHC-II-Peptid-Komplexes wird dieser an die Zelloberfläche gebracht und kann dort von CD4<sup>+</sup>T-Zellen erkannt werden (1, 18).



**Abbildung 2.2:** MHC-II-Beladung.

## 2.5 Dendritische Zellen

DCs sind professionelle APCs. Sie wurden erstmals 1973 von Steinman und Cohn als ein neuer morphologisch einzigartiger Zelltyp in peripheren lymphatischen Organen beschrieben, der sich neben der Morphologie durch eine höhere Fähigkeit zur Aktivierung naiver T-Zellen und eine reduzierte Phagozytose-Aktivität von den bis dahin bekannten Makrophagen unterschied (19). Der Name dieser „Dendritischen Zellen“ ist auf die durch zytoplasmatische Ausläufer an einen Baum (griechisch: dendron) erinnernde Morphologie zurückzuführen. Seit ihrer ursprünglichen Beschreibung hat sich gezeigt, dass es viele verschiedenen Typen von DCs gibt, die sich bezüglich der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, ihrer Ontogenese, Funktion und Lokalisation voneinander

abgrenzen (20, 21). Heute unterscheidet man grob zwischen plasmazytoiden DCs (pDCs), die hauptsächlich im Blut und lymphoiden Organen vorkommen, und klassischen DCs (cDCs), die wiederum in Lymphgewebe-residente und migratorische DCs unterteilt werden können. Sowohl Lymphgewebe-residente als auch migratorische DCs weisen abermals verschiedene Subtypen mit voneinander abgegrenzten Funktionen und Phänotypen auf (22). Die zwei Haupt-Typen von cDCs stellen  $CD8\alpha^+CD11b^-$  DCs (bzw.  $CD103^+CD11b^-$  DCs in nicht-lymphatischen Organen) auf der einen Seite und  $CD8\alpha^+CD11b^+$  DCs auf der anderen Seite dar (23, 24). Die gleichzeitige Expression von CD11c und MHC-II ist fast allen DCs gemeinsam und wird häufig zur Definition muriner DCs herangezogen (24).

DCs sind in allen lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen zu finden, wo sie ihre direkte Umgebung überwachen (25). Dazu nehmen sie Antigene auf, prozessieren sie und transportieren sie zum drainierenden Lymphknoten, in welchem die Antigenfragmente gebunden an MHC-Moleküle auf der DC-Oberfläche präsentiert werden (26). Nur in dieser MHC-gebundenen Form können die Antigene von T-Zellen erkannt werden. Je nach Reifungszustand der DCs, der wiederum von der Natur und dem Ursprung der aufgenommenen Antigene und deren Detektion durch innate Rezeptoren abhängt, kommt es nach Erkennung des Antigens durch spezifische T-Zellen zur Aktivierung und klonalen Expansion der T-Zellen und damit zur Einleitung einer adaptiven Immunantwort oder aber zur Induktion von Toleranz durch T-Zell-Anergie, –Umdifferenzierung oder –Eliminierung (27, 28).

Aber nicht nur die Überwachung der Peripherie und eine initiale Aktivierung oder Toleranzinduktion von naiven T-Zellen in lymphatischen Organen fallen in den Funktionsbereich von DCs. Zusätzlich können DCs lokale Immunantworten durch die Interaktion mit infiltrierenden Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen regulieren und durch die Produktion verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine beeinflussen (29-32).

## 2.6 Makrophagen

Auch MPs gehören zu den APCs. Sie sind auf die Phagozytose und anschließende Abtötung von eindringenden Mikroorganismen und infizierten Zellen spezialisiert und tragen zur Eliminierung apoptotischer Zellen und Zelltrümmer und damit zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase bei. Ihre anti-infektiösen Effektorfunktionen beschränken sich allerdings nicht nur auf Phagozytose, sondern sind vielfältig und reichen von der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und zytotoxischer Mediatoren über die Rekrutierung anderer Immunozyten ins entzündete Gewebe bis hin zur Wundheilung und Narbenbildung (1, 33, 34).

Normalerweise können MPs phagozytierte Pathogene abtöten, in einigen Fällen aber entkommen die Mikroorganismen den Effektorfunktionen der MPs und überleben intrazellulär (35). Ist dies der Fall, bedarf es der Aktivierung der MPs durch aktivierte T-Zellen. MPs präsentieren Fragmente der aufgenommenen Pathogene auf ihrer Oberfläche auf MHC-II Molekülen. Erkennt eine aktivierte T-Zelle

ihr Antigen, aktiviert sie den präsentierenden MP durch Zell-Kontakt-abhängige Mechanismen und die Produktion des Zytokins IFN- $\gamma$  (14). Aktivierte Makrophagen steigern die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und produzieren außerdem zelltoxische Substanzen wie Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS), durch die sie die Pathogene schließlich abtöten können. Allerdings kann die Aktivierung von MPs auch zur Schädigung des Gewebes führen, da die Mediatoren nicht nur für die Mikroorganismen, sondern auch für die Körperzellen toxisch sind (1).

## 2.7 T-Zellen

Wie alle anderen Immunzellen entstehen die Vorläufer der T-Zellen im Knochenmark. Jedoch entwickeln sie sich im Gegensatz zu allen anderen Zellen hämatopoetischen Ursprungs in einem spezialisierten Organ, dem Thymus, der den T-Zellen ihren Namen verliehen hat. Nach dem Durchschreiten mehrerer Entwicklungsstadien in diesem Organ, während derer unter anderem selbstreaktive T-Zellen aussortiert werden (zentrale Toleranz), verlassen die selektionierten T-Zellen den Thymus als CD8<sup>+</sup> CTLs oder als CD4<sup>+</sup> Th-Zellen (36).

Die Effektorfunktion von CTLs besteht in der Abtötung virusbefallener und entarteter Zellen (37). Mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors und des Co-Rezeptors CD8 auf ihrer Oberfläche erkennen sie auf MHC-I-Molekülen präsentierte Fremd-Moleküle aus dem Zytoplasma, z.B. virale Antigene (38). Jede Körperzelle besitzt die Fähigkeit, zytoplasmatische Bestandteile im Kontext von MHC-I auf die Zelloberfläche zu bringen. Im Falle einer Infektion können CTL die infizierten Zellen so erkennen und zerstören. Voraussetzung für diese Funktion ist allerdings die vorherige Aktivierung der naiven T-Zellen durch professionelle APCs (1).

Zur Induktion, Verstärkung und Spezifizierung vieler Immunantworten bedarf es der Hilfe spezifischer Th-Zellen (39, 40). Diese erkennen mit ihrem T-Zell-Rezeptor und dem Co-Rezeptor CD4 Antigene, die im Kontext von MHC-II Molekülen präsentiert werden (16). Im Gegensatz zu MHC-I wird MHC-II mit wenigen Ausnahmen nur von APCs exprimiert (15, 16). Nachdem sie aktiviert worden sind, können Th-Zellen die Effektormechanismen von Zellen des innatens und des adaptiven Immunsystems durch die Produktion von Zytokinen oder durch Zell-Kontakt-abhängige Mechanismen unterstützen. Bei der Aktivierung können aus einer naiven Th-Zelle (Th0) verschiedene Subtypen von Th-Zellen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen differenzieren. Sie werden aufgrund der von ihnen produzierten Zytokine klassifiziert. Welche Art von Th-Zelle aus den Th0-Zellen differenziert, hängt von dem bei ihrer Aktivierung vorherrschenden Zytokinmilieu ab, das wiederum von den anwesenden innatens Immunzellen und den abzuwehrenden Pathogenen beeinflusst wird (41, 42). Unter dem Einfluss von IL-12 differenzieren Th0-Zellen in Th1-Zellen, die eine Schlüsselrolle in der Zell-vermittelten Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien und Viren spielen und durch die Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF vor allem Makrophagen aktivieren und in B-Zellen die Produktion von opsonisierenden und

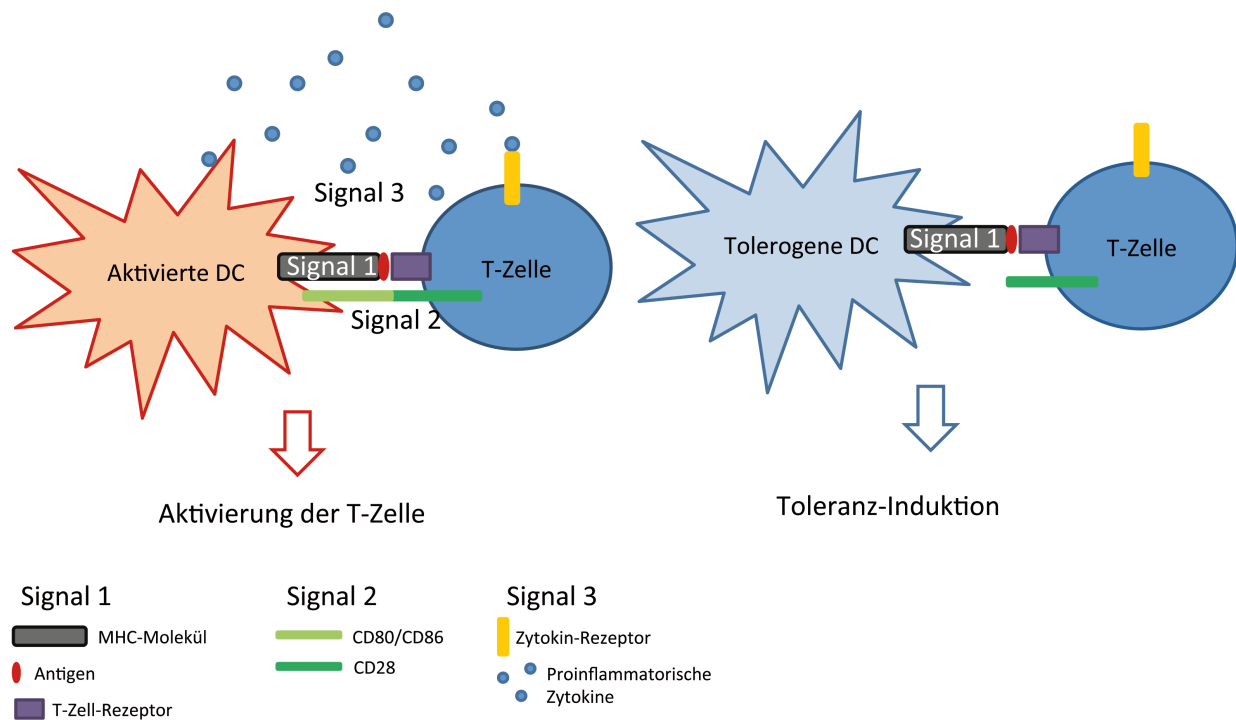
Komplement-bindenden Antikörper-Klassen induzieren (12). Dagegen entwickeln sich Th2-Zellen in Anwesenheit von IL-4 (43). Sie induzieren die Produktion von Mastzell-aktivierenden IgE-Antikörpern in B-Zellen (44), produzieren die Effektorzytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und sind mit Immunantworten gegen Helminthen und Protozoen assoziiert (45). Th17-Zellen, die sich vor allem durch die Produktion des Zytokins IL-17 auszeichnen (46), differenzieren aus Th0-Zellen in Anwesenheit einer Kombination der Zytokine IL-6 und TGF- $\beta$  und vermitteln Immunantworten gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze (47).

Zusätzlich zu den Th-Zellen gibt es eine Reihe von CD4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Tregs), die entweder zentral im Thymus entstehen oder in der Peripherie aus naiven T-Lymphozyten in Anwesenheit tolerogener Stimuli differenzieren können. Diese Tregs können durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch die Sekretion inhibitorischer Zytokine wie IL-10 oder TGF- $\beta$  Immunantworten lokal inhibieren und regulieren. Sie sind für die Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz und die Verhinderung von Kollateralschäden bei anti-infektiösen Immunantworten essentiell (48).

## 2.8 T-Zell-Aktivierung

Die immunogene Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen durch APCs erfordert die Anwesenheit von drei von den APCs ausgehenden Signalen (6). Das erste Signal stellt der Antigen-MHC-Komplex auf der APC-Oberfläche dar. Nur wenn dieser Komplex mit ausreichend hoher Affinität vom T-Zell-Rezeptor gebunden und das Antigen damit erkannt wird, etabliert sich ein Kontakt zwischen APC und T-Zelle. Findet keine Erkennung statt, bewegt sich die T-Zelle weiter, um die Oberfläche der nächsten APC zu überprüfen (49). Das zweite essentielle Signal für eine Aktivierung der T-Zelle sind kostimulatorische Moleküle auf der APC, z.B. CD80 und CD86, die an das Molekül CD28 auf der T-Zelle binden (50-52). APCs können nur dann Kostimulation vermitteln, wenn sie selbst, z.B. über innate Rezeptoren, aktiviert worden sind, wenn also die von ihnen präsentierten Antigene in Zusammenhang mit einer Infektion bzw. Inflammation stehen (6). Durch die Bindung von Kostimmungsmolekülen an die Rezeptoren auf den T-Zellen werden Überlebenssignale an die T-Zellen geleitet. Fehlt Kostimulation, wird Toleranz, z.B. durch die Eliminierung der reaktiven T-Zellen, induziert. Als drittes Signal gilt die Ausschüttung von Zytokinen durch APCs und die Bindung dieser Moleküle an Rezeptoren auf der T-Zelle (53). Welche Zytokine eine APC produziert, hängt davon ab, welche innaten Rezeptoren durch das Pathogen aktiviert worden sind (6). Zytokine liefern sowohl Proliferationsstimuli als auch Differenzierungsinformationen an die T-Zelle und formen somit die resultierenden Effektorfunktionen der aktivierten T-Zelle und damit die Art der Immunantwort. In Anwesenheit aller drei Stimuli wird die Antigen-spezifische T-Zelle aktiviert. Sie beginnt zu proliferieren und Zytokine wie den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 und kontextabhängige weitere Effektorzytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-4 oder IL-17 zu produzieren (6, 54).

In der Abwesenheit eines der drei essentiellen Signale kommt es unter normalen Umständen nicht zur Aktivierung von T-Zellen (25, 55). Dadurch wird gewährleistet, dass die sehr effektiven und potentiell gefährlichen T-Zell-Antworten nur in Anwesenheit von Pathogenen induziert werden (25). Diese Regulation ist notwendig, weil sonst selbstreaktive T-Zellen, die durch die zentralen Toleranzmechanismen nicht eliminiert worden sind, Körperzellen unkontrolliert zerstören und so zu großen Schäden im Organismus führen könnten. In seltenen Fällen kann es zu Störungen in der Kontrolle der Immunantworten kommen, was zu einer Hypersensitivität des Organismus führen kann.



**Abbildung 2.3:** Aktivierte DCs liefern drei Signale und können naive T-Zellen aktivieren, während unreife DCs in Antigen-spezifischen naiven T-Zellen Toleranz induzieren.

## 2.9 Hypersensitivitäts-Reaktionen

Wenn das Gleichgewicht im Immunsystem zwischen Toleranz und Aktivierung zu Gunsten der Aktivierung gestört wird, obwohl keine Pathogene oder entartete Zellen präsent sind, kann es zu Immunantworten kommen, die dem Organismus schaden, anstatt ihn zu schützen. Solche Immunantworten werden als Hypersensitivitäts-Reaktionen (HSR) bezeichnet, da sie durch eine Überempfindlichkeit des Immunsystems gegenüber harmlosen Substanzen hervorgerufen werden (1).

Es gibt vier Klassen von immunologisch vermittelten HSR (54). Typ I-III HSR sind Antikörper-vermittelt und werden nach den reaktiven Antikörper-Klassen und der Art des Antigens (Zell-assoziiert oder löslich) unterschieden. Während Typ I HSR schnell vermittelte allergische Reaktionen darstellen, die durch IgE-Antikörper hervorgerufen werden, welche nach Kreuzvernetzung durch lösliche Antigene Mastzellen aktivieren und zu deren Degranulation führen, sind Typ II und Typ III HSR durch IgG-Antikörper vermittelt. Typ II HSR werden durch Antikörper hervorgerufen, die Zell- oder Matrix-

assoziierte Antigene binden. Diese IgG-Markierung führt zur Fc-Rezeptor- oder Komplementrezeptor-abhängigen Rekrutierung und Aktivierung von innatem Immunzellen und Entzündungsreaktionen im Gewebe. Im Fall von Rezeptor-spezifischen Antikörpern können außerdem Signalwege innerhalb der Zellen durch die Antikörper-Bindung beeinflusst werden. Typ III HSR richten sich gegen lösliche Antigene, die mit den gebundenen IgG-Antikörpern Immunkomplexe bilden. Immunkomplexe setzen sich in engen Gefäßen ab und führen dort ähnlich wie bei Typ II Reaktionen zu Entzündungsreaktionen durch Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen (1).

Typ IV HSR werden im Gegensatz zu den Typ I-III Reaktionen nicht durch Antikörper, sondern durch T-Zellen vermittelt. Dabei können sowohl  $CD4^+$  als auch  $CD8^+$  T-Zellen die Effektorzellen sein. Hypersensitivität kann durch Th1-Zellen vermittelt werden, die harmlose Antigene erkennen, Immunzellen ins Gewebe rekrutieren und Makrophagen aktivieren. Die Aktivierung führt zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und toxischen Mediatoren durch die Makrophagen und damit zu einer Entzündungsreaktion im Gewebe. Diese Form der Typ IV HSR wird auch als Hypersensitivitätsreaktionen vom verspäteten Typ (Delayed Type Hypersensitivity (DTH)) bezeichnet, weil ihre Ausbildung deutlich länger dauert als die der Antikörper-vermittelten Reaktionen (54). Auch Th2-Zellen können Typ IV HSR induzieren. Dabei wird die Entzündung im Gewebe vor allem durch eine Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen vermittelt. In einigen Fällen kann Hypersensitivität auch durch aktivierte CTLs vermittelt werden, die harmlose Antigene auf Zellen erkennen und diese lysieren (1).

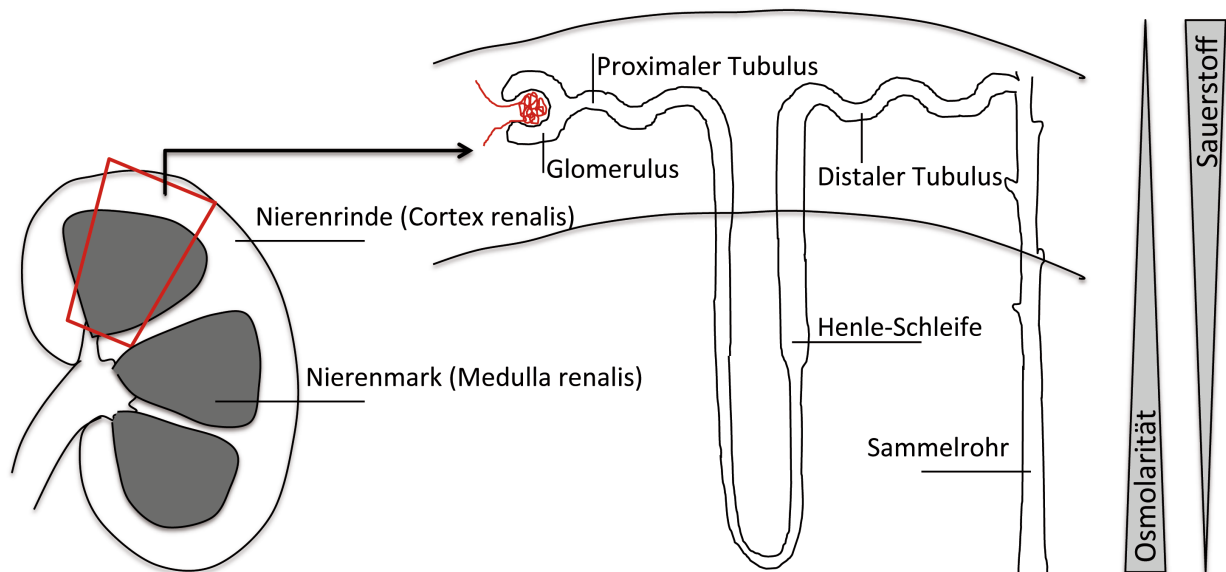
## 2.10 Anatomie und Physiologie der Niere

Die Nieren dienen der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen aus dem Organismus. Außerdem regulieren sie neben der Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushalts das Säure-Base-Gleichgewicht und die Bildung und Metabolisierung einiger Hormone (56). Makroskopisch unterteilt sich das Nierengewebe in zwei Kompartimente: die Nierenrinde (*Cortex renalis*) und das Nierenmark (*Medulla renalis*), das zwischen der Nierenrinde und dem Nierenbecken, in dem der Urin gesammelt wird, liegt (56). Die kleinste Funktionseinheit der Nieren bildet das Nephron, das aus dem von der Bowman-Kapsel umhüllten Glomerulus, dem proximalen Tubulus, der Henle-Schleife, dem distalen Tubulus und dem ableitenden Sammelrohr besteht. Die Nieren einer Maus enthalten jeweils ca. 8000 Nephrone, die Nierenrinde und Nierenmark mit ihren unterschiedlichen Abschnitten durchziehen (57). Die Glomeruli und die proximalen Tubulusabschnitte befinden sich im Cortex. Der absteigende Ast der Henle-Schleife verlässt den Cortex und tritt in die Medulla ein, von wo aus sich der aufsteigende Ast wieder in den Cortex zieht und dort in den distalen Tubulus übergeht. Schließlich münden die distalen Tubuli in die Sammelrohre, die die Nierenrinde und das Nierenmark in Richtung Nierenbecken, in das sie münden, durchziehen (56).

In den aus feinen Kapillar-Knäueln bestehenden Glomeruli wird abhängig vom hydrostatischen und kolloidosmotischen Druck in den zu- und abführenden Gefäßen ein als Primärharn bezeichnetes Filtrat abgepresst, das eine dem Blutplasma ähnliche Zusammensetzung aufweist, allerdings aufgrund eines dreibarierten Filters, bestehend aus Kapillarendothel, Basalmembran und Podozyten, keine Moleküle mit einem Molekulargewicht  $>45\text{kDa}$  enthält (58). Kleinere Moleküle werden hingegen frei filtriert und durch Resorption durch die Tubuluszellen in der Niere konzentriert. Darunter befinden sich auch Fremd-Antigene, z.B. aus der Nahrung, die von DCs im Tubulointerstitium aufgenommen werden (59). Gegen diese frei filtrierten Antigene muss eine Toleranz aufrechterhalten werden, damit es in den Nieren nicht konstitutiv zu Entzündungsreaktionen gegen die harmlosen Fremd-Substanzen kommt.

In den an die Glomeruli angeschlossenen Abschnitten des Nephrons wird der Primärharn in seiner Zusammensetzung durch Sekretion und aktive und passive Resorption verändert, so dass der Organismus am Ende Abfallprodukte des Stoffwechsels ausscheiden kann, den Großteil des primär filtrierten Wassers, der Elektrolyte und der Nährstoffe dabei aber nicht verliert. Der Primärharn wird dabei konzentriert. Für diese Harnkonzentrierung bedarf es des Aufbaus eines osmotischen Gradienten vom äußeren Rand der Nierenrinde bis zum inneren Rand des Nierenmarks, der in erster Linie durch die Henle-Schleife erfolgt. Im nachfolgenden Sammelrohrsystem kann dann durch diesen Gradienten Wasser resorbiert und der Harn letztendlich auf dem Weg von der Nierenrinde zum Nierenbecken konzentriert werden. Aus dem Nierenbecken wird der Endharn über den Harnleiter in die Harnblase transportiert (56).

Zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gradienten werden Cortex und Medulla durch unterschiedliche Gefäßsysteme mit Blut und Sauerstoff versorgt. Während die Nierenrinde gut durchblutet und sauerstoffreich ist, ist das Nierenmark deutlich schlechter versorgt. Eine bessere Durchblutung des Nierenmarks hätte zur Folge, dass der osmotische Gradienten ausgewaschen werden würde und eine Harnkonzentrierung nicht mehr stattfinden könnte (56). Somit sind Zellen in der Medulla im Vergleich zu denen im Cortex nicht nur bis zu vierfach höheren Osmolaritäten, sondern auch stark hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Ob die unterschiedlichen Bedingungen die Funktion der Zellen in Nierenrinde und Nierenmark beeinflussen, ist bislang nicht bekannt.



**Abbildung 2.4:** Schematische Zeichnung der Niere mit Nierenrinde und Nierenmark und eines Nephrons mit seinen verschiedenen Abschnitten

## 2.11 Entzündliche Nierenerkrankungen

Akute oder chronische entzündliche Nierenerkrankungen bezeichnet man als Nephritiden (Singular: Nephritis). Sie können sowohl die Glomeruli (Glomerulonephritis (GN)) als auch das Tubulointerstitium (interstitielle Nephritis) betreffen. Nephritiden können vielfältige Ursachen haben, unter anderem allergische Reaktionen, Autoimmunreaktionen, aber auch bakterielle oder virale Infektionen.

### 2.11.1 Glomerulonephritis und das Modell der nephrotoxischen Nephritis

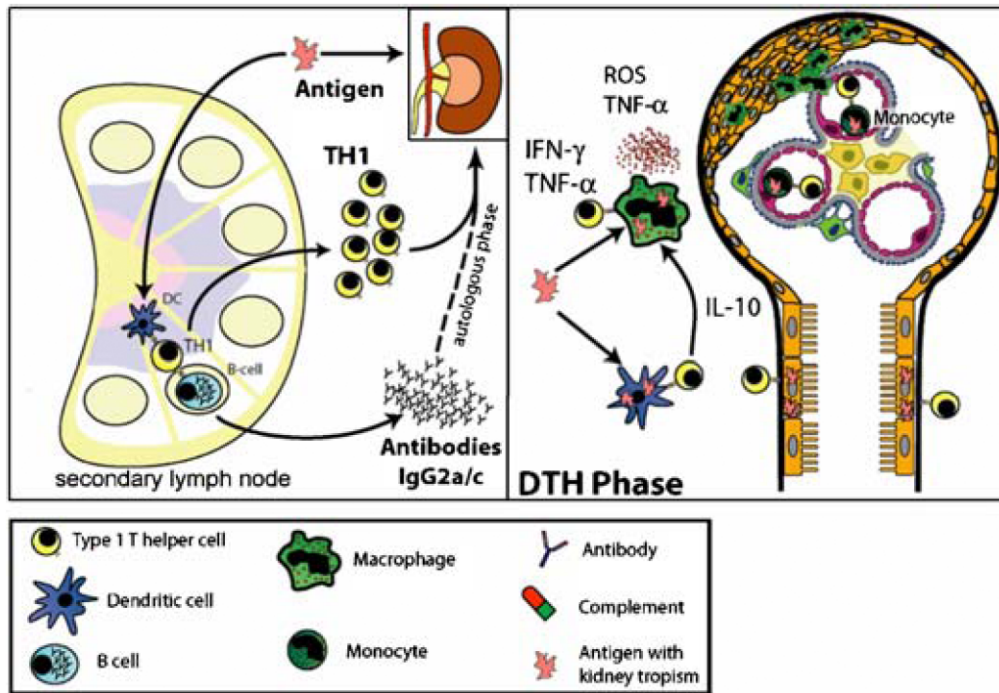
Die Pathogenese der GNs ist bisher unvollständig geklärt. Die Pathomechanismen können vielfältig sein und unterschiedliche Auslöser haben, jedoch scheint das Immunsystem immer ursächlich beteiligt zu sein. GNs können durch HSR vom Typ II und III, also durch Bindung von Antikörpern an nierenspezifische Antigene oder durch Immunkomplexe, die sich in den feinen Kapillaren der Glomeruli festsetzen, ausgelöst werden. Aber auch T-Zell-vermittelte Immunantworten können eine Rolle spielen. Klassifiziert werden GNs nach ihrer Ätiologie, Histologie und dem klinischen Verlauf.

Die nephrotoxische Nephritis (NTN) ist ein Modell für die humane rapid-progressive crescentische GN, die durch einen glomerulären Schaden mit Halbmondbildung (englisch: crescents) um die Glomeruli, gekennzeichnet ist (40). Diese Form der GN ist sehr aggressiv und führt unbehandelt meist zum terminalen Nierenversagen mit Dialysepflicht. In den Mäusen wird die NTN durch systemische Immunisierung mit einem heterologen nephrotoxischen Serum (NTS) vom Schaf, das mit murinem kortikalen Gewebe vakziniert wurde, induziert (60). Die darauf folgende Immunantwort gliedert sich in zwei Abschnitte, eine frühe T-Zell-vermittelte und eine durch autologe Antikörper vermittelte späte Phase (54). Die Immunisierung führt zur Aktivierung von  $CD4^+$  T-Zellen in sekundären lymphatischen



Organen und zu ihrer Differenzierung in Th1 und Th17-Zellen (61, 62). Aufgrund der Spezifität der Schaf-Immunglobuline für die murine Nierenrinde wird die Immunantwort zur Niere gelenkt. Dort produzieren die aktivierten T-Zellen pro-inflammatorische Zytokine und induzieren eine intrarenale DTH-Reaktion, indem sie tubulointerstitielle und glomeruläre Monozyten und Makrophagen aktivieren (63, 64). Die aktivierten mononukleären Zellen produzieren daraufhin Zytokine und Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS), was zu einer Schädigung der Bowman-Kapsel und der glomerulären Basalmembran mit kompensatorischer Epithelproliferation (Halbmondbildung) und zur Rekrutierung weiterer Immunzellen führt (54). Der schädigenden Wirkung der Makrophagen scheint zumindest in der Initiationsphase der NTN eine Schutzfunktion der nierenresidenten DCs gegenüberzustehen (31, 65). Auf die T-Zell- und Makrophagen-vermittelte DTH folgt eine durch autologe Antikörper gegen das Schafserum vermittelte Entzündungsphase, die ungefähr 10 Tage nach der Immunisierung zum Tragen kommt. Dabei handelt es sich um eine Immunkomplex-vermittelte HSR vom Typ III (54). Frühe Zeitpunkte der Analyse, wie sie auch in dieser Arbeit gewählt wurden, erlauben die ausschließliche Betrachtung der DTH-vermittelten Effekte der NTN.

Die initiale Entzündung in den Glomeruli bleibt nicht auf diese Strukturen beschränkt, sondern breitet sich auf das Tubulointerstitium aus, denn die Schädigung der glomerulären Barrieren geht mit einem Verlust der Filterfunktion einher, der dazu führt, dass nicht nur kleine, sondern auch größere Proteine mit einem Molekulargewicht  $>45\text{kDa}$  den glomerulären Filter passieren können. Damit steigt der Proteingehalt des unter normalen Umständen fast proteinfreien Filtrats an. Die Proteinurie führt über zum Teil unbekannte Mechanismen zur weiteren Schädigung der Niere. Unter anderem kommt es zur Proteinüberladung in den resorbierenden Tubulusepithelzellen, die mit der Sekretion von Chemokinen, Zytokinen und Komplementfaktoren reagieren und damit Immunzellen ins Tubulointerstitium rekrutieren (66, 67). Erst der durch diese tubulointerstitielle Entzündung hervorgerufene Schaden, der oft mit einer Fibrose einhergeht, führt letztendlich zu einem Verlust der Nierenfunktion (68-70). Die Aufklärung der Mechanismen, wie die Proteinurie zur Entzündungsausbreitung beiträgt, ist darum von großem Interesse.



**Abbildung 2.5:** Initiation und DTH-vermittelte Phase der NTN, aus (54) mit Erlaubnis von Springer Science and Business Media.

### 2.11.2 Interstitielle Nephritis und das Modell der bakteriellen Pyelonephritis

Pyelonephritiden kommen vor allem bei Frauen relativ häufig vor und werden in den meisten Fällen durch uropathogene *Escherichia coli* (UPECs) ausgelöst (71). Diese gelangen über die Harnblase in den Harnleiter und schließlich ins Nierenbecken, von wo aus sie ins Nierengewebe einwandern und eine interstitielle Nephritis auslösen. Voraussetzung dafür ist die Expression von Typ 1-Pili und P-Fimbrien, mit denen sich die Bakterien ans Urothel in der Blase und im Ureter heften und so zur Niere aufsteigen können (72). Die Pyelonephritis (PN) kann durch Antibiotikagabe behandelt werden (73), doch Vernarbungen der Nieren sind eine verbreitete Komplikation und können zu Nierenversagen führen (74).

In dem hier untersuchten PN-Modell wurden die Mäuse durch zweimalige UPEC-Instillation in die Harnblase im Abstand von 3 Stunden infiziert. Die doppelte Instillation bewirkt ein Aufsteigen der UPECs von der Blase in die Nieren in 86% aller Fälle im Vergleich zu nur 13% bei einmaliger UPEC-Instillation (32).

Neutrophile Granulozyten tragen durch Phagozytose der Bakterien den größten Teil zur Klärung der Infektion bei. In der gesunden Niere sind sie allerdings sehr selten (1-2% aller CD45<sup>+</sup> Zellen), so dass sie im Falle einer Infektion in die Nieren rekrutiert werden müssen, um ihre Effektorfunktion ausüben zu können. Die Rekrutierung aus dem Blut erfolgt über den Chemokinrezeptor CXCR2 auf den Neutrophilen, der CXCR2-Liganden wie CXCL2 bindet, welches produziert wird, wenn Bakterien über innate Rezeptoren detektiert werden (75). Renale DCs sind die Hauptproduzenten von CXCL2 und

rekrutieren Neutrophile umgehend nach der Infektion. In Abwesenheit der DCs sind der Influx neutrophiler Granulozyten und die antibakterielle Immunantwort stark verzögert (32).

## 2.12 DCs in der Niere

Die Nieren sind durchzogen von einem dichten anatomischen Netzwerk aus DCs, das das gesamte Tubulointerstitium durchzieht, alle Nephrone umschließt und der Überwachung des Nierengewebes dient (76). Innerhalb von Glomeruli sind DCs dagegen nicht zu finden (77). DCs machen den größten Teil der intrarenalen Leukozyten aus. In gesunden Nieren gibt es eine kleine Population  $CD103^+$  DCs, die allerdings nur ca. 5% aller renalen DCs ausmacht (78). Die übrigen DCs weisen einen  $CD11b^+F4/80^+CX_3CR1^+$  Phänotyp auf. Aufgrund der starken F4/80-Expression, die in der Milz spezifisch für Makrophagen ist, war lange Zeit nicht klar, ob es sich bei den  $CD11c^+MHC-II^+$  Zellen um DCs handelte (79). Es hat sich aber gezeigt, dass die morphologisch DC-typischen Zellen auch funktionelle Charakteristika von DCs und nicht MPs aufweisen, und eine Transkriptomanalyse der renalen  $CD11c^+$  Zellen hat ihre Zugehörigkeit zur DC-Linie bekräftigt (77, 80).

Renale DCs können innate Immunantworten innerhalb der Nieren durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen initiieren und verstärken (32, 81), aber auch tubuläre, glomeruläre oder filtrierte Antigene aufnehmen und im Nierengewebe oder renalen Lymphknoten an T-Zellen präsentieren, die daraufhin aktiviert oder tolerisiert werden (27, 30, 82, 83).

In der gesunden Niere tragen renale DCs und DCs im Nieren-Lymphknoten zur Aufrechterhaltung der Homöostase durch die Induktion peripherer Toleranz bei (27, 84). In der entzündeten Niere können residente DCs sowohl protektive als auch pro-inflammatorische Funktionen ausüben, abhängig vom Krankheitsmodell (85). So wirken DCs bei cis-Platin-induzierter Nephrotoxizität anti-inflammatorisch und eine Depletion in  $CD11c.DTR$ -Mäusen, in denen  $CD11c^+$  Zellen durch die Injektion von Diphtherietoxin eliminiert werden können, führt zu einer Verschlimmerung des Nierenschadens (86). Hingegen produzieren renale DCs bei renaler Reperfusion-Ischämie (RI) und unilateraler Ureter-Obstruktion (UUO) früh nach Krankheitsinduktion pro-inflammatorische Zytokine und aggravieren so den Schaden (81, 87). Auch im Lupus-Modell in  $MLR-lpr$  Mäusen tragen renale DCs zur Inflammation bei (88).

Die Rolle renaler DCs in der GN ist bisher nicht abschließend geklärt worden. Eine pro-inflammatorische Rolle von DCs wurde in einer T-Zell-vermittelten GN-Form in NOH-Mäusen, die die Modell-Antigene Ovalbumin (OVA) und Hühnereiweiß-Lysozym (Hen Egg Lysozyme (HEL)) in glomerulären Podozyten exprimieren (NOH-Modell), gezeigt. Gleichzeitige Injektion von OVA-spezifischen CTLs und aktivierten Th-Zellen in diese Mäuse führt zur Bildung von periglomerulären Infiltraten und zur Entzündung der glomerulären Epithelzellen. DCs spielen in diesem Modell gleich zwei wichtige Rollen. Erstens präsentieren sie glomeruläre Antigene im Nierenlymphknoten und

aktivieren antigenspezifische CTLs, die in die Niere einwandern, wo sie weitere glomeruläre Antigene freisetzen. Zweitens präsentieren sie diese Antigene auch intrarenal an Th-Zellen, die daraufhin Zytokine und Chemokine produzieren und Monozyten, Makrophagen, DCs und weitere CTLs in die Niere rekrutieren. Die Depletion von DCs in NOHxCD11c.DTR-Mäusen zeigte, dass DCs für die Aufrechterhaltung der periglomerulären Infiltrate und die Entzündung essentiell sind (30). Hingegen scheinen DCs im NTN GN-Modell protektiv zu wirken. Renale DCs produzieren früh in der NTN das Chemokin CXCL16, durch das CXCR6<sup>+</sup> regulatorische NKT-Zellen rekrutiert werden, und induzieren die Produktion des regulatorischen Zytokins IL-10 in Th-Zellen, vermutlich über einen ICOS-L-abhängigen Mechanismus (31, 65). Die Depletion von DCs zu Beginn der NTN führt zu einer Verschlimmerung der Krankheit mit erhöhtem Nierenschaden (65). Ob renale DCs also bei der GN protektiv oder pro-inflammatorisch wirken, ist eine offene Frage, die in dieser Arbeit beantwortet werden soll.

### 2.13 Chemokine

Zytokine, die chemoattraktiv wirken und die Migration und Rekrutierung von Zellen beeinflussen, bezeichnet man als Chemokine (1).

Alle Chemokine sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut und werden abhängig von ihrer Aminosäuresequenz in vier Gruppen unterteilt (89). CC Chemokine besitzen nahe ihrem Amino-Terminus benachbarte Cystein-Reste, die bei den CXC Chemokinen durch eine einzelne und bei dem CXXXC Chemokin CX<sub>3</sub>CL1, dem einzigen Vertreter dieser Gruppe, durch drei Aminosäuren voneinander getrennt sind. C Chemokine besitzen nur ein einziges Cystein am aminoterminalen Ende (89).

Die Chemokinrezeptoren gehören allesamt zu den 7-Transmembran G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Ihre Nomenklatur richtet sich nach der jeweiligen Chemokinklasse, die sie binden. Die Bindung eines Chemokins an seinen Rezeptor führt zur Aktivierung des gekoppelten G-Proteins und löst eine Reihe von Signalkaskaden innerhalb der Zelle aus, die unter anderem die Motilität einer Zelle beeinflussen und diese in Richtung des Chemokin-Gradienten wandern lassen können (89). Aber nicht nur die Zellmigration kann von Chemokinen beeinflusst werden, sondern auch direkte Wirkungen auf Zellfunktionen oder das Überleben von Zellen sind beschrieben worden (90).

Sowohl unter inflammatorischen als auch unter homöostatischen Bedingungen ist die Migration von Zellen durch die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren reguliert. Durch die lokale Produktion von Chemokinen in den sekundären lymphatischen Organen (SLOs), z.B. Milz und Lymphknoten, und die Expression von Chemokinrezeptoren auf Immunzellen können z.B. das Zusammentreffen und die Interaktion dieser Zellen in den SLOs vermittelt werden (91). Auch im nicht-lymphatischen Gewebe werden einige Chemokine konstitutiv und andere als Reaktion auf pro-inflammatorische Stimuli exprimiert. So wird die Einwanderung von Immunzellen ins gesunde oder entzündete Gewebe reguliert.

Chemokinrezeptoren werden differentiell auf Leukozyten exprimiert, z.B. präferentiell von bestimmten Zelltypen oder abhängig vom Differenzierungs- oder Reifungszustand (92). Beispiele hierfür sind CCR6, der hauptsächlich auf Th17-Zellen exprimiert wird, CXCR3, der mit Th1-Zellen assoziiert ist, CXCR6, der vor allem auf NKT-Zellen zu finden ist und CCR7, der von naiven T-Zellen und maturieren DCs exprimiert wird (93, 94). Einige Chemokinrezeptoren sind für den Austritt von bestimmten Zellen aus dem Knochenmark essentiell, z.B. CXCR2 und CCR2, die neutrophilen Granulozyten bzw. inflammatorischen Monozyten den Austritt ermöglichen (95, 96). Andere Chemokinrezeptoren sind mit organspezifischer Rekrutierung von Zellen assoziiert (97). Dazu gehören CCR9, der Immunzellen präferentiell in den Darm oder den Thymus lenkt (98-100), und CCR4, der mit Immunzellen in der Haut und der Lunge assoziiert wird (101, 102). Für die Niere ist ein solcher „Homing-Rezeptor“ bislang nicht bekannt.

## 2.14 CX<sub>3</sub>CR1 und CX<sub>3</sub>CL1

Fast alle renalen DCs exprimieren den Chemokinrezeptor CX<sub>3</sub>CR1 (Fraktalkinrezeptor). Seine Funktion auf diesen Zellen ist jedoch nicht bekannt. Der CX<sub>3</sub>CR1-Ligand CX<sub>3</sub>CL1 (Fraktalkin) ist der einzige bekannte Vertreter der CXXXC-Chemokin-Familie (89). CX<sub>3</sub>CL1 wird vor allem von Endothelzellen gebildet und existiert, anders als alle anderen Chemokine mit Ausnahme von CXCL16, sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form. Membrangebunden wirkt CX<sub>3</sub>CL1 als Adhäsionsmolekül, während lösliches CX<sub>3</sub>CL1 chemoattraktiv auf CX<sub>3</sub>CR1 exprimierende Zellen wirkt (103).

Mit Hilfe von CX<sub>3</sub>CR1-Reportermausen, bei denen ein Allel des Fraktalkinrezeptors durch Grünfluoreszierendes Protein (GFP) ersetzt ist, konnte gezeigt werden, dass CX<sub>3</sub>CR1 vor allem von Monozyten, MPs und CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>DCs, aber in geringerem Maße auch von anderen Immunzellen wie Subpopulationen von NK-Zellen, T-Zellen und Mastzellen und von Mikroglia, exprimiert wird (104).

Die Funktionen von CX<sub>3</sub>CL1 und CX<sub>3</sub>CR1 können mit Hilfe von CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen untersucht werden. Unter homöostatischen Bedingungen scheint CX<sub>3</sub>CR1 einen, wenn auch nur geringen, Einfluss auf die DC- und Makrophagen-Entwicklung zu haben (105). Außerdem fördert CX<sub>3</sub>CR1 das Überleben von Monozyten im Blut (90) und die Ausbildung transepithelialer Fortsätze in DCs der Lamina Propria, mit denen diese luminales Antigen aus dem Darm aufnehmen können (106). Des Weiteren scheint der Rezeptor für die homöostatische Besiedlung der Lamina Propria mit Makrophagen notwendig zu sein (107). Die CX<sub>3</sub>CR1-Expression der beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse reguliert die Glucosetoleranz (108).

Unter inflammatorischen Bedingungen können CX<sub>3</sub>CR1 und CX<sub>3</sub>CL1 kontextabhängig sowohl destruktiv als auch protektiv wirken. So fördert CX<sub>3</sub>CR1 die Abstoßung von Herztransplantaten durch Rekrutierung von Monozyten und NK-Zellen (109). Auch Arteriosklerose wird durch CX<sub>3</sub>CR1-abhängige

Rekrutierung von Monozyten und die Förderung ihres Überlebens verstärkt (90, 110, 111). In anderen Fällen ist eine Rekrutierung von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen dagegen protektiv. Bei Immunantworten gegen Vaccinia Virus Infektionen in der Lunge (112) oder Listerien-Infektionen in der Milz (113) werden anti-infektiöse Effektorzellen CX<sub>3</sub>CR1-abhängig rekrutiert. In CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen sind diese Infektionen verschlimmert. Auch in einigen Leber-Fibrose-Modellen schützt CX<sub>3</sub>CR1 durch die Kontrolle der intrahepatischen Differenzierung und des Überlebens von infiltrierenden Monozyten (114). Zudem verhindern CX<sub>3</sub>CL1 die schädliche subretinale Akkumulation von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Mikroglia in einem Modell der altersabhängigen Maculardegeneration (115).

### **2.15 CX<sub>3</sub>CR1 und CX<sub>3</sub>CL1 in der Niere**

In den Nieren wird CX<sub>3</sub>CL1 von glomerulären Zellen sowie von Tubulusepithelzellen exprimiert (116). Unter inflammatorischen Bedingungen fördert CX<sub>3</sub>CR1 die Rekrutierung von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Monozyten, z.B. in Modellen für RI, Bluthochdruck-ausgelöste Nierenfibrose und Lupus Nephritis (117-120). Beim Menschen scheinen erhöhte Expressionen von CX<sub>3</sub>CL1 und CX<sub>3</sub>CR1 mit verschiedenen Nierenkrankheiten, z.B. Transplantatabstoßungen, GN und IgA-Nephropathie, assoziiert zu sein (121-124). Zur Rolle von CX<sub>3</sub>CR1 in GN im Tiermodell existieren widersprüchliche Daten. Antikörper-Blockierung von CX<sub>3</sub>CR1 inhibierte die Infiltration von Monozyten und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und milderte GN in einem Ratten-Modell (125), wohingegen Immunkomplex-vermittelte GN in CD1 Mäusen unabhängig von einer CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz war (109). Die Rolle von CX<sub>3</sub>CR1 in der NTN ist unklar. Auch über die Funktion von CX<sub>3</sub>CR1 in der Niere unter homöostatischen Bedingungen ist bislang nichts bekannt.

### **2.16 Zielsetzung der Arbeit**

Aus den kontroversen Ergebnissen vorangegangener Studien bezüglich der Protektivität und der pro-inflammatorischen Funktionen von renalen DCs in verschiedenen GN-Modellen und in unterschiedlichen Stadien der Krankheiten ergab sich für diese Arbeit die Fragestellung, welche Funktionen die renalen DCs in gesunden Mäusen und im Verlauf der NTN ausüben.

Des Weiteren sollte die Funktion des Chemokinrezeptors CX<sub>3</sub>CR1, der von fast allen renalen DCs exprimiert wird, dessen Rolle in der Niere aber sowohl unter homöostatischen Bedingungen als auch in der NTN und der PN weitgehend ungeklärt ist, analysiert werden.

### 3 Materialien

#### 3.1 Geräte

Gerät	Firma
Analysenwaage Explorer	Ohaus, MA Bradford, USA
CO <sub>2</sub> begaster Inkubator Heraeus cell240	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer, FACS-Canto II	Becton-Dickinson, Heidelberg
ELISA reader MR5000	Dynatech, VA Chantilly, USA
Eppendorfpipetten	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschrank -20°C	Bosch, München
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau
Hämozytometer Neubauer	Brand, Wertheim
IVC Mausekäfige	Tecniplast, Hohenpeißenberg
Kühlschränke 4°C	Bosch, München
Mikroskop DMIL	Leica, Hamburg
Mikroskop	Olympus, Düsseldorf
Mikrotom (Schneidegerät)	Leica, Hamburg
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikroskopkamera BX-FLA F-View	Olympus, Hamburg
Multifuge 3 SR	Heraeus, Hanau
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim
Nanodrop Spectrophotometer	Thermo Fisher scientific, Wilmington, USA
ph-Meter PHM210	Radiometer, Copenhagen
Rotlichtlampe Infrasil	Phillips, Hamburg
Sterile Werkbank Heraeus HeraSafe HS15 Air	Heraeus, Hanau
Stoffwechsellkäfige	Tecniplast, Hohenpeißenberg
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, CH
Wasserbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
Wasserbad TW8	Julabo Labortechnik, Seelbach
Wasserdeionisierungs-Anlage EASYPURE® II UV	Barnstead, MA Boston, USA
Zell-Sortierer, FACS-DiVa	Becton-Dickinson, Heidelberg
Zell-Sortierer, FACS-Aria	Becton-Dickinson, Heidelberg
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Einmalkanülen Sterican	Braun, Melsungen
Einmalspritzen 1/2/5/10/20ml	Braun, Sterican
ELISA-Platten	Maxi-Sorp, Nunc, Wiesbaden
Eppendorfreaktionsgefäße 2ml/1,5ml/0,5ml	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
FALCON –Röhrchen 15/50 ml Bluecap Polypropylen	BectonDickinson Labware, NJ., USA
Glaspipetten 2 ml, 5 ml, 10ml, 25ml Cellstar	Greiner, Nürtingen
Mikrotom-Klingen	Leica, Hamburg
Nylongaze, Maschenweite 50µm, 100µm	Labomedic, Bonn
Parafilm	American National Can, USA
P10-Säulen	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Pipettenspitzen 1-10µl (kristall)	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter 0,45µm, steril, rottrand	Schleicher & Schuell, Dassel
Urinteststreifen Combur <sup>9</sup> -Test	Roche Diagnostics, Mannheim
Zellkulturplatten 6,12,24 Vertiefungsplatten	CorningCostar, Bodenheim
Zellkultur-Rundbodenplatten, 96 Vertiefungen	CorningCostar, Bodenheim
Skalpell	Labomedic, Bonn
Objektträger	Labomedic, Bonn
Deckgläser	Labomedic, Bonn

### 3.3 Reagenzien

Reagenz	Firma
Annexin-APC	Biologend, Fell
Annexin-Puffer	Ebioscience, Frankfurt am Main
Antikörper-Verdünnungspuffer	Zytomed Systems
β-Merkaptoethanol	Sigma, München
BSA Fraction V, low endotoxin cell culture grade	PAA, Darmstadt
CaliBRITE <sup>®</sup> APC-beads	BD, Heidelberg
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Collagenase D	Roche, Mannheim
Dako-Puffer (DakoCytomation Target Retrieval Solution)	Dako, Hamburg



500kDa-Dextran (FITC-gelabelt)	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Diphtherietoxin	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I	Roche, Mannheim
DEPC	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamin-tetraessigsäure Na <sub>2</sub> -Salz x 2xH <sub>2</sub> O (EDTA)	Sigma, München
Ethanol (EtOH)	AppliChem, Darmstadt
fetales Kälberserum	PAN Systems GmbH, Nürnberg
Golgi Plug	BD Biosciences, Heidelberg
Hoechst 33342	Invitrogen, Karlsruhe
Humanes Immunglobulin (Fc-Block)	Privigen, Marburg
Ionomycin	Sigma, München
Natrium-Acetat (NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natrium-Azid (NaN <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Citrat (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2xH <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Ovalbumin	Invitrogen, Karlsruhe
Paraffin	Labomedic, Bonn
o-Phenylendiamin (OPD)	Sigma, München
Penicilin/Streptomycin	Merck, Darmstadt
Perjodsäure	Sigma, München
PMA	Sigma, München
Schiff's Reagenz	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), 95%	Merck, Darmstadt
Streptavidin-Fluoreszenzkonjugate	BD, Heidelberg
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	Natutec, Frankfurt/Main
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, München
Tween <sup>®</sup> -20 (Polyoxyethylsorbitan-Monolaurat)	GERBU, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30%	Merck, Darmstadt
Zellkulturmedium RPMI 1640	Gibco, Paisley, UK

### 3.4 Antikörper

Antigen	Klon	Konjugat	Anwendung
CD4	GK1.5	PE	Durchflusszytometrie
		PE-Cy7	Durchflusszytometrie
		Eisenoxid	Magnetische Zellsortierung
CD8 $\alpha$	53-6.7	PerCP-Cy5.5	Durchflusszytometrie
CD11c	HL3	APC	Durchflusszytometrie
		PE	Durchflusszytometrie
	N418	V450	Durchflusszytometrie
		PerCP-Cy5.5	Durchflusszytometrie
		Eisenoxid	Magnetische Zellsortierung
I-Ab (MHCII)	AF6-120.1	PE	Durchflusszytometrie
		FITC	Durchflusszytometrie
CD11b	M1/70	APC	Durchflusszytometrie
		PerCP-Cy5.5	Durchflusszytometrie
CD45	30-F11	APC-Cy7	Durchflusszytometrie
		Pacific Blue	Durchflusszytometrie
Gr1	RB6-8C5	PerCPCy5.5	Durchflusszytometrie
		Pacific Blue	Durchflusszytometrie
F4/80	MCA497B	PE	Durchflusszytometrie
		PE Cy7	Durchflusszytometrie
		unkonjugiert	Histologie
CD86	GL1	APC	Durchflusszytometrie
		FITC	Durchflusszytometrie
CD40	3/23	PE	Durchflusszytometrie
CD80	16-10A1	FITC	Durchflusszytometrie
		Biotin	Durchflusszytometrie
CD103	M290	PerCP-Cy5.5	Durchflusszytometrie
V $\alpha$ 2	B20.1	Biotin	Durchflusszytometrie
V $\beta$ 5	MR9-4	PE	Durchflusszytometrie
TNF- $\alpha$	MP6-XT22	APC	Durchflusszytometrie
CD3e	145-2C11	APC	Durchflusszytometrie
	145-2C11	PerCPCy5.5	Durchflusszytometrie
Kaninchen anti human CD3	polyklonal	unkonjugiert	Histologie

IFN- $\gamma$	XMG1.2	APC	Durchflusszytometrie
IL-12/IL-23p40	C15.6	APC	Durchflusszytometrie
MAC-2	M3/38	unkonjugiert	Histologie
Ratte anti Maus FC-Rezeptor	2.4G2	unkonjugiert	Fc-Block

### 3.5 Kits

Kit	Firma
Maus-Albumin ELISA	Bethyl Laboratories, Montgomery USA
Flow-Cytomix Th1/Th2 Multiplex	BenderMedSystems
FlowCytomix IL-12 Simplex	BenderMedSystems
MACS CD4 T Zell Isolationskit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS AntiCD11c MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS AntiCD4 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Reverse-Transkriptions-Kit	Applied Biosystems
ZytoChem-Plus AP Polymer-Kit	ZytoMed Systems

### 3.6 Primer Sequenzen

Transkript	forward/reverse	Sequenz
Invariante Kette (CD74)	F	AGGCTCCACCTAAAGAGCCACTG
	R	ACAGACACCAGTCTCAAGCCCC
H2-DMb1	F	ACGTGCGTGCTGAATGATGCT
	R	AGCCCGTTTTGCAAGCGATGAATA
Cathepsin H	F	AACATGTGTGGCCTGGCTGC
	R	TGATGTCACGTGGGTGGGCT
CX <sub>3</sub> CL1	F	GCCGCGTTCTCCATTTG
	R	CGCACATGATTTGCGATTTTC
GAPDH	F	GGAAGCCCATCACCATCTT
	R	GCCTCACCCCATTTGATGTT

### 3.7 Software

Software	Firma
CellF	Olympus
FlowJo	Tree Star Inc.
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc.
Office 2011	Microsoft
FlowCytomix Pro 3.0 Software	eBiosciences
Illustrator CS3	Adobe

### 3.8 Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Lagerung
<b>Zellkulturmedium</b>	RPMI 1640, 10% FCS, 2mM L(+)-Glutamin, 6mg/ml Penicilin und 10mg/ml Streptomycin, 50µM β-Merkaptoethanol	4°C
<b>Verdaumedium</b>	RPMI 1640, 10% FCS, 2mM L(+)-Glutamin, 6mg/ml Penicilin und 10mg/ml Streptomycin	4°C
<b>FACS-Puffer</b>	0,1% FCS, 0,01% NaN <sub>3</sub> in 1x PBS	4°C
<b>MACS-Puffer</b>	0,1% BSA, 2mM EDTA in 1x PBS	4°C
<b>Erythrozyten-Lyse-Puffer</b>	145mM NH <sub>4</sub> Cl, 100µM EDTA Dinatriumsalz, 12mM NaHCO <sub>3</sub> in destilliertem Wasser	pH=7,3; -20°C
<b>ELISA Coating Puffer</b>	0,1M NaHCO <sub>3</sub> in destilliertem Wasser	pH 8,2, 4°C
<b>ELISA Waschpuffer</b>	0,1% Tween20 in 1x PBS	RT
<b>ELISA Blockpuffer</b>	1% BSA in 1x PBS	4°C
<b>OPD-Substrat Puffer</b>	15,6g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O, 14,7g Tri Natriumzitat x 2H <sub>2</sub> O, in 500ml dH <sub>2</sub> O	pH=5,0 4°C
<b>TNT-Puffer</b>	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween20	pH=7,5
<b>Trypanblau</b>	0,01% Trypanblau, 0,001% Natriumazid in 1xPBS	RT
<b>Sulfitwasser</b>	10ml 1M HCl, 10ml 10% Natriumdisulfid in 200ml destilliertem Wasser	RT

### 3.9 Mäuse

Alle Mäuse wurden bis zur Durchführung der Experimente unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen im Haus für Experimentelle Therapie des Universitätsklinikums Bonn gehalten. Zur Durchführung der Experimente wurden die Tiere in die Tierställe der Institute für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie überführt.

#### Verwendete Mauslinien:

**C57BL6 Mäuse:** Durch Inzucht erzeugte Mauslinie mit dem MHC Haplotyp H2<sup>b</sup>

**CD11c-DTR/GFP Mäuse:** C57BL6 Hintergrund, CD11c<sup>+</sup> Zellen exprimieren GFP und den Diphtherietoxin-Rezeptor und sind durch die Injektion von Diphtherie-Toxin depletierbar. (126)

**CX<sub>3</sub>CR1<sup>+ /GFP</sup> und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäuse:** C57BL6 Hintergrund, CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen exprimieren GFP (104)

**OT-II Mäuse:** C57BL6 Hintergrund, CD4<sup>+</sup>T-Zellen exprimieren einen transgenen αβ-T-Zell-Rezeptor, der ein Ovalbumin-stämmiges Peptid(323-339) im Kontext von H-2-I-A<sup>b</sup> erkennt (127)

## 4 Methoden

### 4.1 Isolation primärer Zellen

#### 4.1.1 Separation von Nierenrinde und Nierenmark

Um Einzelzellsuspensionen aus Nierenmark (Medulla) und Nierenrinde (Cortex) zu erhalten, wurden die Kompartimente vor dem Verdau des Gewebes separiert. Dazu wurde die Niere in der Mitte längs zerschnitten und cortikale Bereiche an den Seiten beider Nierenhälften mit einem Skalpell abgetrennt. Anschließend wurde die Medulla aus den mittleren Fragmenten herausgetrennt. Cortex und Medulla wurden separat in Verdaumedium (RPMI 1640 mit 10%FCS, 2mM L-Glutamin, 6mg/ml Penicillin und 10mg/ml Streptomycin, 10mM, 2mg/ml Kollagenase und 100µg/ml DNase) aufgenommen.

#### 4.1.2 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus verschiedenen Geweben

Die verschiedenen Organe wurden in Verdaumedium aufgenommen und mit diesem perfundiert bzw. mit Hilfe eines Skalpells zerkleinert (siehe Tabelle). Der Verdau erfolgte bei 37°C in zwei 20-30minütigen Schritten, zwischen denen das Gewebe mit dem Stempel einer Spritze mechanisch zerkleinert wurde. Nach diesen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit Hilfe einer Pipette mechanisch vereinzelt und durch Filter mit einer Maschenweite von 100µm in Falcons überführt und gewaschen. Zum Waschen wurden die Falcons mit FACS-Puffer oder MACS-Puffer aufgefüllt und in der Heraeus Multifuge 3 S-R für 5-10min bei 1200-1500rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen zur weiteren Aufreinigung oder Analyse in adäquatem Puffer oder Medium aufgenommen.

Organ	Verdaumedium	Verdauzeit	Besonderheit
Niere	2ml	2x30min, 37°C	Perfusion mit Verdaumedium
Medulla/Cortex	Jeweils 2ml	2x30min, 37°C	Zerkleinerung mit Skalpell vor Verdau
Milz	2ml	2x20min, 37°C	Perfusion mit Verdaumedium
Lunge	2ml	2x30min, 37°C	Zerkleinerung mit Skalpell vor Verdau
Leber	3ml	2x30min, 37°C	Streichen durch Sieb zur Zerkleinerung nach Verdau
Dünndarm	2ml	2x20min, 37°C	Ausspülen mit PBS vor Verdau
Harnblase	1ml	2x20min, 37°C	Zerkleinerung mit Skalpell vor Verdau
Herz	1,5ml	2x20min, 37°C	Hyaluronidase im Verdaumedium
Lymphknoten	1ml	2x20min, 37°C	Zerkleinerung mit Skalpell vor Verdau

### **4.1.3 Erythrozyten-Lyse**

Zur Beseitigung der Erythrozyten wurden Zellen nach dem Verdau in 1ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert. Die Reaktion wurde nach 1min durch Zugabe von Puffer oder Medium abgestoppt und die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert, wie oben beschrieben. Die Erythrozyten-Lyse wurde so oft wiederholt, bis das Zell-Pellet seine rote Farbe verloren hatte.

### **4.1.4 Anreicherung von Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)**

Mit Hilfe von Eisenoxidpartikel-konjugierten Antikörpern (MicroBeads) mit Spezifität für ein oder mehrere Oberflächenmoleküle können einzelne Fraktionen aus einer Zellsuspension gewonnen werden. Die Zellsuspension wird dabei auf eine Säule aufgetragen, die sich in einem Magnetfeld befindet. Zellen, an die Antikörper mit einem Eisenpartikel gebunden haben, bleiben in der Säule hängen, während die nicht-magnetischen Zellen mit dem mobilen Trägermedium durch die Säule fließen. Wird die Säule nun aus dem Magnetfeld entfernt, können die übrigen Zellen aus der Säule gespült werden. Somit können Zellen positiv oder negativ selektioniert werden. Aufgrund der geringen Größe der Eisenoxidpartikel (ca. 50nm Durchmesser) wird die Funktion der Antikörper-gebundenen Zellen kaum beeinflusst.

#### **4.1.4.1 Gewinnung von DCs**

Zur Gewinnung von DCs aus Milz, Gesamtniere oder Cortex und Medulla der Niere wurden Einzelzellsuspensionen gewonnen, wie oben beschrieben. Die Zellen wurden in 600µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 20µl CD11c-spezifischen MicroBeads versetzt. Nach einer Inkubation für 15min bei 4°C wurden die Zellen mit 5ml MACS-Puffer gewaschen und anschließend in 5ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Separation der CD11c-positiven Zellen von den CD11c-negativen erfolgte über LS-Säulen, die im MACS-Magneten befestigt wurden. Dazu wurden die Zellsuspensionen durch einen 40µm-Filter auf die Säule aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 3ml MACS-Puffer wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die gebundenen Zellen mit 5ml MACS-Puffer eluiert. Die so aufgereinigten Zellen wurden pelletiert und in Kulturmedium resuspendiert. Für die DCs aus Medulla und Cortex wurde für gewöhnlich eine Reinheit von ca. 70% aller Zellen erreicht. Für lienale DCs wurde mittels MACS-Anreicherung eine Reinheit von  $\geq 90\%$  erreicht.

#### **4.1.4.2 Gewinnung von Ovalbumin-spezifischen OT-II Zellen**

Zur Gewinnung von Ovalbumin-spezifischen OT-II Zellen wurden  $CD4^+$  T-Zellen aus Milz und Lymphknoten durch positive oder negative Selektion isoliert. Dazu wurden Milz und Lymphknoten von OT-II Mäusen entnommen und in 10ml Kulturmedium aufgenommen. Die Organe wurden mit Hilfe des Stempels einer Spritze durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 70µm in eine Petrischale passiert und anschließend durch ein 100µm-Sieb filtriert und in ein Falcon überführt. Die Zellen wurden durch

Zentrifugation pelletiert und mit MACS-Puffer gewaschen. Im Falle der Positiv-Selektion wurden die Zellen anschließend in 600µl MACS Puffer resuspendiert und mit 20µl CD4-spezifischen MicroBeads versetzt. Nach einer Inkubation von 15min bei 4°C wurden die Zellen mit 5ml MACS-Puffer gewaschen und anschließend in 5ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Separation der CD4-positiven von den CD4-negativen Zellen erfolgte über LS-Säulen im MACS-Magneten, analog zur Aufreinigung von DCs (siehe oben). Für die Negativ-Selektion wurde das CD4<sup>+</sup> T-Zell Isolationskit der Firma Miltenyi verwendet. Dazu wurden die Milz- und Lymphknoten-Zellen in 200µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 20µl einer Mixtur Biotin-konjugierter Antikörper mit Spezifität für alle Nicht-T-Zellen versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei 4°C wurden zusätzlich 300µl MACS-Puffer und 30µl Streptavidin-Microbeads hinzugegeben. 10min später wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und auf eine equilibrierte LS-Säule im MACS-Magneten aufgetragen. Der Durchfluss der Zellsuspension sowie aus den drei folgenden Waschschritten wurde aufgefangen, gewaschen und in Zellkulturmedium resuspendiert. Die in der Säule verbleibenden Zellen wurden verworfen.

## **4.2 Durchflusszytometrie**

Moleküle auf der Zelloberfläche sowie innerhalb von Zellen können mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern sichtbar gemacht werden. So können einzelne Zellen in einem Durchflusszytometer nicht nur bezüglich ihrer Größe und Granularität, sondern auch entsprechend der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle und der Produktion von Zytokinen analysiert und charakterisiert werden.

### **4.2.1 Oberflächenfärbung**

Zur Oberflächenfärbung wurden Einzelzellsuspensionen in FACS-Röhrchen oder 96-Well-Rundboden-Platten überführt und mit der vorher austitrierten Menge spezifischer Antikörper, in FACS- oder MACS-Puffer verdünnt, versetzt. Die Färbung erfolgte in Anwesenheit von Fc-Rezeptor-spezifischen nicht-fluoreszenten Antikörpern, die Fc-vermittelte unspezifische Bindungen der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper an Rezeptoren auf der Zelloberfläche verhindern sollten. Nach einer Inkubation für 15min bei 4°C wurden die Zellen mit MACS- oder FACS-Puffer gewaschen und resuspendiert, wie oben beschrieben.

Zur Lebend-Tot-Unterscheidung wurde kurz vor der durchflusszytometrischen Analyse Hoechst33342 in einer Verdünnung von 1:20.000 zur Zellsuspension gegeben.

### **4.2.2 Intrazellulärfärbung**

Zur Analyse der Zytokinproduktion durch primäre Zellen wurden Intrazellulärfärbungen durchgeführt. Dazu wurden Primärzellen isoliert, wie oben beschrieben, und für 4h mit 1µl/ml



GolgiPlug (BD Biosciences) bei 37°C inkubiert, wodurch neu synthetisierte Zytokine nicht sezerniert werden konnten und sich innerhalb der Zellen anreicherten. Bei Experimenten, in denen T-Zellen analysiert werden sollten, erfolgte außerdem eine 4,5stündige Restimulation mit 50ng/ml PMA und 500ng/ml Ionomycin, die 30min vor Zugabe des GolgiPlugs startete. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen extrazellulär gefärbt, wie oben beschrieben, gewaschen, anschließend in 4% Formalin (Morphisto GmbH) resuspendiert und für 10min auf Eis fixiert. Nach einem erneuten Waschschriff wurden die Zellmembranen mit PermWash (BD Biosciences) für 15min bei RT permeabilisiert. Nach einem Waschschriff mit PermWash wurde die intrazelluläre Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Antikörper in der austitrierten Konzentration in PermWash zu den fixierten und permeabilisierten Zellen gegeben. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei RT wurden die Reaktionsgefäße mit PermWash aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 5min, in der nicht gebundene Antikörper aus den Zellen gespült werden sollten, wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in FACS-Puffer resuspendiert.

#### **4.2.3 Lebend-Tot-Färbung durch Annexin und Hoechst**

Im Falle der Lebend-Tot-Unterscheidung durch Annexin-Bindung in Kombination mit Hoechst erfolgte die Färbung in  $\text{Ca}^{2+}$ -reichem Annexin-Puffer. Annexin bindet an Phosphatidylcholin, das in lebenden Zellen nur auf der Innenseite der Zellmembran zu finden ist. Bei apoptotischen Zellen erscheint dieses Molekül auf der Zelloberfläche und kann an extrazellulär appliziertes Annexin binden. Unter Zuhilfenahme von fluorchrom-gekoppeltem Annexin können somit apoptotische Zellen detektiert werden. Mittels Zugabe von Hoechst, das tote Zellen, bei denen die Zellmembran zerstört ist, anfärbt, können apoptotische Zellen ( $\text{Annexin}^+\text{Hoechst}^-$ ) von nekrotischen Zellen ( $\text{Annexin}^+\text{Hoechst}^+$ ) unterschieden werden.

#### **4.2.4 Isolierung von DCs mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung**

Mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierten Zellsortierers können fluoreszenzgefärbte Zellen aus einer heterogenen Zellsuspension gewonnen werden. Die Zellsuspension wird durch einen Schlauch gesogen und dabei so verdünnt, dass die Zellen wie an einer Perlenkette aufgereiht hintereinander liegen. Am Ende des Schlauches vibriert eine Nessel mit einer Frequenz, die es erlaubt, dass sich Tropfen bilden, die statistisch gesehen eine einzelne Zelle enthalten. Diese einzelnen Zellen werden durch verschiedene Laser angeregt und emittieren, je nach gebundenen Fluorochromen, Licht einer bestimmten Wellenlänge, das von Detektoren erkannt wird. Jeder Zelle wird daraufhin eine bestimmte Ladung verliehen. In einem elektrischen Feld wird die Zelle so abgelenkt, dass sie je nach Fluoreszenz und Eigenschaft in einem Gefäß aufgefangen werden kann. Es können bis zu vier Fraktionen gleichzeitig sortiert werden. Den Vorteil gegenüber der MACS-Separation stellt eine höhere Reinheit

der sortierten Zellfraktionen dar. Nachteilig ist, dass die Vitalität und Funktion der Zellen bei der Sortierung stärker leiden als bei der MACS-Separation.

Zur Gewinnung von DCs aus Milz, Gesamtniere oder Cortex und Medulla der Niere wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt, wie oben beschrieben. Nach der Erythrozytenlyse (s.o.) wurden die Zellen gewaschen und mit CD11c-spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern in MACS-Puffer gefärbt, wie oben beschrieben. Nach der Färbung wurden die Zellen mit Kulturmedium gewaschen und in selbigem resuspendiert. Die Suspension wurde direkt vor der Sortierung durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 50µm filtriert. Die Sortierung fand unter sterilen Bedingungen bei 4°C statt.

### **4.3 Funktionelle und transkriptionelle Untersuchungen von DCs**

#### **4.3.1 In vitro Endozytose-Experimente**

Sortierte DCs aus Cortex und Medulla aus gesunden und nephritischen Mäusen wurden in Kulturmedium in einer 96-Well-Rundbodenplatte ausgesät. Soweit nicht anders vermerkt, wurden  $2 \times 10^4$  Zellen pro 200µl Medium ausplattiert. Dem Medium wurden unterschiedliche Mengen von Alexa-Fluor647-Ovalbumin (aOVA) zugesetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30min wurden die Zellen zweimal gewaschen. Dazu wurden sie durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde abgossen und die Zellen in 200µl FACS-Puffer resuspendiert. Es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt. Nach Entfernung des Überstandes wurden die DC in 100µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Aufnahme des fluoreszenzmarkierten OVAs wurde im Durchflusszytometer analysiert. Die Messungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, in Duplikaten durchgeführt.

#### **4.3.2 Antigen-Prozessierungs-Experimente**

Zur Analyse der Antigen-Prozessierung wurde zusätzlich zum aOVA, das als Maß für die Antigenaufnahme diente, DQ-OVA in die Kultur gegeben, das fluoreszent wird, sobald es gespalten wird. Die Aufreinigung der DCs und die experimentelle Durchführung erfolgten analog zum Endozytose-Experiment. Die DQ-OVA-Fluoreszenzintensität der DCs im Vergleich zur aOVA-Fluoreszenzintensität gab dabei Aufschluss über die Prozessierungs-Aktivität der DCs.

#### **4.3.3 In vivo Endozytose-Experimente**

Zur Analyse der Endozytosefähigkeit von renalen DCs in vivo wurde Mäusen fluoreszentes OVA oder 500kDa-Dextran intravenös injiziert, bevor nach 30-60min die Nieren entnommen wurden. Einzelzellsuspensionen aus Gesamtniere, Cortex und Medulla wurden gewonnen und mit spezifischen Antikörpern gefärbt, wie oben beschrieben, und durchflusszytometrisch analysiert.

#### **4.3.4 In vitro T-Zell-Aktivierungs-Experimente**

Zur Bestimmung der Fähigkeit von renalen DCs zur T-Zell-Aktivierung wurden DCs aufgereinigt, mit OVA beladen und mit OVA-spezifischen OT-II-Zellen co-kultiviert. Als Maß für die T-Zell-Aktivierung wurden Proliferation und Zytokinproduktion durch die T-Zellen analysiert.

##### **4.3.4.1 Beladung der DCs mit Ovalbumin**

DCs wurden entweder in vivo durch intravenöse Injektion von 1mg OVA 1h vor der Isolation oder ex vivo durch Inkubation mit 1mg/ml OVA in Kulturmedium für 2h bei 37°C beladen. Die Aufreinigung der DCs erfolgte entweder nach der in vivo oder vor der ex vivo Beladung mittels MACS-Separation. Die angereicherten und beladenen Zellen wurden gewaschen, in Kulturmedium resuspendiert und in 96-Well-Rundbodenplatten zur Co-Kultur mit OT-II-Zellen ausgesät.

##### **4.3.4.2 CFSE-Färbung von T-Zellen**

CFSE ist ein hydrophober Fluoreszenzfarbstoff, der passiv von Zellen aufgenommen wird und im Zytoplasma durch Esterasen gespalten wird, wodurch er an Hydrophilie gewinnt und seine Membrangängigkeit verliert. Bei einer Zellteilung wird der Farbstoff einer Zelle auf beide Tochterzellen gleichmäßig verteilt. Durch die Abnahme der Fluoreszenz bei jeder Zellteilung kann man im Durchflusszytometer bestimmen, wie viele Zellzyklen eine CFSE-gefärbte Zelle durchlaufen hat. Zur Färbung von OT-II-Zellen, deren Proliferation in vitro gemessen werden sollte, wurden  $2 \cdot 10^7$  T-Zellen in 5ml proteinfreiem PBS mit einer Konzentration von 1µM CFSE resuspendiert und für 10min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Färbung durch die Zugabe von 10ml kaltem FCS-haltigen Kulturmedium gestoppt. Die gefärbten T-Zellen wurden dreimal mit jeweils 10ml Kulturmedium gewaschen und zu den beladenen DCs gegeben.

##### **4.3.4.3 Analyse der T-Zell-Aktivierung**

OVA-beladene DCs aus Gesamtniere, Nierenrinde, Nierenmark oder Milz wurden mit CFSE-gefärbten OT-II-Zellen in einem Volumen von 200µl Kulturmedium in einer 96-Well-Rundbodenplatte co-kultiviert. Die Abnahme der Kulturüberstände erfolgte nach 24 oder 72h. Die Analyse der Zytokinkonzentrationen in den Überständen erfolgte mit Hilfe des FlowCytomix Multiplex Kits nach Herstellerangaben (s.u.). Die Proliferation wurde nach 72h durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden die Zellen gewaschen und mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, die spezifisch für den T-Zell-Rezeptor der OT-Zellen sind (antiVα2, antiVβ5), gefärbt. Die Proliferation der so identifizierbaren OT-II-Zellen wurde im Durchflusszytometer anhand der CFSE-Verdünnungen gemessen und der Divisions-Index als Maß für die T-Zell-Aktivierung mit Hilfe der FlowJo Software berechnet.

## 4.4 RNA- und Protein-Expressions-Analysemethoden

### 4.4.1 Transkriptionsanalyse

#### 4.4.1.1 RNA-Isolation

Sortierte Zellen aus Cortex und Medulla wurden pelettiert und mit 800µl Trizol überschichtet und bis zur RNA-Isolierung bei -80°C verwahrt. Für die Aufreinigung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 200µl Chloroform versetzt. Durch mehrmaliges Invertieren der Reaktionsgefäße wurden die Phasen vermischt und durch anschließende 15minütige Zentrifugation bei 12000rpm und 4°C (Centrifuge 5417R) voneinander getrennt, wobei sich die mRNA in der wässrigen oberen Phase sammelte. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1µl RNase freiem Glykogen versetzt, um das RNA-Pellet später sichtbar zu machen. Durch Zugabe von 500µl Isopropanol wurde die RNA gefällt. Dazu wurden die Gefäße erneut invertiert, für 10min bei RT inkubiert und anschließend für 15min bei 12000rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das RNA-Pellet mit 1ml 75% Ethanol gewaschen, wozu das Reaktionsgefäß gevortext und anschließend für 10min bei 10000rpm und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde restlos entfernt und die RNA in DEPC behandeltem Wasser gelöst. Mit Hilfe des Nanodrops wurde die RNA-Konzentration gemessen.

#### 4.4.1.2 Reverse Transkription

Durch reverse Transkription wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das High Capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) verwendet. Zufällig angeordnete Hexamer-Nukleotide dienen dabei als Primer für einen einzigen 120minütigen Elongationsschritt. Dadurch wird sichergestellt, dass jedes Transkript nur einmal und vollständig in cDNA umgeschrieben wird, was für eine spätere Quantifizierung nötig ist. Vor der cDNA Synthese wurde die RNA in jeder Probe auf eine Konzentration von 0,076µg/µl eingestellt.

Jede Reaktion wurde wie folgt angesetzt: 13,2µl RNA, 2µl 10xRT-PCR Puffer, 2µl RT-Primer, 0,8µl dNTPs, 1µl Reverse Transkriptase, 1µl RNase-Inhibitor.

Die cDNA-Synthese erfolgte mit folgendem Programm: Denaturierung durch initiales Erhitzen auf 110°C, Primer-Bindung für 10min bei 25°C, Elongation für 2h bei 37°C, Denaturierung für 5s bei 85°C, Abkühlen auf 8°C. Die cDNA wurde bis zur Durchführung der Real-Time-PCR bei 4°C gelagert.

#### 4.4.1.3 Real-Time-PCR

Mit Hilfe der Real-Time-PCR können Transkripte quantifiziert werden und damit Rückschlüsse auf die Expressionsstärke eines Gens gezogen werden. Dies geschieht unter Zuhilfenahme des Farbstoffes SYBR-Green, der jedem Reaktionsansatz beigemischt wird. Dieser Farbstoff emittiert Licht, wenn er in

doppelsträngige DNA interkaliert. Die Menge eines Transkripts, die proportional zur Ausgangsmenge im Reaktionsansatz ist und in jedem PCR-Zyklus verdoppelt wird, kann so in Echtzeit analysiert werden. Dazu werden für das zu analysierende Gen spezifische Primer eingesetzt und nach jedem cDNA-Elongationszyklus die Fluoreszenzintensität gemessen. Die Zyklenzahl, bei der ein bestimmter Schwellenwert überschritten wird, wird bestimmt. Durch Vergleich mit der Überschreitung des Schwellenwertes für ein sogenanntes Housekeeping-Gen in den gleichen Proben, dessen Expression in allen Zellen relativ konstant ist und mit dessen Hilfe die eingesetzte RNA-Menge normalisiert werden kann, kann die relative Expression des zu analysierenden Gens bestimmt werden. Die Messungen wurden in Triplikaten in 384-Well-Platten durchgeführt.

Jeder Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 1µl cDNA (1:5 in DEPC-Wasser vorverdünnt), 5µl 2xMastermix (enthält SYBR-Green), 0,5µl forward-Primer, 0,5µl reverse-Primer (beide Primer 1:10 in DEPC-Wasser vorverdünnt), 3µl DEPC-Wasser.

Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet: initiale Denaturierung 10min bei 95°C, dann 45 Zyklen mit Denaturierung für 15s bei 95°C und Amplifikation für 1min bei 60°C, anschließend folgte eine Schmelzkurvenanalyse.

Die relative Expression im Vergleich zum Housekeeping-Gen wurde unter der Annahme, dass die Effizienz der PCR für jedes Gen gleich ist und die Anzahl der Transkripte in jedem Elongationszyklus verdoppelt wird, berechnet. Relative Expression zum Housekeeping-Gen =  $2^{-(Ct_i - Ct_{hk})}$ ;  $Ct_i$  = Zyklus, bei der Schwellenwert für das Gen von Interesse überschritten wird;  $Ct_{hk}$  = Zyklus, bei der Schwellenwert für das Housekeeping-Gen überschritten wird.

#### **4.4.2 Zytokinmessungen mit dem FlowCytomix Kit**

Zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen im Überstand von Zell-Kulturen wurden das FlowCytomix Multiplex Th1/Th2 Kit und das FlowCytomix IL12p70 Simplex Kit (BenderMedSystems) verwendet, mit deren Hilfe Proteinmengen durchflusszytometrisch analysiert werden können. Dabei werden Beads, die mit spezifischen Antikörpern für distinkte Zytokine beschichtet sind und durch eine spezielle Größe und Fluoreszenzintensität im Allophycocyanin-Kanal charakterisiert sind, mit dem zu analysierenden Überstand sowie Biotin-konjugierten Antikörpern, spezifisch für ein jeweils anderes Epitop der zu untersuchenden Zytokine, inkubiert. Nach einem Waschschrift werden die so für 2h beladenen Beads für 1h mit Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert, das an die biotinylierten Antikörper, deren Bindung an die Beads über die zu analysierenden Zytokine vermittelt ist und somit proportional zur Zytokinkonzentration im Überstand ist, bindet. Die Fluoreszenzintensität im PE-Kanal gibt, korreliert über eine Standardreihe, somit Aufschluss über die Konzentration eines jeweiligen Zytokins im Überstand. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, jedoch wurde die Menge der

Reagenzien für jeden Ansatz halbiert. Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der FlowCytomix Pro 3.0 Software (eBiosciences).

## **4.5 Tierexperimentelle Techniken und Krankheitsmodelle**

### **4.5.1 Intraperitoneale Injektion des nephrotoxischen Serums**

Die Induktion der nephrotoxischen Nephritis erfolgte mittels intraperitonealer Injektion eines heterologen nephrotoxischen Serums (NTS) aus Schafen, die mit murinem Nierengewebe immunisiert worden waren. Die Menge des zu injizierenden Serums wurde für jede Charge austitriert und lag zwischen 15 und 30µl/g Maus. Um die Mäuse intraperitoneal zu injizieren, wurden sie mit einer Hand so gegriffen und immobilisiert, dass der untere Teil des Bauches frei lag. Die Injektion erfolgte in den unteren linken oder rechten Quadranten des Abdomens mit Hilfe einer 1ml-Spritze und einer 27G-Kanüle.

### **4.5.2 Gewinnung von Sammelurin**

Zur Gewinnung des Sammelurins wurden die Mäuse für 16h über Nacht in Stoffwechsellkäfige gesetzt. Diese Käfige sind so konstruiert, dass der gesamte Urin in einem Behältnis gesammelt wird. Mithilfe einer Pipette konnte das Volumen des Sammelurins ermittelt werden. Der Urin wurde in Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

### **4.5.3 Gewinnung von Serum**

Die Mäuse wurden durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet. Durch eine Herzpunktion mit Hilfe einer 1ml-Spritze mit 26G-Kanüle wurde Blut entnommen. Anschließend wurden die zellulären Bestandteile für 10min bei 13000rpm (Heraeus Biofuge fresco) abzentrifugiert. Das Serum, welches nach Zentrifugation als Überstand übrig blieb, wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **4.5.4 Bestimmung der Kreatininclearance**

Die Kreatininclearance dient als Maß für die glomeruläre Filtrationsrate, die eine wichtige Größe für die Abschätzung der Nierenfunktion darstellt. Kreatinin wird im Glomerulus frei filtriert, im tubulären System weder resorbiert noch metabolisiert und nur in vernachlässigbaren Mengen sezerniert. Aus diesem Grunde entspricht die ausgeschiedene Menge des Kreatinins, die sich aus der Konzentration im Urin und des über einen bestimmten Zeitraum ausgeschiedenen Urin-Volumens berechnen lässt, der filtrierten Kreatinin-Menge über diesen Zeitraum. Mit Hilfe der Serum-Kreatininkonzentration, die durch die freie Filtrierbarkeit der Kreatininkonzentration im primären Filtrat entspricht, lässt sich somit das Blutvolumen berechnen, das den glomerulären Filter in dieser

Zeit passiert hat (Glomeruläre Filtrationsrate). Die Kreatininclearance ist somit proportional zur glomerulären Filtrationsrate, die bei Schädigung der Glomeruli abnimmt.

Zur Bestimmung der Kreatininclearance bedarf es des über einen definierten Zeitraum gesammelten Urins sowie des Serums. Die Kreatinin-Konzentrationen von Urin und Serum wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums in Bonn gemessen. Die Kreatininclearance wurde anhand folgender Formel berechnet:  $C_{Cr} = (U_{Cr} * U_{Volumen}) / (S_{Cr} * t)$ ;  $C_{Cr}$ =Kreatininclearance;  $U_{Cr}$ =Kreatininkonzentration im Urin;  $U_{Volumen}$ =Urinvolumen;  $S_{Cr}$ = Kreatininkonzentration im Serum;  $X$  = Zeitraum der Unringewinnung (in min).

#### **4.5.5 Bestimmung der Albuminkonzentration des Urins mittels Sandwich-ELISA**

Zur Bestimmung der Albuminkonzentration im Urin wurde das „Mouse Albumin ELISA Quantitation Set“ der Firma Bethyl Laboratories Inc. verwendet. Die ELISA-Platten wurden mit 1:100-verdünntem anti-Maus-Albumin-Antikörper in 50µl Coating Buffer (0,1M NaHCO<sub>3</sub> (4,2g in 500ml dH<sub>2</sub>O), pH 8,2) pro Well für 1h bei Raumtemperatur (RT) beschichtet. Anschließend wurden die Platten fünfmal mit 200µl Waschpuffer (PBS + 0,1% Tween20) gewaschen und dann mit 200µl Block-Puffer (PBS + 1% BSA) für 30min bei RT inkubiert. Nachdem die Platten weitere fünfmal gewaschen wurden, wurden die in Verdünnungspuffer (Sample/Conjugate Diluent, PBS + 1% BSA + 0,1% Tween20) aufbereiteten Proben und die Standardreihe in einem Volumen von 100µl auf die Platten aufgetragen. Um im Bereich der vorgegebenen Standardreihe zu liegen, mussten die Urin-Proben 1:50000 – 1:100000 verdünnt werden. Nach einer Inkubation von 1h bei RT wurden die Platten fünfmal gewaschen und mit 100µl Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Detektionsantikörper in Verdünnungspuffer (1:35000) beladen. Nach 1h bei RT wurden die Platten abermals fünfmal gewaschen, bevor durch Zugabe eines Substrates (OPD) und Analyse der Absorption des Produktes die gebundenen Enzymmengen gemessen und mit Hilfe der Standardreihe in die entsprechenden Albuminkonzentrationen umgerechnet werden konnten. Dazu wurden 100µl der OPD-Substratlösung (1mg/ml OPD-Substrat in OPD-Substratpuffer (15,6g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O + 14,7g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> x 2H<sub>2</sub>O in 500ml dH<sub>2</sub>O, pH=5,0) + 1µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro ml) in jedes Well gegeben. Bei Eintreten eines Farbumschlages wurde die enzymatische Reaktion mit 100µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Im ELISA-Reader wurde anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 490nm gemessen.

#### **4.5.6 DC-Depletion**

Zur Depletion von DCs wurden CD11c.DTR-GFP Mäusen an Tag 7 nach NTN-Induktion intraperitoneal 4ng Diphtherie-Toxin pro g Körpergewicht injiziert, was zu einer Reduktion der renalen DCs um ca. 70% für die nächsten 48h führte.

#### **4.5.7 Knochenmark-Präparation und adoptiver Transfer**

Zur Isolation von Knochenmark für den adoptiven Zell-Transfer wurden Femur und Tibia aus CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen entnommen, von Muskeln und Sehnen befreit und an den Enden aufgeschnitten. Mit Hilfe einer 10ml Spritze und einer 27G Kanüle wurde das Knochenmark mit PBS in eine Petrischale aus den Knochen gespült. Die resuspendierten Zellen wurden anschließend durch einen 40µm-Filter in ein Falcon überführt und mit PBS für 10min bei 1200rpm gewaschen. 10<sup>7</sup> Zellen wurden anschließend intravenös in nephritische Wildtyp-Mäuse transferiert, die einen Tag zuvor immunisiert worden waren.

#### **4.5.8 Messung der Fußsohlenschwellung**

Zur Analyse der intradermalen DTH in nephritischen Mäusen wurden 9 Tage zuvor immunisierte Mäuse mit Isofluran betäubt und mit Hilfe einer Hamilton-Spritze 20µl NTS subcutan in die linke Hinterpfote gespritzt. Als Kontrolle diente die Injektion von 20µl PBS in die rechte Hinterpfote. 16h später wurde die Fußdicke beider Füße einer Maus mit Hilfe eines Dickenschnellmessers bestimmt. Die Differenz zwischen linkem und rechtem Fuß wurde als Maß für die intradermale DTH Reaktion aufgetragen.

#### **4.5.9 Milzzellkultur**

Zur Analyse der systemischen Immunantwort auf das nephrotoxische Serum wurden Einzelzellsuspensionen aus den Milzen nephritischer Mäuse gewonnen, in einer Konzentration von 10<sup>7</sup> Zellen pro ml ausgesät und mit einer Verdünnung von 1:200 NTS für 24h bei 37°C restimuliert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und Zytokinkonzentrationen mit Hilfe des FlowCytomix-Multiplex Kits bestimmt.

#### **4.5.10 Pyelonephritis-Induktion**

Uropathogene Escherichia coli vom Stamm 536 (UPEC) wurden für 5h bei 37°C mit 50µl Streptomycin (Stock 200mg/ml) pro 100ml LB-Medium im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch 10min Zentrifugation bei 1200xg geerntet und in 2ml Medium auf eine finale Konzentration von 10<sup>10</sup> Bakterien pro ml eingestellt. Weibliche Mäuse im Alter zwischen 7 und 12 Wochen wurden mit Avertin betäubt (40 mg 2,2,2-tri-Bromethanol gelöst in 1 ml 2-Methyl-2-Butanol, i.p Injektion von 10µl pro g Körpergewicht) und wurden durch transurethrale Instillation von 1 x 10<sup>9</sup> UPECs infiziert. Dazu wurde ein weicher Polyethylen-Katheter (Durchmesser 0,6mm, BD Biosystems) benutzt, der mit Instillagel (Farco Pharma) benetzt wurde. 3 Stunden später wurde diese Prozedur wiederholt. Vor der Analyse wurden die Mäuse mit sterilem PBS perfundiert.



#### **4.5.11 Bestimmung der Bakterienlast**

Die Bakterienlast in den Nieren (englisch Colony formin units = CFU) wurde durch den Ausstrich von Nierenhomogenat, das durch das Homogenisieren jeweils einer halben Niere in 500µl sterilem PBS mit Hilfe eines Ultra Turrax hergestellt worden war, bestimmt. Dazu wurden Verdünnungsreihen aus dem Homogenat hergestellt und auf CPS ID Platten (Biomerieux) in einem Volumen von jeweils 10µl ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch die ausgezählten Kolonien konnten Rückschlüsse auf die Anzahl der Bakterien in der gesamten Niere und damit die Infektionsstärke gezogen werden.

### **4.6 Histologie**

#### **4.6.1 Fixierung und Einbettung des Gewebes in Paraffin**

Nieren wurden entnommen, längs halbiert und 24h in 4% Formalin bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Organe in Einbettkassetten überführt und 4h unter laufendem kaltem Wasser gewaschen, bevor sie in 70% Ethanol überführt wurden. Im Einbettautomaten der Urologie der Uniklinik Bonn wurden die Proben über eine Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Am Mikrotom wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt.

#### **4.6.2 Periodsäure-Schiffs-Reagenz-Färbung**

Bei der Periodsäure-Schiffs-Reagenz Färbung (Periodic Acid Schiff's Reagent (PAS)) werden Glycolgruppen, die zum Beispiel in Glykogen, Mucopolysacchariden, Glykoproteinen und Glykolipiden vorhanden sind, angefärbt. Dabei werden die Glykolgruppen durch Periodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert, welche mit dem farblosen Schiff-Reagenz zu einem magentafarbenen Produkt reagieren. Die Schnitte werden mit Hämatoxylin gegengefärbt, welches die Zellkerne blau erscheinen lässt.

Veränderungen im Gewebe, die mit der Glomerulonephritis einhergehen und die in PAS-gefärbten Schnitten zu erkennen sind, sind unter anderem die Bildung von Creszenten innerhalb der Glomeruli, die durch eine kompensatorische Proliferation von Epithelzellen bei einer Schädigung der Bowman-Kapsel und der Basalmembran entstehen, die Infiltration von Leukozyten, die Bildung von Protein-Zylindern innerhalb der Tubuli, die Atrophie der Tubulus-Epithelzellen und fibrotische Veränderungen und Hyperzellularität in den Glomeruli.

Für die Färbung wurden die Gewebeschnitte (s.o.) mit Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert und in destilliertem Wasser gespült. Nach einer 15minütigen Oxidation in 0,5% Periodsäure wurden die Schnitte 10min unter fließendem Wasser gespült und anschließend 15min lang mit Schiffs-Reagenz gefärbt. Nach dreimaligem Spülen in Sulfidwasser für jeweils 2min wurden die Schnitte unter fließendem Wasser gewaschen und zur Färbung der Zellkerne für 4min in Hämatoxylin

eingelegt. Das Bläuen erfolgte in lauwarmem Leitungswasser. Anschließend wurden die Objektträger gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Xylol geklärt. Abschließend wurden die Präparate getrocknet und eingedeckt.

#### **4.6.3 Masson-Trichrom-Färbung**

Auch mit Hilfe einer Masson-Trichrom-Färbung kann der histologische Schaden in den Nieren untersucht werden. Bei dieser Färbemethode werden Farbstoffe mit unterschiedlichen Molekülgrößen nacheinander eingesetzt. Feindisperse kleine Moleküle dringen dabei leicht in alle Strukturen ein und werden im ersten Färbeschritt eingesetzt. Größere Moleküle, mit denen in den folgenden Schritten gefärbt und entfärbt wird, dringen langsamer und zuerst in grobere Strukturen ein und überfärben dabei zuvor getätigten Färbungen. Diese Technik wurde in dem Labor von Pierre-Louis Tharoux zur Analyse des glomerulären und tubulointerstitiellen Schadens durchgeführt.

Dazu wurden die Nierenschnitte zuerst mit Xylol entparaffiniert und die Zellkerne für 3min mit Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert gefärbt, unter fließendem Leitungswasser für 10-15min gespült und gebläut. Anschließend erfolge der erste Färbeschritt der Trichrom-Färbung mit Ponceau-Säurefuchsin (Goldener-Lösung I) für 5-10min. Die Schnitte wurden für 30s mit 1% Essigsäure gespült und mit Phosphorwolframsäure-Orange G (Goldner-Lösung II) differenzial-gefärbt bis zu einer Entfärbung des Bindegewebes (1-30min). Nach dem Spülen mit 1% Essigsäure für 30s wurde das entfärbte Bindegewebe mit Lichtgrün-SF oder 0,2% Anilinblau (Goldner-Lösung III) gegengefärbt. Die Nierenschnitte wurden mit 1% Essigsäure für 2-5min gewaschen, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Xylol geklärt und eingedeckt.

#### **4.6.4 Immunhistochemische Färbungen**

Die immunhistochemischen Färbungen der Paraffinschnitte wurden in dem Labor von Ulf Panzer mit MAC-2-spezifischen und CD3-spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Dazu wurden die Nierenschnitte entparaffiniert und dreimal mit destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) gewaschen. Anschließend wurden sie 15min bei 90°C in vorgewärmtem Dako-Puffer (pH 9,0) gekocht und nach 25minütigem Abkühlen wieder dreimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS+0,2% Tween für jeweils 5min wurden unspezifische Bindungsstellen mit Zytomed-Blockpuffer abgesättigt. Der Blockpuffer wurde nach 5min Inkubationszeit durch zweimaliges Waschen mit PBS+0,2% Tween entfernt, bevor der Primärantikörper (Ratte anti-Maus Mac-2 1:100000 oder Kaninchen polyklonal anti-Human CD3 1:1000) in Antikörper-Verdünnungspuffer auf die Nierenschnitte gegeben und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Färbekammer inkubiert wurde. Nachdem der ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS+0,2% Tween für jeweils 5min entfernt worden war, wurde im Falle der MAC-2 Färbung der Zweitantikörper (Kaninchen anti-Ratte 1:200) in Verdünnungspuffer auf die Nierenschnitte gegeben und für 30min bei RT inkubiert,

bevor der ungebundene Teil wieder durch dreimaliges Waschen mit PBS+0,2% Tween für jeweils 5min entfernt wurde. Im Falle der CD3-Färbung wurde kein Zweitantikörper benötigt. Anschließend wurden auf jeden Schnitt 40µl des Anti-Kaninchen-Alkalische Phosphatase (AP) Komplex gegeben und 30 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS+0,2% Tween für jeweils 5min wurden die Schnitte unter fließendem Wasser für 2min gespült. Durch Zugabe des AP-Substrats Neufuchsin für 10-15min, wurden die CD3- bzw. MAC-2 bindenden Antikörper angefärbt. Nach 2minütigem Spülen unter fließendem Wasser wurden die Zellkerne nach Böhmer für 2-3min gefärbt und anschließend unter fließendem Wasser gewaschen. Zum Differenzieren wurden die Schnitte in HCL-Alkohol (100ml 100%ETOH+ 1ml 25% HCL) getaucht, anschließend abermals mit Wasser gewaschen und mit Gummiarabikum eingedeckt.

#### **4.7 Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPadPrism der Firma GraphPad Software Inc. Zur Analyse wurden der gepaarte oder ungepaarte Student's t-Test, der one-way ANOVA in Kombination mit dem Bonferroni Vergleichstest, dem Tukey-Vergleichstest oder dem Dunnett's Vergleichstest oder nicht-parametrische Tests wie der Mann-Whitney Test oder der Wilcoxon Test angewandt. P-Werte sind in den Abbildungen dieser Arbeit wie folgt vermerkt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

## 5 Ergebnisse

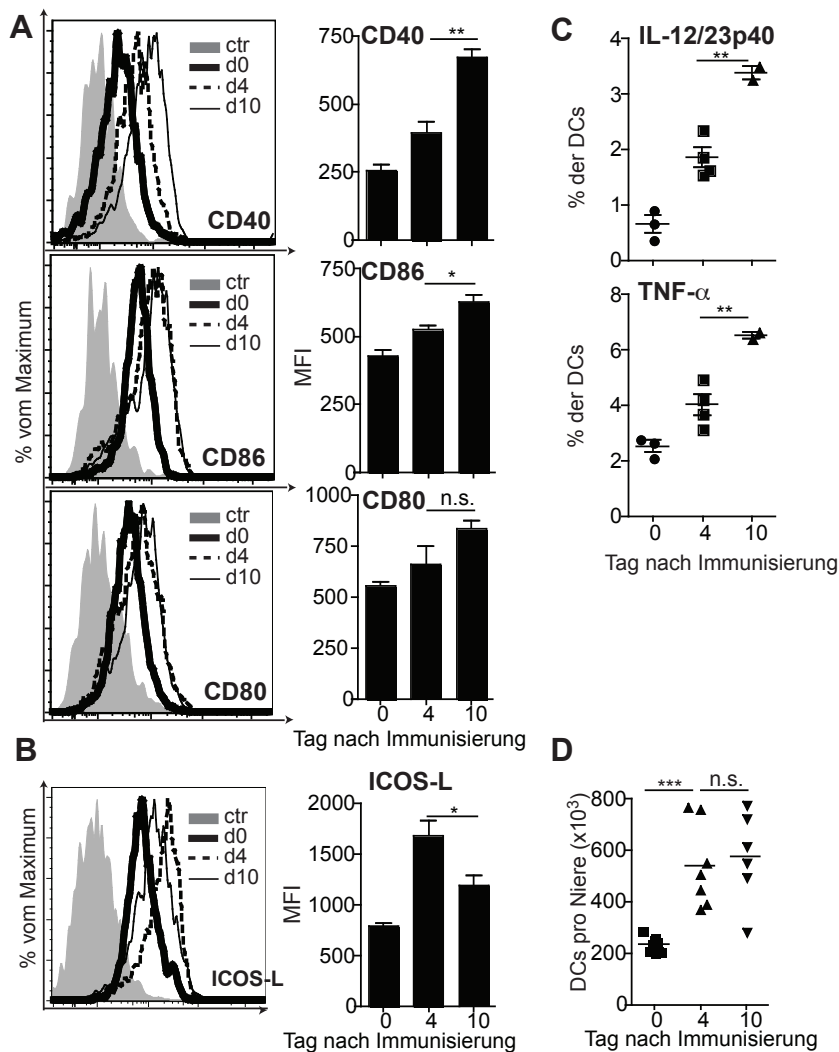
### 5.1 Renale DCs reifen im Verlauf der Glomerulonephritis

Trotz intensiver Studien zur Rolle von Dendritischen Zellen (englisch: Dendritic Cells (DCs)) bei Nierenerkrankungen, ist diese, insbesondere im Fall der Glomerulonephritiden, unvollständig geklärt (85). Während DCs essentiell für die Aufrechterhaltung periglomerulärer Infiltrate im NOH-Glomerulonephritis-Modell sind (30), scheinen sie in der nephrotoxischen Nephritis (NTN) protektiv zu wirken (65). In den beiden vorliegenden Studien wurden DCs durch Injektion von Diphtherie-Toxin in CD11c.DTR-Mäuse (DTR), die den Diphtherie-Toxin-Rezeptor selektiv auf CD11c<sup>+</sup> Zellen exprimieren, depletiert und die Krankheitsverläufe in An- und Abwesenheit von DCs miteinander verglichen. Im ersten Fall führte die DC-Depletion zur Abmilderung der Krankheit, in der zweiten Studie verschlimmerte die Depletion die Nephritis. Die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse der zwei Glomerulonephritis-Studien könnten ein Resultat der gewählten Depletions-Zeitpunkte sein. Während DCs in der erstgenannten Studie zum Zeitpunkt einer bereits etablierten Glomerulonephritis eliminiert wurden, wurden sie in der zweiten Studie direkt bei Krankheitsbeginn depletiert. Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass die DCs in der gesunden Niere und zu Beginn einer Nephritis nicht-immunogen und sogar protektiv wirken könnten, ihren Funktionszustand aber während der Krankheits-Progression ändern und pro-inflammatorische Funktionen erlangen. DCs sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen und können im aktivierten Zustand naive T-Zellen aktivieren. Für eine solche Aktivierung sind drei Signale nötig: 1) das präsentierte Antigen, das die Spezifität der aktivierten T-Zellen bestimmt, 2) Kostimulation vermittelt durch CD80 und CD86, die den T-Zellen ein Überlebenssignal senden, und 3) pro-inflammatorische Zytokine, die die Funktionalität und Art der T-Zell-Antwort bestimmen.

Um zu überprüfen, ob sich Phänotyp und Funktion renaler DCs im Verlauf der NTN ändern, wurden Einzelzellsuspensionen aus den Nieren gesunder Mäuse (Tag 0) und nephritischer Mäuse in einem frühen Stadium (Tag 4) und einem späten Stadium (Tag 10) der Nephritis gewonnen und durchflusszytometrisch analysiert. Bei der Untersuchung der Oberflächenexpression von CD40 und den Kostimulationsmolekülen CD86 und CD80 zeigte sich, dass diese Maturierungsmarker, die für die NTN essentiell sind (128, 129), mit der Nephritis-Progression auf den DCs hochreguliert wurden (Abbildung 5.1A). Ein Anstieg der Expression war sowohl in der frühen Phase als auch zwischen den Tagen 4 und 10 nach NTN-Induktion evident (Abbildung 5.1A). Das Expressionslevel des inhibitorischen Moleküls ICOS-L, das in der NTN protektiv wirkt (130), stieg zu Beginn der Nephritis stark an, reduzierte sich aber zwischen Tag 4 und Tag 10 nach NTN-Induktion signifikant (Abbildung 5.1B).

Als Nächstes wurde die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12/23 und TNF, die eine wichtige Rolle bei der NTN spielen (61, 131, 132), analysiert. Der Prozentsatz der IL-12/23p40- und TNF- $\alpha$ -produzierenden DCs erhöhte sich nach NTN-Induktion zeitabhängig (Abbildung 5.1C), während die Gesamtzahl renaler DCs nur zu Beginn der Nephritis signifikant anstieg (Abbildung 5.1D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass renale DCs im Verlauf der Nephritis reifen und besonders in der späten Phase der NTN kostimulatorische Moleküle, nicht aber das inhibitorische Molekül ICOS-L, exprimieren und pro-inflammatorische Zytokine produzieren.

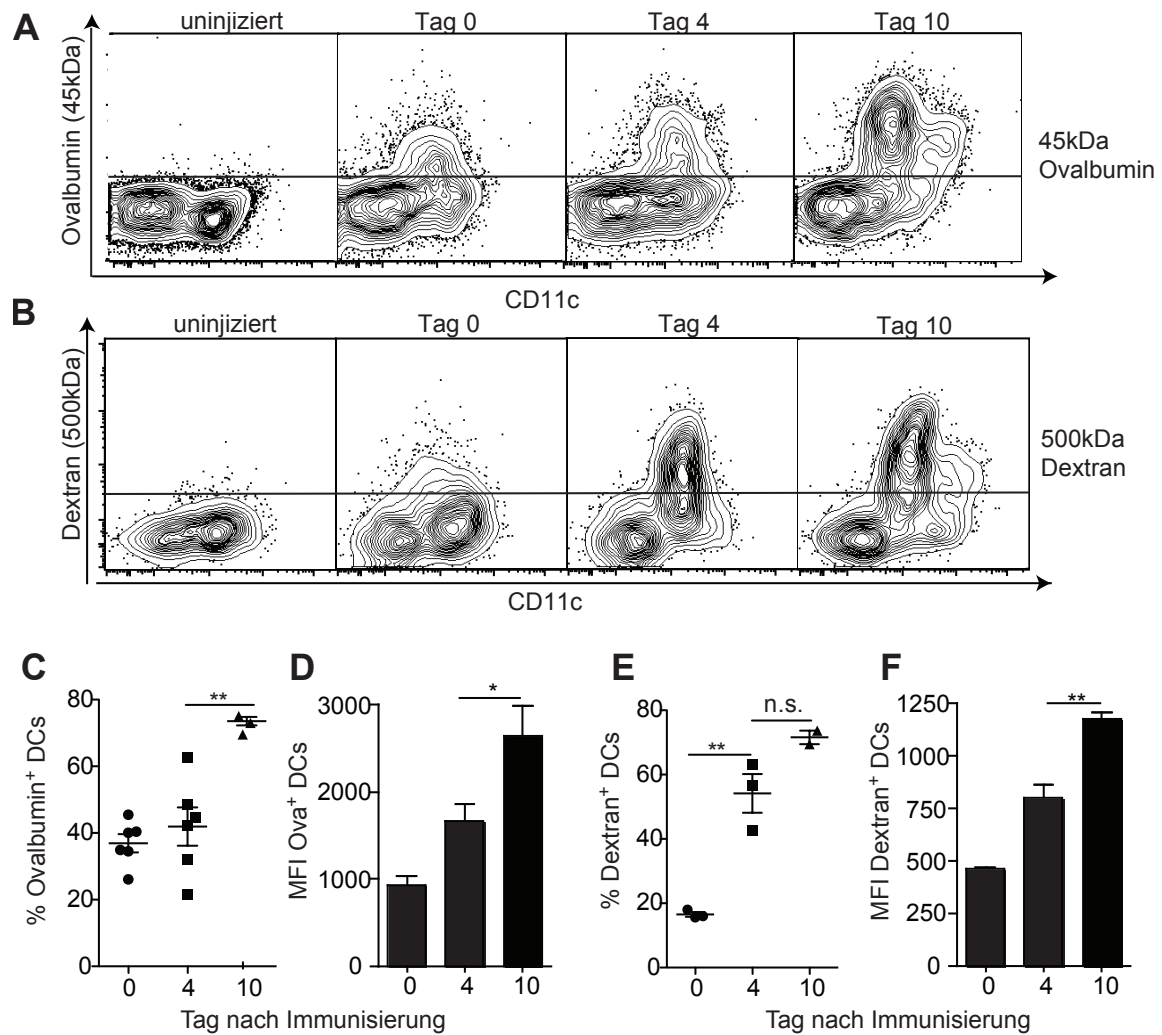


**Abbildung 5.1:** Renale DCs reifen während der NTN-Progression und produzieren pro-inflammatorische Zytokine. **(A und B)** Repräsentative Histogramme (links) und statistische Auswertung der Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity (MFI) (rechts) der durchflusszytometrischen Analyse der Expression von CD40, CD86 und CD80 (A) und ICOS-L (B) auf renalen DCs an Tag 0 (schwarze dicke Linie), 4 (gestrichelte Linie) und 10 (dünne Linie) nach Immunisierung mit nephrotoxischem Serum (NTS) im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle (grau), gegatet auf CD45<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> Zellen. **(C)** Prozentuale Anteile IL-12/23p40 (oben) und TNF- $\alpha$  (unten) produzierender DCs bezogen auf gesamte DCs an Tag 0, 4 und 10 nach Immunisierung mit NTS. **(D)** Absolute Zahlen von DCs in den Nieren von Mäusen an Tag 0, 4 und 10 nach Immunisierung mit NTS. Daten aus zwei Experimenten wurden zusammengefasst. Die Daten in A-C sind repräsentativ für drei verschiedene Experimente mit n=3-4 Mäusen. Datenpunkte (C, D) repräsentieren individuelle Mäuse. Die statistische Signifikanz wurde durch die Varianzanalyse (engl. one-way analysis of variances (one-way ANOVA)) in Kombination mit dem Tukey Vergleichstest berechnet.

## 5.2 Renale DCs nehmen in Glomerulonephritis mehr und anderes Antigen auf

Die zeitabhängige Reifung der renalen DCs während der Nephritis und ihre Produktion proinflammatorischer Zytokine deuteten auf eine Erhöhung der Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung hin. Für eine T-Zell-Aktivierung ist zusätzlich Antigen-Präsentation notwendig. Renale DCs können niedermolekulares Antigen, wie Ovalbumin (OVA, 45kDa), das konstitutiv glomerulär gefiltert wird, effizient aufnehmen (84). Mit der Schädigung des glomerulären Filters steigt dessen Durchlässigkeit, was durch einen Anstieg der Proteinurie im Laufe der NTN messbar ist (Albumin-Ausscheidung pro 16h im Stoffwechsellkäfig: gesunde Mäuse (Tag 0):  $0,1 \pm 0,05\text{mg}$ ; Tag 4:  $397,2 \pm 153,5\text{mg}$ ; Tag 10:  $1164 \pm 605,7\text{mg}$ ). Um zu testen, ob die steigende Proteinurie die Aufnahme und Präsentation von filtrierbarem Antigen beeinflusst, wurde gesunden Mäusen sowie nephritischen Mäusen an Tag 4 oder Tag 10 nach NTN-Induktion  $500\text{ng/g}$  Körpergewicht Fluoreszenz-markiertes OVA injiziert und die Antigenaufnahme nach 30min durchflusszytometrisch analysiert. Die Aufnahme von OVA durch die renalen DCs stieg sowohl prozentual als auch pro Zelle mit steigender Proteinurie (Abbildung 5.2A, C, D). An Tag 10 nach NTN-Induktion nahmen ca. 80% der renalen DCs OVA auf, im Vergleich zu ca. 40% in gesunden Mäusen und 45% in Mäusen an Tag 4 nach NTN (Abbildung 5.2C). Die Menge des aufgenommenen Antigens pro Zelle, gemessen an der Fluoreszenzintensität der  $\text{OVA}^+$  DCs, war zu diesem späten Zeitpunkt der Nephritis gegenüber dem frühen Zeitpunkt und gesunden Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 5.2D). Zusammen mit der Proteinurie steigt also auch die Antigenaufnahme durch die DCs im Verlauf der Nephritis.

Ein Schaden des glomerulären Filters führt zusätzlich zu der erhöhten Durchlässigkeit für niedermolekulare Substanzen auch zu einem Verlust der Filterfunktion für größere Moleküle. Somit können Moleküle, die größer als 45kDa sind und in gesunden Mäusen im Blut zurückgehalten werden, bei Schädigung des Filters die glomerulären Barrieren passieren und in den Primärharn und ins Nierengewebe gelangen. Um zu testen, ob renale DCs während der NTN auch solche nicht-konstitutiv filtrierten Antigene aufnehmen, wurde den Mäusen markiertes 500kDa-Dextran injiziert. 60min nach Injektion von  $10\mu\text{g/g}$  Körpergewicht Dextran wurden Einzelzellsuspensionen aus den Nieren gewonnen und analysiert. Obwohl 500kDa-Dextran in gesunden Mäusen nicht ins Nierengewebe gelangen sollte, wurde dieses große Antigen von ca. 20% der DCs in den Nieren gesunder Mäuse aufgenommen, was durch eine direkte Aufnahme aus dem Blut in den periglomerulären Kapillaren bedingt sein könnte (Abbildung 5.2E). In nephritischen Mäusen stieg der Prozentsatz Dextran<sup>+</sup> DCs an Tag 4 auf 50%, an Tag 10 auf 70% an (Abbildung 5.2B, E). Auch die Antigenaufnahme pro Zelle erhöhte sich bis zum späten Stadium der NTN (Abbildung 5.2B, F). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Antigenaufnahme durch renale DCs im Verlauf der NTN zusammen mit der Proteinurie ansteigt und renale DCs nicht nur konstitutiv-gefilterte Antigene, sondern auch große Antigene, die den glomerulären Filter in gesunden Mäusen nicht passieren können, vermehrt aufnehmen.

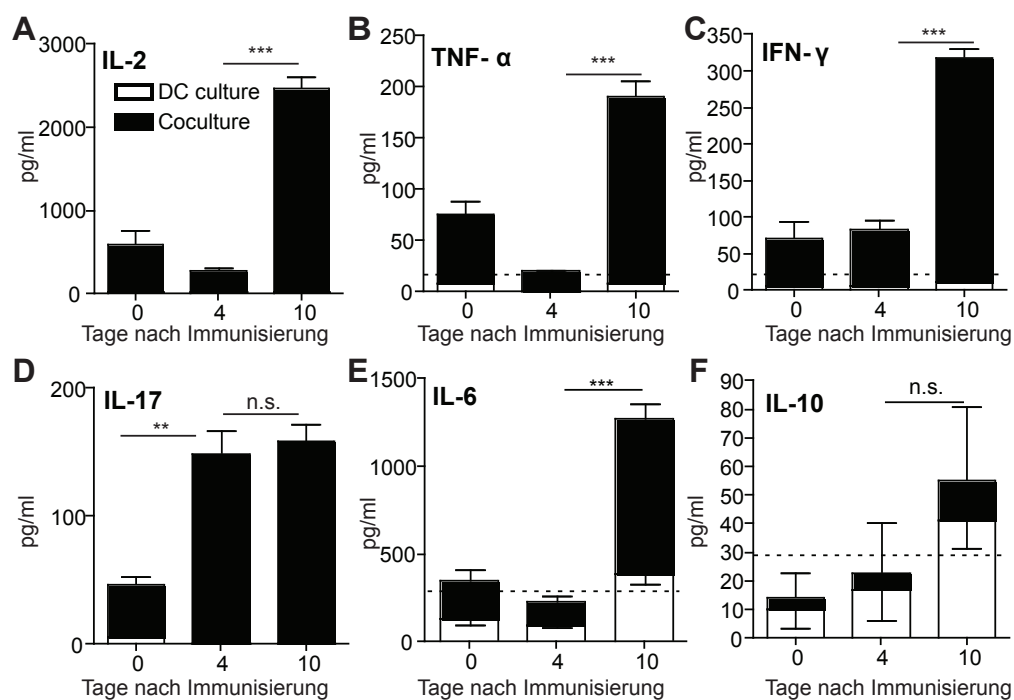


**Abbildung 5.2:** Renale DCs nehmen mit Progression der NTN vermehrt Antigene auf. **(A und B)** Repräsentative FACS-Abbildungen zur Aufnahme von fluoreszent markiertem Ovalbumin (OVA) (A) und 500kDa-Dextran (B) an den Tagen 0, 4 und 10 nach NTS-Immunisierung im Vergleich zur uninjizierten Kontrolle, gated auf CD45<sup>+</sup> Zellen. Mäusen wurde intravenös (iv) 500ng/g OVA bzw. 10µg/g 500kDa-Dextran injiziert, Organentnahme und Gewinnung von Einzelsuspensionen erfolgte 30min (A) bzw. 60min (B) nach Antigengabe. **(C)** Prozentualer Anteil der OVA<sup>+</sup> DCs bezogen auf gesamte DCs, gated auf CD45<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> Zellen aus (A), Daten aus zwei verschiedenen Experimenten sind zusammengefasst. **(D)** OVA-Aufnahme pro Zelle, gemessen als Fluoreszenzintensität der OVA<sup>+</sup> DCs. **(E)** Prozentualer Anteil der 500kDa-Dextran<sup>+</sup> DCs bezogen auf gesamte DCs, gated auf CD45<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> Zellen aus (B). **(F)** 500kDa-Dextran-Aufnahme pro Zelle, gemessen als Fluoreszenzintensität der Dextran<sup>+</sup> DCs. Die Daten sind repräsentativ für drei verschiedene Experimente mit n=3-4 Mäusen. Datenpunkte (C, E) repräsentieren individuelle Mäuse. Die statistische Signifikanz wurde durch die Varianzanalyse (engl. one-way analysis of variances (one-way ANOVA)) in Kombination mit dem Tukey Vergleichstest berechnet.

### 5.3 An Tag 10 nach Immunisierung stimulieren renal DCs CD4<sup>+</sup> T-Zelle *ex vivo*

Renale DCs aus nephritischen Mäusen in einem späten Erkrankungsstadium exprimieren höhere Levels kostimulatorischer Moleküle, produzieren mehr TNF und IL-12/23 und nehmen mehr Antigen auf, das sie präsentieren können. Um zu testen, ob dies tatsächlich Auswirkungen auf ihre Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung hat, wurden DCs aus den Nieren gesunder und nephritischer Mäuse, denen zuvor

OVA injiziert worden war, isoliert und allein oder mit OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (OT-II-Zellen) (ko-)kultiviert. Als Kontrolle für Antigen-unspezifische T-Zell-Aktivierung wurden DCs aus nephritischen Mäusen an Tag 10, denen kein OVA injiziert worden war, mit OT-II-Zellen kokultiviert (gestrichelte Linien). Nach 24h wurden die Konzentrationen von IL-2, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6 und IL-10 im Überstand mit Hilfe des Th1/Th2 Multiplex Bead Assays bestimmt. DCs aus gesunden Mäusen stimulierten nur eine geringe Produktion von IL-2 (Abbildung 5.3A), TNF (Abbildung 5.3B), IFN- $\gamma$  (Abbildung 5.3C), IL-17 (Abbildung 5.3D) und IL-6 (Abbildung 5.3E). Auch DCs aus nephritischen Mäusen im frühen Stadium der NTN (Tag 4) induzierten kaum mehr von diesen Zytokinen mit Ausnahme des Th17-Zytokins IL-17 (Abbildung 5.3D). Dagegen stimulierten OVA-beladene DCs aus nephritischen Mäusen im späten Krankheitsstadium (Tag 10) die Produktion vergleichsweise großer Mengen dieser Zytokine. Die Produktion von IL-10 war in diesen Experimenten sehr gering, erreichte kaum Werte über dem Hintergrund-Level (gestrichelte Linie) und wurde hauptsächlich durch die DCs verursacht (Abbildung 5.3F). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass renale DCs im späten Stadium der NTN, wenn sie aktiviert sind und große Mengen an Antigenen zur Verfügung haben, die Fähigkeit erlangen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren und die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in T-Zellen zu induzieren.



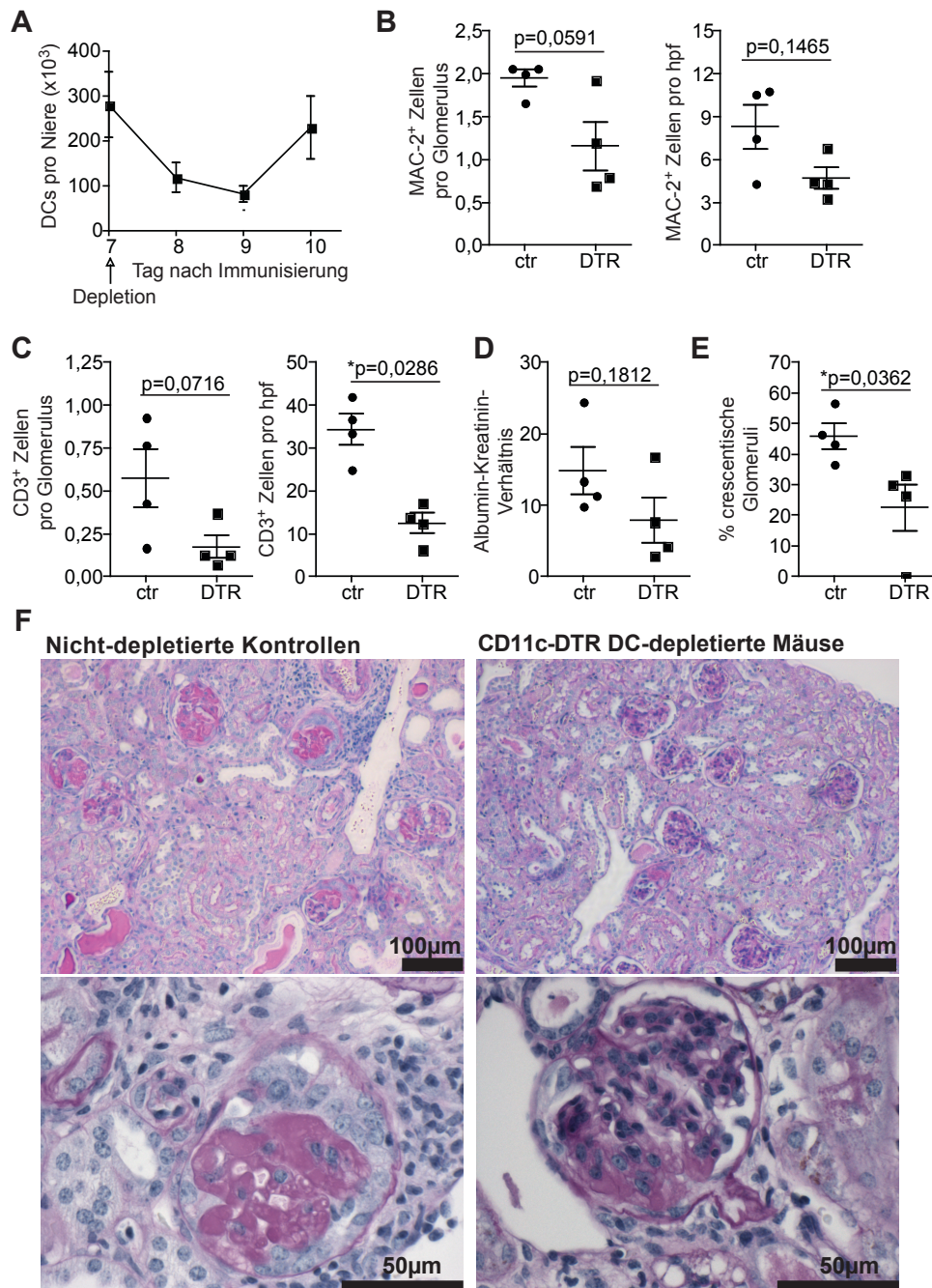
**Abbildung 5.3:** Renale DCs aus nephritischen Mäusen können an Tag 10 nach NTN-Induktion für filtrierte Antigen spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren. (A-F) Konzentrationen von IL-2 (A), TNF (B), IFN- $\gamma$  (C), IL-17 (D), IL-6 (E) und IL-10 (F) im 24h-Überstand einer (Ko-)Kultur von 10<sup>5</sup> renalen DCs isoliert von gesunden oder nephritischen Mäusen an Tag 4 oder 10 nach NTN Induktion und 60min nach Injektion von 100 $\mu$ g OVA allein (weiße Säulen) oder mit 2x10<sup>5</sup> OT-II Zellen (schwarze Säulen) in 250 $\mu$ l RPMI mit 10%FCS. Gestrichelte Linie repräsentiert Zytokin-Konzentration in einer Kokultur von OT-II-Zellen und DCs isoliert von nephritischen Mäusen, die kein OVA bekommen haben. Zytokin-Konzentrationen wurden mit Hilfe des Th1/Th2-Multiplex-Beads Assays von BenderMedSystems bestimmt. Daten sind repräsentativ für zwei individuelle Experimente mit n=3 Mäusen. Die statistische Signifikanz wurde durch die Varianzanalyse (engl. one-way analysis of variances (one-way ANOVA)) in Kombination mit dem Tukey Vergleichstest berechnet.



#### **5.4 Die Depletion von DCs an Tag 7 nach NTN-Induktion führt zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes**

Die Reifung der renalen DCs im Verlauf der Nephritis und ihre Fähigkeit, zu späten Zeitpunkten der NTN T-Zellen zu aktivieren, legte die Hypothese nahe, dass eine Depletion der DCs zu einem späten Zeitpunkt der NTN zu einer Milderung des Krankheitsbildes, wie sie auch bei der NOH-Glomerulonephritis zu beobachten ist, führen sollte. Um dies zu untersuchen, wurden CD11c.DTR-Mäuse, die den Diphtherie-Toxin-Rezeptor (DTR) CD11c-abhängig exprimieren, mit nephrotoxischem Serum (NTS) immunisiert und DCs durch Injektion von Diphtherietoxin (DT) am Tag 7 nach Immunisierung depletiert. Renale Makrophagen (MPs)- und CD4<sup>+</sup> T-Zell-Zahlen werden in diesen Mäusen nicht direkt durch die DT-Injektion beeinflusst (65). Die Injektion von DT führte zu einer Reduktion der renalen DCs um ca. 70%, die 2 Tage lang anhielt, bevor die DC-Zahlen wieder anstiegen (Abbildung 5.4A). NTN wird primär durch eine Th1-vermittelte Hypersensitivitätsreaktion (Delayed Type Hypersensitivity (DTH)) verursacht, deren Effektorzellen IFN- $\gamma$ -produzierende T-Zellen und pro-inflammatorische Mediatoren produzierende MPs sind. Die histologische Analyse der Zellinfiltration 3 Tage nach der DC-Depletion zeigte eine Verminderung der MPs (MAC-2<sup>+</sup> Zellen) in den Glomeruli und im Tubulointerstitium um ca. 40% (Abbildung 5.4B) und eine Reduktion der glomerulären und tubulointerstitiellen T-Zellen (CD3<sup>+</sup> Zellen) um ca. 65% (Abbildung 5.4C) im Vergleich zu den nicht-depletierten Kontrolltieren. Dabei erreichte allerdings nur die Reduktion der tubulointerstitiellen T-Zellen statistische Signifikanz. Proteinurie, gemessen an der Albuminkonzentration im Urin normalisiert auf die Kreatininausscheidung, war leicht, aber nicht statistisch signifikant, reduziert in den DC-depletierten Mäusen (Abbildung 5.4D). Die histologische Analyse des Nierenschadens zeigte eine signifikante Reduktion von Glomeruli mit Halbmondbildung in den DC-depletierten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 5.4E, F).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Depletion der maturierten DCs an Tag 7 nach NTN-Induktion die renalen Infiltrate von Makrophagen und T-Zellen reduziert und zu einer Verminderung des glomerulären Schadens führt. Dies deutet darauf hin, dass DCs im Verlauf der NTN einen immunogenen, krankheitsaggravierenden Phänotyp erlangen und die NTN verschlimmern.



**Abbildung 5.4:** DC-Depletion an Tag 7 nach NTN-Induktion vermindert die Nephritis. **(A)** Absolute DC-Zahlen pro Niere an den Tagen 7, 8, 9 und 1 nach NTN-Induktion (Depletion an Tag 7). **(B)** Quantifizierung MAC-2<sup>+</sup> Zellen pro Glomerulus (links) oder Hochauflösungsfeld (high power field (hpf)) im Tubulointerstitium bei 200-facher Vergrößerung in nicht-depletierten (ctr) und DC-depletierten (DTR) nephritischen CD11c.DTR-Mäusen. **(C)** Quantifizierung CD3<sup>+</sup> Zellen pro Glomerulus (links) oder hpf im Tubulointerstitium bei 200-facher Vergrößerung. **(D)** Proteinurie, gemessen als Albumin/Kreatinin-Ausscheidung in ctr und DTR Mäusen. Urin wurde für 16h in Stoffwechselkäfigen gesammelt, bevor die Mäuse an Tag 10 getötet wurden. Albuminurie wurde mit Hilfe eines Maus-Albumin-ELISAs gemessen, Kreatinin wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Bonn analysiert. **(E)** Prozentualer Anteil der crescentische Glomeruli. **(F)** Repräsentative PAS-gefärbte Nierenschnitte aus nicht-depletierten Kontrolltieren (links) und DC-depletierten Mäusen (rechts) an Tag 10 nach NTN-Induktion und Tag 3 nach DC-Depletion, in zwei verschiedenen Vergrößerungen. Daten sind repräsentativ für zwei Experimente mit n=4 Mäusen, Datenpunkte (B-D) repräsentieren individuelle Mäuse, Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet. Die Histologie (B, C, E, F) wurde angefertigt und blind ausgewertet von Prof. Dr. Ulf Panzer in Hamburg.

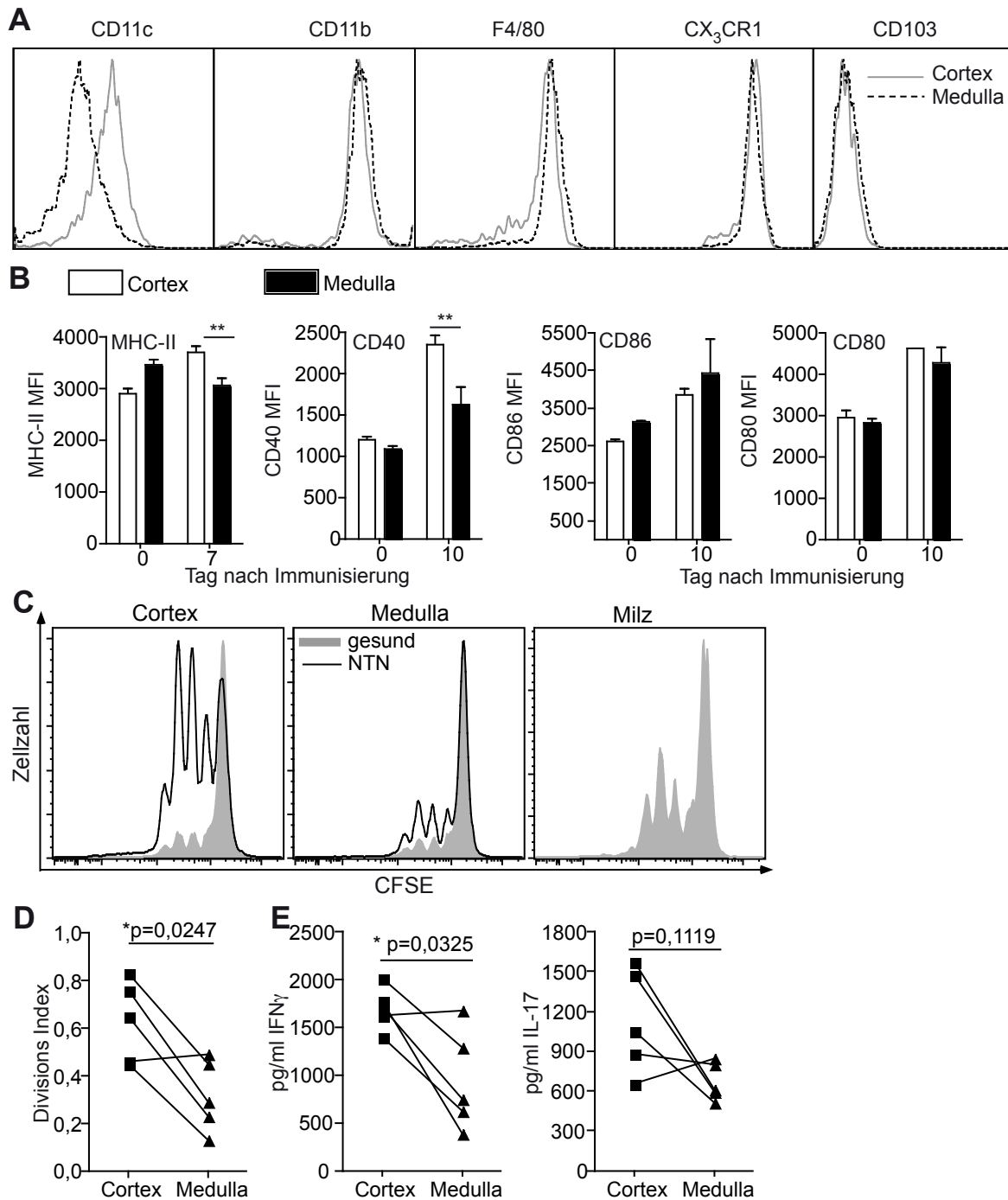
## 5.5 Cortikale, aber nicht medulläre DCs aus nephritischen Mäusen stimulieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro*

Der initiale Nierenschaden bei der Glomerulonephritis findet in der Glomeruli der Nierenrinde (Cortex) statt und breitet sich von dort auf die gesamte Niere aus. Cortikale DCs befinden sich in unmittelbarer Nähe der Glomeruli, was die Vermutung nahe legt, dass diese Zellen besonders relevant für die NTN sind. Um cortikale und medulläre DCs separat zu untersuchen, wurde eine Technik entwickelt, die es erlaubt, Nierenrinde (Cortex) und -mark (Medulla) getrennt voneinander durchflusszytometrisch zu analysieren. Dazu wurden cortikale und medulläre Bereiche makroskopisch mit Hilfe eines Skalpells voneinander getrennt bevor das Gewebe verdaut und Einzelzellsuspensionen gewonnen wurden. Zuerst wurde der Phänotyp von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) in der Nierenrinde und im Nierenmark von gesunden CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen verglichen. Diese Mäuse exprimieren Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) in CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen, was die Identifikation der renalen APCs, die zum Großteil CX<sub>3</sub>CR1 exprimieren (76), erleichtert. Für die Untersuchung wurden Einzelzellsuspensionen aus Cortex und Medulla von gesunden CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen gewonnen und durchflusszytometrisch analysiert. Cortikale und medulläre GFP<sup>+</sup> Zellen exprimierten gleiche Levels von CD11b, F4/80 und CX<sub>3</sub>CR1 und kein CD103 (Abbildung 5.5A). CD11c wurde verstärkt auf cortikalen CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen exprimiert (Abbildung 5.5A).

Die Analyse der Aktivierungsmarker auf DCs aus der Nierenrinde und dem Nierenmark in gesunden Mäusen zeigte eine hohe Variabilität zwischen unterschiedlichen Experimenten und ergab keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 5.5B). Auch in nephritischen Mäusen variierten die Ergebnisse, jedoch zeigten 3 von 5 Experimenten eine signifikant höhere Expression von MHC-II und CD40 auf cortikalen DCs im Vergleich zu medullären DCs an Tag 7 bzw. 10 nach NTN-Induktion (Abbildung 5.5B).

Um die Fähigkeit von cortikalen und medullären DCs, T-Zellen zu aktivieren, zu vergleichen, wurden DCs aus Nierenrinde und Nierenmark von gesunden und nephritischen Mäusen isoliert, *ex vivo* mit 1mg/ml OVA beladen und mit OT-II-Zellen kokultiviert. Nach 3 Tagen wurden die T-Zell-Proliferation sowie die Zytokinkonzentrationen in den Überständen gemessen. Cortikale und medulläre DCs aus gesunden Nieren stimulierten eine sehr schwache Proliferation im Vergleich zu DCs aus der Milz, die als Kontrolle dienten (Abbildung 5.5C). Auch medulläre DCs aus nephritischen Mäusen induzierten nur wenig Proliferation und eine geringe Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-17 (Abbildung 5.5C-E). Dahingegen proliferierten OT-II-Zellen in der Kokultur mit cortikalen DCs stark und produzierten vergleichsweise große Mengen IFN- $\gamma$  und IL-17.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die T-Zell-Stimulation während der Glomerulonephritis hauptsächlich von cortikalen DCs abhängt und daher cortikale und nicht medulläre DCs die NTN-Progression vorantreiben.



**Abbildung 5.5:** Cortikale, aber nicht medulläre DCs aus nephritischen Mäusen können CD4<sup>+</sup> T-Zellen stimulieren. **(A)** Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse von cortikalen (grau durchgezogen) und medullären (schwarz gestrichelt) GFP<sup>+</sup> Zellen aus gesunden CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen zeigen eine geringere CD11c Expression auf medullären APCs, aber vergleichbare Expressionslevels von CD11b, F4/80, CX<sub>3</sub>CR1 und CD103. **(B)** Expression gemessen durch Fluoreszenzintensität (MFI) von MHC-II, CD40, CD86 und CD80 auf cortikalen (weiß) und medullären (schwarz) DCs in gesunden (Tag 0) und nephritischen (Tag 7 oder 10) Mäusen. **(C)** Repräsentative Proliferationsprofile von 1,5x10<sup>5</sup> OT-II-Zellen in einer 72h-Kokultur mit 2x10<sup>4</sup> cortikalen (links), medullären (Mitte) oder lienalen (rechts) DCs aus gesunden (grau gefüllt) oder nephritischen (schwarze Linie) Mäusen, die vor der Kultur *ex vivo* 2h mit 1mg/ml OVA beladen wurden. **(D)** Divisions-Indizes aus der Kokultur in (C). **(E)** IFN- $\gamma$  (links) und IL-17 (rechts) Konzentrationen im Überstand der Kokultur in (C). Daten sind repräsentativ für drei individuelle Experimente mit n=3-5 Mäusen. Datenpunkte in D und E repräsentieren individuelle Mäuse, zusammengehörige Datenpunkte (Cortex und Medulla einer Maus) sind durch Linien miteinander verbunden. Statistische Signifikanz wurde mit dem gepaarten Student's t-test berechnet.

## 5.6 Medulläre DCs prozessieren Antigen weniger effizient

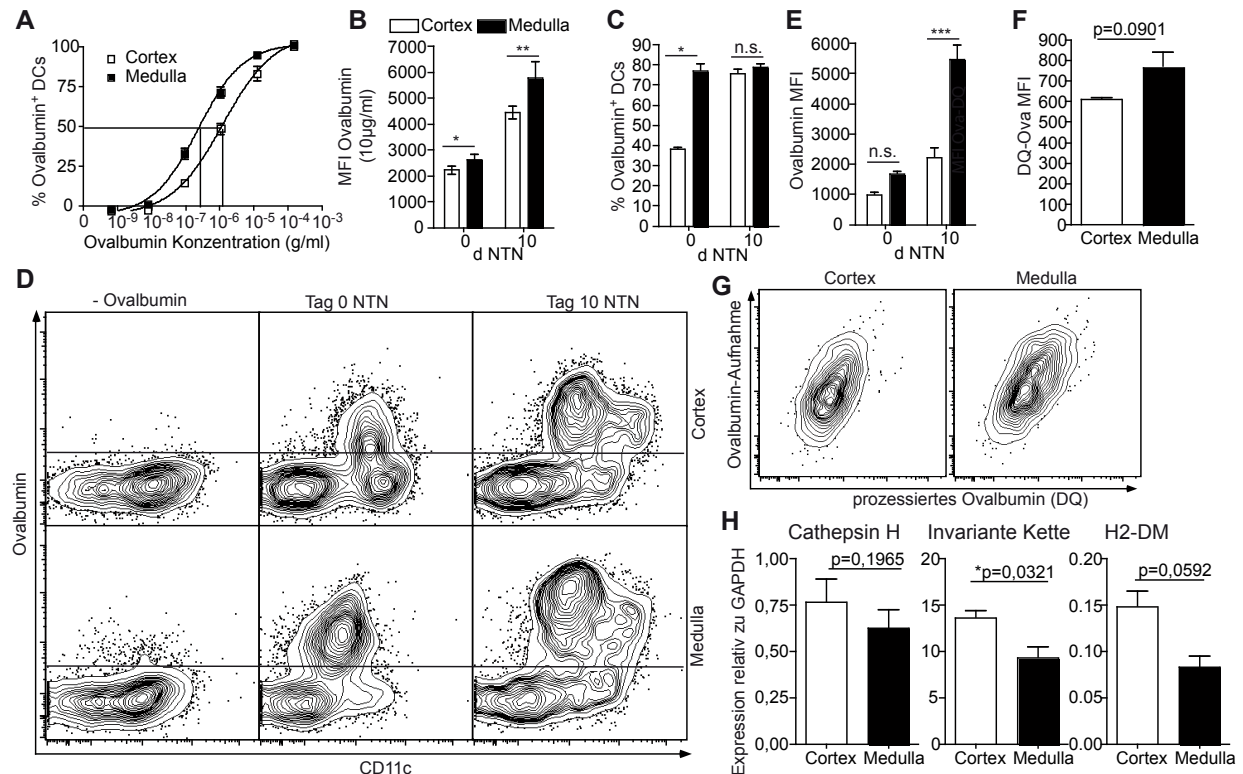
Um zu untersuchen, warum cortikale, nicht aber medulläre DCs aus nephritischen Mäusen T-Zellen *ex vivo* stimulieren können, obwohl die Maturierung der medullären DCs nur wenig schwächer als die der cortikalen DCs war (Abbildung 5.5B), wurde zuerst das Überleben der DCs aus den verschiedenen Nierenkompartimenten *ex vivo* untersucht. Vergleichbare Anteile der kultivierten DCs aus Nierenrinde und Nierenmark überlebten 24h Kulturzeit (cortikale DCs:  $55,4 \pm 0,7\%$ , medulläre DCs  $58,5 \pm 2,4\%$ ), was einen selektiven Zelltod der medullären DCs als Grund für die fehlende T-Zell-Stimulation ausschließt.

Als Nächstes wurde die Antigenaufnahme durch cortikale und medulläre DCs untersucht, um zu überprüfen, ob eine geringere endozytotische Aktivität der medullären DCs das Phänomen erklären könnte. Dazu wurden DCs aus Nierenrinde und Nierenmark sortiert, mit verschiedenen Konzentrationen Fluoreszenz-markierten OVAs kultiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Interessanterweise nahmen DCs aus dem Nierenmark gesunder und nephritischer Mäuse aber sogar etwas mehr Antigen auf als DCs aus der Nierenrinde (Abbildung 5.6A, B). Auch *in vivo* überstieg die Antigenaufnahme durch die medullären DCs die durch die cortikalen DCs sowohl in gesunden als auch in nephritischen Mäusen (Abbildung 5.6C, D, E).

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass medulläre DCs das aufgenommene Antigen nicht effizient für dessen Präsentation prozessieren und in dieser Hinsicht eher wie MPs funktionieren, die mehr Antigen als DCs aufnehmen, es aber degradieren, bevor es präsentiert wird. Um dies zu testen, wurden sortierte DCs aus Nierenrinde und –mark mit OVA-DQ inkubiert, das Fluoreszenz erlangt, sobald es gespalten wird. Zur Normalisierung auf die OVA-Aufnahme wurde zu der Zellkultur außerdem OVA hinzugegeben, das fluoreszent ist, unabhängig davon, ob es gespalten wird oder nicht. Die OVA-DQ-Fluoreszenzintensität der medullären DCs war 30min nach OVA-Zugabe gegenüber der der cortikalen DCs leicht erhöht, was ein Hinweis auf vermehrt prozessiertes OVA ist (Abbildung 5.6F). Allerdings korrelierte die Fluoreszenz des prozessierten OVAs mit der Fluoreszenzintensität des insgesamt aufgenommenen OVAs, was zeigt, dass die medullären DCs nicht die hohe Prozessierungsaktivität von MP aufweisen, sondern aufgrund ihrer höheren Endozytoseaktivität mehr OVA zur Prozessierung zur Verfügung haben (Abbildung 5.6G).

Medulläre DCs können also T-Zellen in geringerem Maße aktivieren als cortikale DCs, obwohl sie mehr Antigen aufnehmen und prozessieren. Um diesen scheinbaren Widerspruch zu erklären, wurde die Expression von verschiedenen an der Antigen-Prozessierung und MHC-II-Beladung beteiligten Moleküle in cortikalen und medullären DCs aus nephritischen Mäusen mittels RT-PCR analysiert. Dabei zeigte sich, dass zwar das Degradations-Enzym Cathepsin H nicht differentiell exprimiert wurde, die Invariante Kette und H2-DM, die beide an der MHC-II-Beladung beteiligt sind, aber verstärkt in cortikalen DCs transkribiert wurden.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass medulläre DCs in geringerem Maße als cortikale DCs dazu in der Lage sind, prozessiertes Antigen auf MHC-II-Moleküle zur Präsentation an CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu laden. Dies könnte zusammen mit einer leicht reduzierten Maturierung gegenüber cortikalen DCs in der NTN der Grund für die geringere Fähigkeit der medullären DCs zur T-Zell-Aktivierung sein.

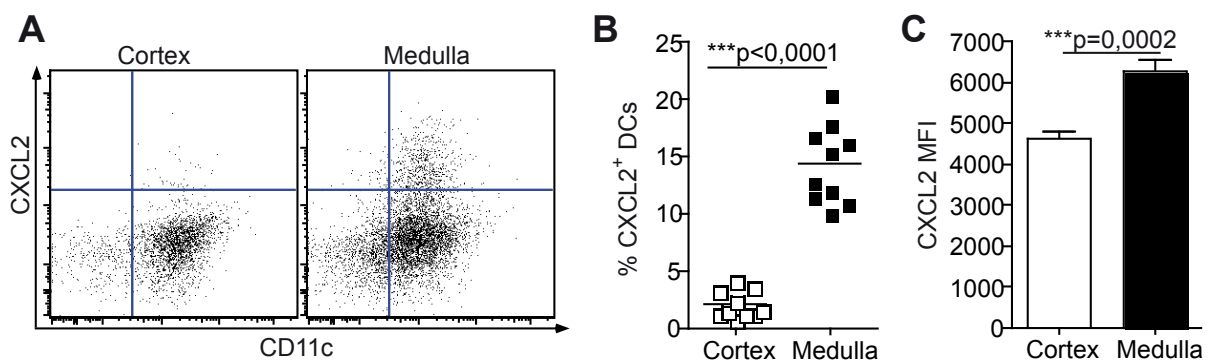


**Abbildung 5.6:** Medulläre DCs prozessieren Antigenen weniger effizient für T-Zell-Aktivierung. **(A)** *In vitro* Aufnahme von fluoreszentem OVA durch sortierte cortikale und medulläre DCs. Cortikale und medulläre DCs aus gesunden Mäusen wurden sortiert, für 20min mit verschiedenen OVA-Konzentrationen kultiviert und der Anteil der OVA<sup>+</sup> DCs durchflusszytometrisch analysiert. **(B)** *In vitro* Antigenaufnahme pro Zelle, gemessen durch MFI. Cortikale und medulläre DCs aus gesunden (Tag 0) und nephritischen Mäusen (Tag 10) wurden sortiert und für 30min mit 10µg/ml OVA kultiviert. **(C-E)** *In vivo* Antigenaufnahme durch cortikale und medulläre DCs in gesunden und nephritischen Mäusen 30min nach Injektion von 1µg/g OVA, Prozentsatz von OVA<sup>+</sup> DCs (C), repräsentative FACS-Abbildungen der OVA-Aufnahme durch cortikale (oben) und medulläre (unten) DCs (D) und Antigenaufnahme pro Zelle (E) in cortikalen (weiß) und medullären (schwarz) DCs. **(F)** Fluoreszenzintensität (MFI) von magnetisch sortierten OVA<sup>+</sup> cortikalen und medullären DCs aus nephritischen Mäusen (Tag 7) nach 20min Inkubation mit 200µg/ml DQ-OVA. **(G)** Repräsentative FACS-Abbildungen zeigen, dass die Spaltung von DQ-OVA mit der endozytierten Menge von Alexa647-OVA in cortikalen (links) und medullären (rechts) DCs aus nephritischen Mäusen (Tag 7) nach 3h Inkubation mit 25µg/ml DQ-OVA und Alexa647-OVA gleich stark korreliert. **(H)** mRNA-Expression von Cathepsin H, Invarianter Kette und H2-DM in sortierten cortikalen und medullären DCs aus nephritischen Mäusen (Tag 7), normalisiert auf GAPDH-mRNA-Expression. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2-3 Experimente mit 3-5 Mäusen. Die statistische Signifikanz wurde mit dem one-way ANOVA in Kombination mit dem Bonferroni-Vergleichstest (B, C, E) oder dem gepaarten Student's t-test berechnet.

## 5.7 Medulläre DCs regulieren innate Immunität in der Niere

Die fehlende Fähigkeit der medullären DCs T-Zellen zu aktivieren warf die Frage auf, welche physiologische Rolle diese Zellen spielen. Da uropathogene *E.coli* (UPEC) durch die Sammelrohre im Nierenmark aufsteigen, ist die Lokalisation der medullären DCs geeignet für die Ausübung der Wächterfunktion, die Nieren-DCs bei der Pyelonephritis durch die Produktion des Chemokins CXCL2 und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Neutrophile) leisten (32). Um die CXCL2-Produktion der cortikalen und medullären DCs zu untersuchen, wurden Mäuse zweimal im Abstand von 3h transurethral mit UPEC infiziert. 3h nach der zweiten Infektion wurden Einzelzellsuspensionen aus Medulla und Cortex gewonnen, für 4h mit Brefeldin A inkubiert und anschließend intrazellulär mit CXCL2-spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Tatsächlich produzierten medulläre DCs mehr CXCL2, das Neutrophile zur Bekämpfung von Bakterien in die Niere lockt (Abbildung 5.7 A, B, C). Sowohl der prozentuale Anteil der CXCL2<sup>+</sup> DCs (Abbildung 5.7B) als auch die CXCL2-Produktion pro Zelle (Abbildung 5.7C) waren im Nierenmark deutlich höher als in der Nierenrinde. MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> MPs in Medulla und Cortex produzierten kaum CXCL2 (Abbildung 5.7A).

Diese Ergebnisse zeigen, dass medulläre, aber nicht cortikale DCs der Überwachung des Nierengewebes und der unmittelbaren Produktion von CXCL2 zur Neutrophilen-Rekrutierung bei der Pyelonephritis dienen. Cortikale und medulläre DCs spielen demnach distinkte und spezialisierte Rollen bei der Glomerulonephritis und der Pyelonephritis.



**Abbildung 5.7:** Medulläre DCs regulieren die innate Immunantwort in Pyelonephritis. **(A)** Repräsentative FACS-Bilder der CXCL2-Produktion durch cortikale (links) und medulläre DCs 3h nach der Pyelonephritis-Induktion, gegatet auf CD45<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup> Zellen. Mäuse wurden zweimal im Abstand von 3h transurethral mit UPECs infiziert. 3h nach der zweiten Infektion wurden Einzelzellsuspensionen aus Cortex und Medulla gewonnen, 4h mit Brefeldin A bei 37°C inkubiert, mit CXCL2-spezifischen Antikörpern intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **(B)** Prozentualer Anteil CXCL2<sup>+</sup> DCs bezogen auf gesamte DCs. **(C)** CXCL2-Produktion pro DC, gemessen als Fluoreszenzintensität CXCL2<sup>+</sup> Zellen. Daten sind repräsentativ für zwei individuelle Experimente mit 5-6 Mäusen pro Gruppe. Datenpunkte repräsentieren einzelne Nieren, statistische Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

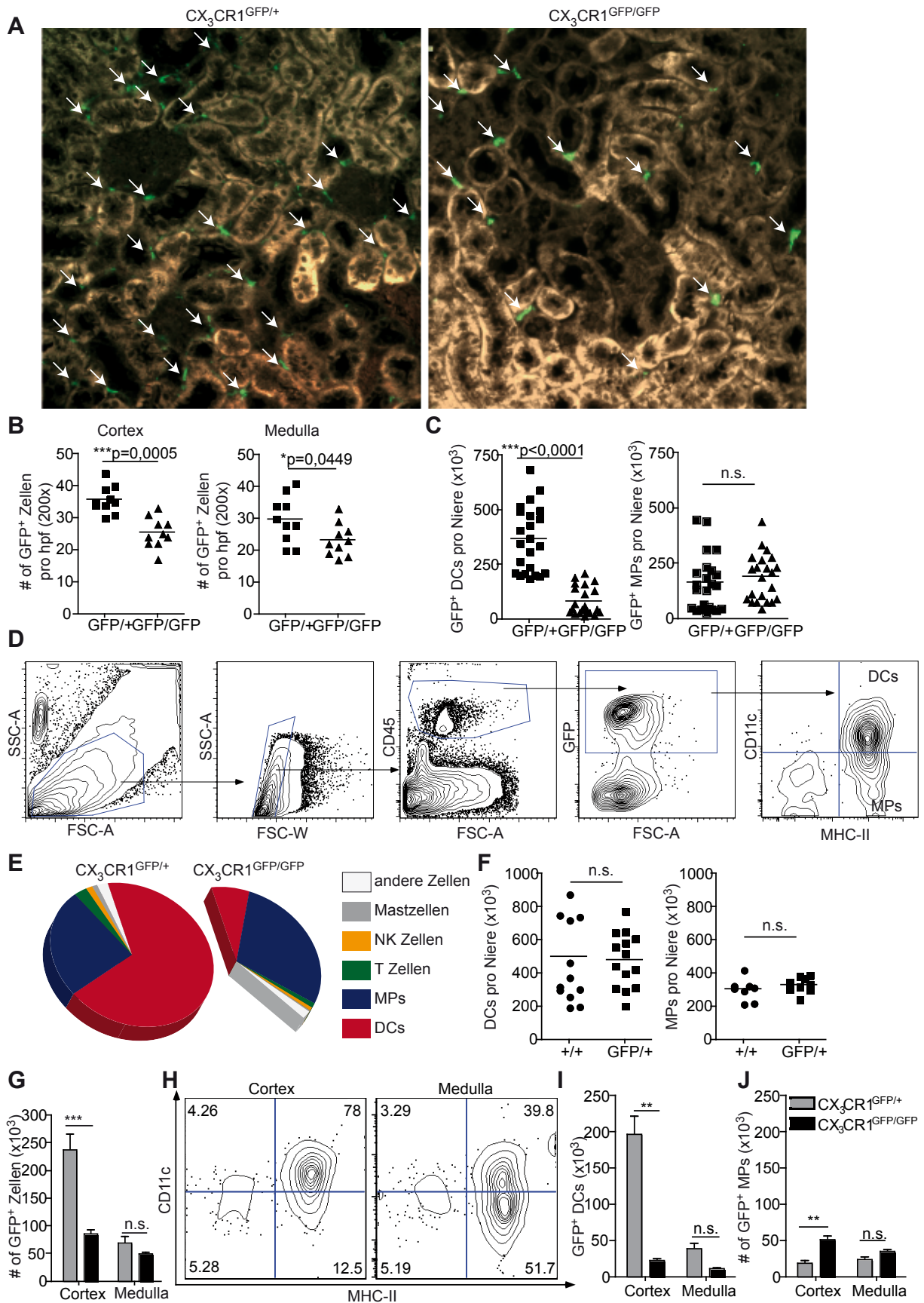
## 5.8 CX<sub>3</sub>CR1 ist essentiell für die homöostatische DC-Kolonisation der Niere

CX<sub>3</sub>CR1 wird von einem Großteil der renalen DCs exprimiert (76), doch die funktionale Rolle des Rezeptors ist nicht vollständig geklärt. Um zu testen, ob der Rezeptor für die Besiedlung der Nieren durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) notwendig ist, wurden Nierenschnitte von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen, die Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) in CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen exprimieren, und von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen, die GFP in diesen Zellen exprimieren und CX<sub>3</sub>CR1-defizient sind, verglichen. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten eine deutliche Reduktion GFP<sup>+</sup> Zellen (weiße Pfeile) in den Nieren der CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäuse (Abbildung 5.8A), die besonders in den cortikalen Bereichen der Nieren ausgeprägt war (Abbildung 5.8B). Die durchflusszytometrische Charakterisierung (Gating Strategie in Abbildung 5.8D) dieser GFP<sup>+</sup> Zellen in der gesamten Niere ergab, dass die Verminderung der Zellen durch eine selektive Reduktion der CD11c<sup>+</sup> DCs bedingt war, während CD11c<sup>-</sup> Makrophagen (MP) sogar leicht, aber nicht signifikant erhöht waren (Abbildung 5.8C). Andere GFP<sup>+</sup> Zellen in der Niere, die CX<sub>3</sub>CR1 auf niedrigen Niveaus exprimieren, wie z.B. geringe Anteile der renalen T-Zellen, NK-Zellen und Mastzellen, waren verglichen mit DCs in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen kaum verringert (Abbildung 5.8E). Ein Vergleich zwischen nicht-transgenen Mäusen (Wildtyp (wt)) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen ergab keine Unterschiede bezüglich der Anzahl von DCs und MPs (Abbildung 5.8F), was darauf hindeutet, dass die CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäuse geeignete Kontrollen darstellen.

Eine anschließende separate durchflusszytometrische Analyse von Cortex und Medulla bestätigte eine Reduktion der GFP<sup>+</sup> Zellen vor allem in cortikalen Bereichen (Abbildung 5.8G). Die Nierenrinde von CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten Mäusen enthielt dreimal mehr GFP<sup>+</sup> Zellen als das Nierenmark (Abbildung 5.8G). Von diesen GFP<sup>+</sup> Zellen exprimierten im Cortex ca. 80%, in der Medulla ca. 40% CD11c (Abbildung 5.8H). Demnach umfasste der Cortex sechsmal mehr DCs als die Medulla (Abbildung 5.8I). In den CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen waren die DCs im Cortex neunfach reduziert, während die DCs in der Medulla vierfach, aber nicht statistisch signifikant verringert waren (Abbildung 5.8I). Die Zahl der MPs war im Cortex von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen 1,5-fach erhöht (Abbildung 5.8J).

Diese Ergebnisse zeigen, dass CX<sub>3</sub>CR1 für die homöostatische Besiedlung der Nieren durch DCs, besonders in der Nierenrinde, notwendig ist.





**Abbildung 5.8:** CX<sub>3</sub>CR1 ist notwendig für die homöostatische DC-Besiedlung der Niere. **(A)** Repräsentative Fluoreszenz-mikroskopische Bilder von Nierenschnitten aus CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (links) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (rechts) Mäusen, die weißen Pfeile deuten auf die GFP<sup>+</sup> Zellen. **(B)** Quantifizierung der GFP<sup>+</sup> Zellen in cortikalen (links) und medullären (rechts) Bereichen in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (GFP/+) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (GFP/GFP) Mäusen als GFP<sup>+</sup> Zellen pro

Hochauflösungsfeld (hpf) bei 200-facher Vergrößerung. **(C)** Durchflusszytometrische Quantifizierung von GFP<sup>+</sup> DCs und MPs. Daten aus 5 verschiedenen Experimenten mit 4-5 Mäusen pro Gruppe wurden zusammengeführt. **(D)** Repräsentative Gating-Strategie, von links nach rechts: Ausschluss von Zelltrümmern, Ausschluss von Dupletten, CD45<sup>+</sup> Leukozyten, GFP<sup>+</sup> Zellen, Auftrennung in MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DCs und MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> MPs. **(E)** Proportionale Anteile von DCs, MPs, T-Zellen, NK-Zellen, Mastzellen und anderen Zellen in GFP<sup>+</sup> Zellen in den Nieren von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen (links) und verbleibende Populationen in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen (rechts, normalisiert auf Zellzahlen in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen). **(F)** Quantifizierung von DCs und MPs in nicht-transgenen wt-Mäusen (+/+) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen (GFP/+), Ergebnisse aus drei Experimenten mit 3-5 Mäusen sind kombiniert. **(G)** Durchflusszytometrische Quantifizierung der GFP<sup>+</sup> Zellen in Cortex und Medulla von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (grau) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (schwarz) Mäusen. **(H)** Repräsentative FACS-Abbildung von CD45<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Zellen in Cortex (rechts) und Medulla (links) von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen. **(I)** Absolute Zahlen GFP<sup>+</sup> DCs in Cortex und Medulla jeweils einer Niere von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (grau) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (schwarz) Mäusen. **(J)** Absolute Zahlen GFP<sup>+</sup> DCs in Cortex und Medulla jeweils einer Niere von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (grau) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (schwarz) Mäusen. Niedrigere DC- und MP-Zahlen in den Abbildungen I und J in Vergleich zu D sind durch ein geringeres Alter der Mäuse erklärbar. Die Daten (G-J) sind repräsentativ für 2-3 Experimente mit 3-4 Mäusen, Datenpunkte (D, F) repräsentieren einzelne Mäuse, die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-Test (B), dem ungepaarten Student's t-test (C) und dem one-way ANOVA in Kombination mit dem Bonferroni-Vergleichstest (E, G, H) berechnet. Die Fluoreszenzmikroskopie (A und B) wurde durchgeführt und ausgewertet von Torsten Krause.

## 5.9 CX<sub>3</sub>CR1 beeinflusst die Infiltration von DCs und MPs in der NTN

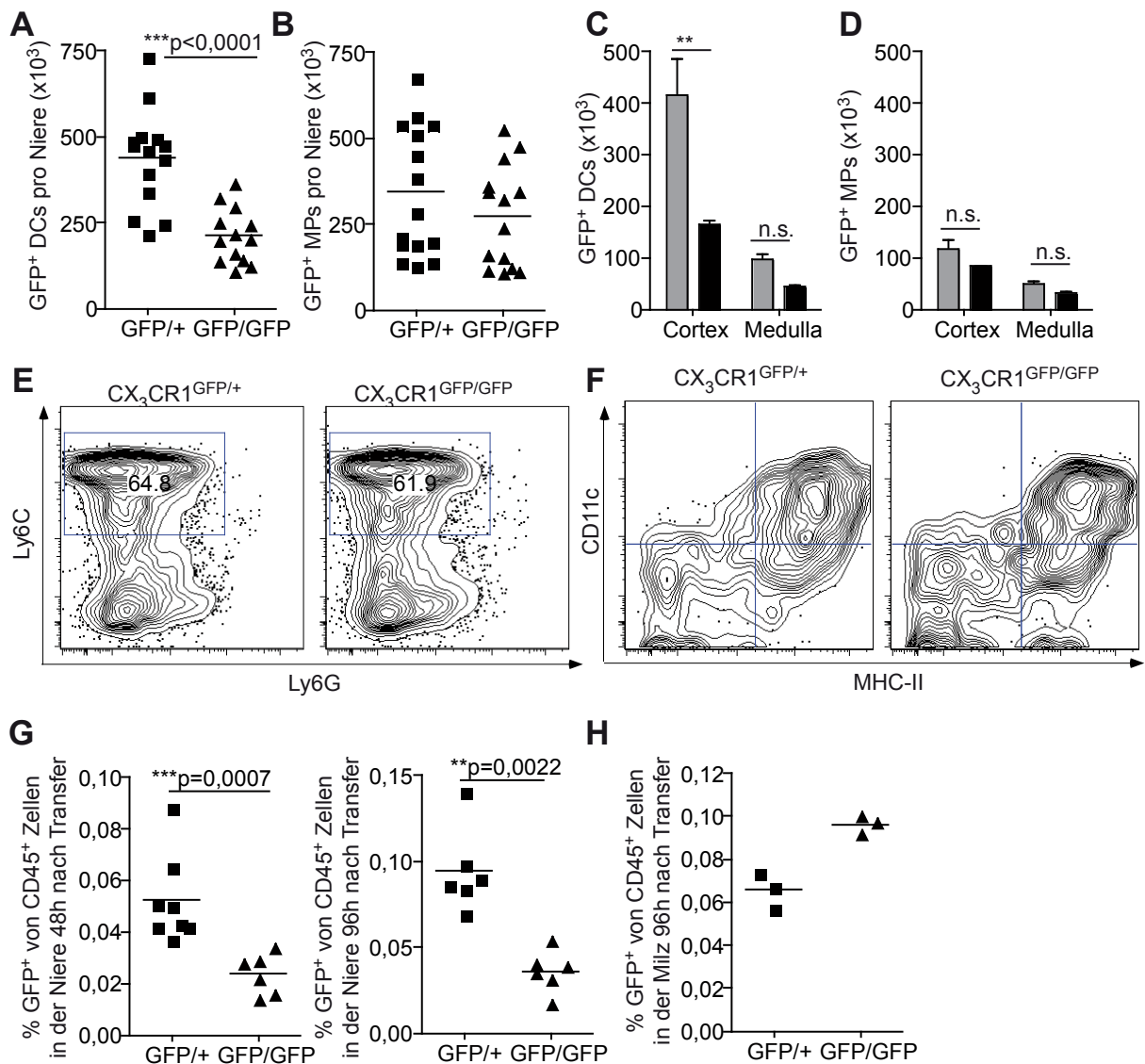
Um zu untersuchen, ob renale DCs auch in der Inflammation von CX<sub>3</sub>CR1 abhängig sind, wurde NTN in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen induziert und DC- und MP-Zahlen an Tag 10 nach Immunisierung durchflusszytometrisch bestimmt. Auch in nephritischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen war die Anzahl der GFP<sup>+</sup> DCs deutlich gegenüber den Kontrollen reduziert (Abbildung 5.9A). MPs waren leicht, wenn auch nicht statistisch signifikant, reduziert (Abbildung 5.9B).

Die Reduktion der DCs war auch in nephritischen Mäusen in der Nierenrinde, zumindest in absoluten Zahlen, stärker ausgeprägt als im Nierenmark (CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> vs. CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup>: Nierenrinde 416x10<sup>3</sup> vs. 164x10<sup>3</sup>, Nierenmark 96x10<sup>3</sup> vs. 44x10<sup>3</sup>) (Abbildung 5.9C). MPs waren sowohl im Cortex als auch in der Medulla nephritischer CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäuse leicht, aber nicht statistisch signifikant, reduziert (Abbildung 5.9D). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl cortikale als auch medulläre DCs in nephritischen CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen reduziert sind. Die CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz beeinflusst also nicht nur die DC-Kolonisation der homöostatischen Niere, sondern führt ebenso zu verminderten Zahlen von DCs in der NTN.

Die reduzierte DC-Zahl in nephritischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen kann eine Konsequenz der verminderten DC-Zahl unter homöostatischen Bedingungen sein (Abbildung 5.8D) oder aber zusätzlich aus einer verminderten Rekrutierung von DC-Vorläufern in der Inflammation resultieren. Um zu überprüfen, ob DC-Vorläufer CX<sub>3</sub>CR1-abhängig in die entzündete Niere rekrutiert werden, wurden Wildtyp-Mäuse mit NTS immunisiert und 24h später 10<sup>6</sup> GFP<sup>+</sup> Knochenmarkzellen aus CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> oder CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen transferiert. Mehr als 60% dieser GFP<sup>+</sup> Knochenmarkzellen exprimierten den inflammatorischen Monozytenmarker Ly6C (Abbildung 5.9E). 48 und 96h nach adoptivem Transfer

wurde der Influx GFP<sup>+</sup> Zellen in die Nieren der nephritischen Wildtyp Mäuse untersucht. GFP<sup>+</sup> DCs, charakterisiert durch MHC-II und CD11c Expression, konnten in den entzündeten Nieren der wt Mäuse detektiert werden, unabhängig davon, ob sie Knochenmark von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> oder CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen transferiert bekommen hatten (Abbildung 5.9F). Die Anzahl der GFP<sup>+</sup> CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Zellen in den Nieren war jedoch zu beiden Zeitpunkten signifikant verringert gegenüber den GFP<sup>+</sup> CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten Zellen (Abbildung 5.9G). In der Milz zeigte sich ein entgegengesetztes Bild. Dieses Organ wurde präferenziell von CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Zellen infiltriert (Abbildung 5.9H), was durch eine Umverteilung der Zellen, die schlechter in die Niere einwandern können, erklärbar sein könnte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass CX<sub>3</sub>CR1 nicht nur für die homöostatische DC-Kolonisation der Nieren wichtig ist, sondern auch zur Rekrutierung von inflammatorischen DC-Vorläufern während der NTN beiträgt.



**Abbildung 5.9:** Infiltration von DCs und MPs in der NTN wird durch CX<sub>3</sub>CR1 reguliert. **(A und B)** Durchflusszytometrische Quantifizierung von GFP<sup>+</sup> DCs **(A)** und MPs **(B)** in gesamten Nieren in nephritischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (GFP/+) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (GFP/GFP) Mäusen an Tag 10 nach NTN-Induktion. **(C und D)** Durchflusszytometrische Quantifizierung von GFP<sup>+</sup> DCs **(C)** und MPs **(D)** in Cortex und Medulla von nephritischen

CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (grau) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (schwarz) Mäusen an Tag 10 nach NTN-Induktion. **(E)** Ly6C Expression auf GFP<sup>+</sup> Knochenmark-Zellen von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen vor dem Transfer in nephritische Wildtyp (wt) Mäuse. **(F)** Repräsentative FACS Abbildungen der CD11c und MHC-II Expression auf GFP<sup>+</sup> Zellen, die aus den Nieren nephritischer wt Mäuse gewonnen wurden, die 96h zuvor 10<sup>6</sup> GFP<sup>+</sup> Knochenmarkzellen von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (links) oder CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (rechts) Mäuse transferiert bekommen hatten. **(G)** Proportion GFP<sup>+</sup> Zellen in CD45<sup>+</sup> Zellen in den Nieren nephritischer wt Mäuse 48 und 96h nach dem Transfer von 10<sup>6</sup> GFP<sup>+</sup> Knochenmarkzellen von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (GFP/+) oder CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (GFP/GFP) Mäusen. **(H)** Proportion GFP<sup>+</sup> Zellen in CD45<sup>+</sup> Zellen in der Milz nephritischer wt Mäuse 96h nach dem Transfer von 10<sup>6</sup> GFP<sup>+</sup> Knochenmarkzellen von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (GFP/+) oder CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (GFP/GFP) Mäusen. Die Datenpunkte repräsentieren individuelle Mäuse (A, B, H) bzw. Nieren (G). Die Daten sind repräsentativ für zwei bis drei individuelle Experimente mit 3-4 Mäusen pro Gruppe, statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten Student's t-test (A,B) oder dem one-way ANOVA in Kombination mit dem Bonferroni-Vergleichstest (C,D) oder dem Mann-Whitney-Test (G) berechnet.

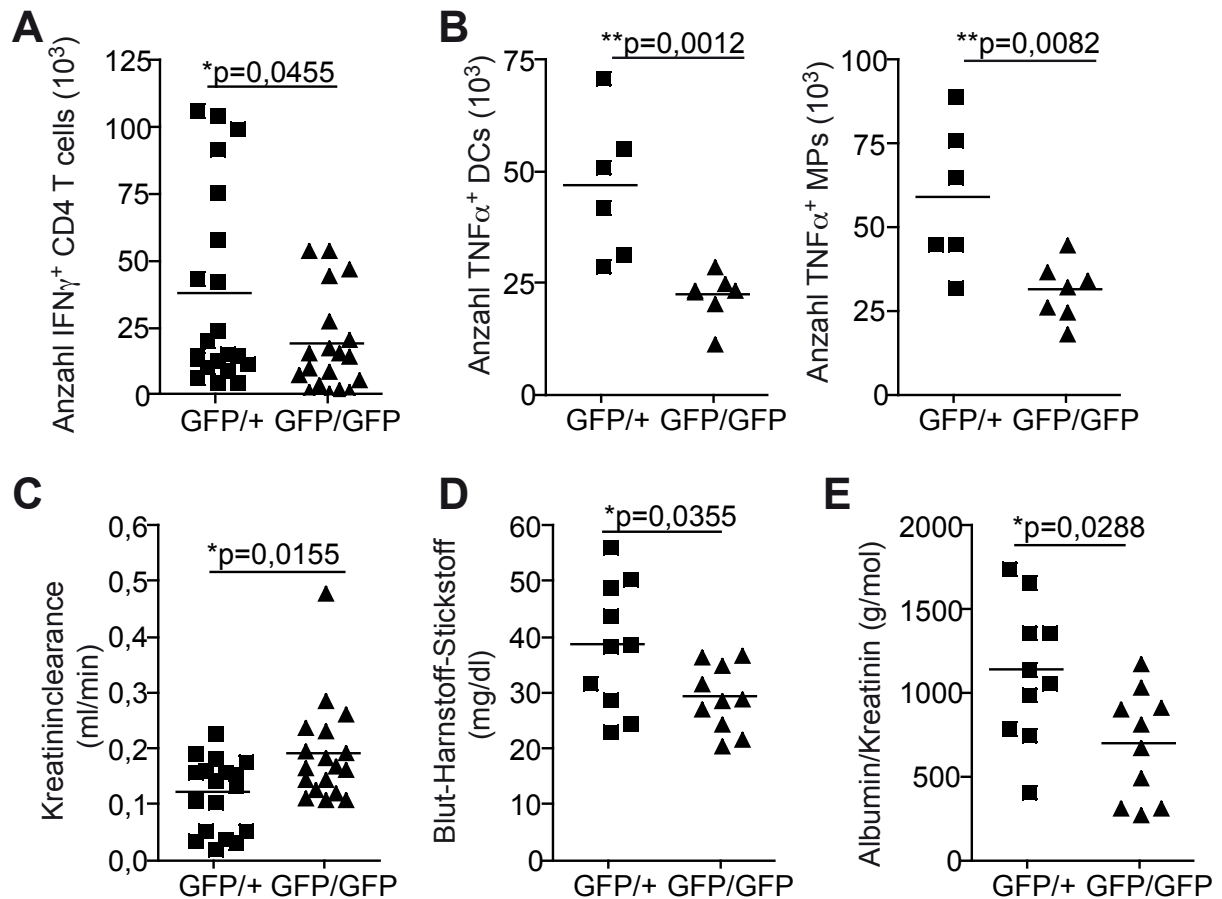
### 5.10 Das Krankheitsbild der Glomerulonephritis ist milder in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen

Da reife DCs die intrarenale DTH Reaktion stimulieren und damit die Nephritis aggravierend (Abbildung 5.4), legte die Reduktion der renalen DCs in nephritischen CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen (Abbildung 5.9) die Vermutung nahe, dass die DTH und damit die NTN in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen vermindert sein könnte. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Pierre-Louis Tharaux in Paris wurde diese Hypothese getestet. Dazu wurden CX<sub>3</sub>CR1-kompetente und -defiziente Mäuse mit NTS immunisiert und deren Nieren anschließend durchflusszytometrisch, funktional und histologisch untersucht.

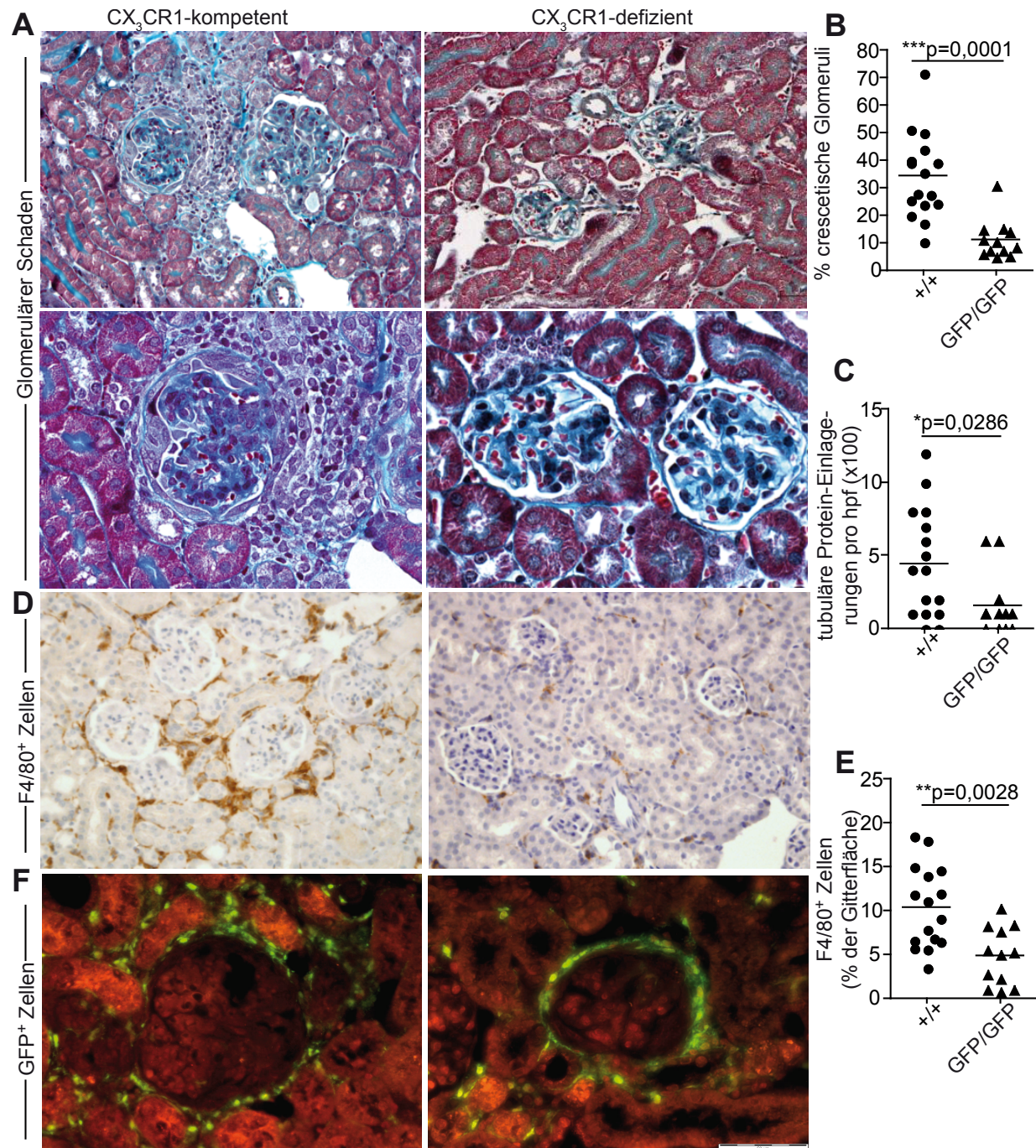
Tatsächlich zeigte die durchflusszytometrische Analyse der Nieren von CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten und -defizienten Mäusen an Tag 10 nach NTN Induktion eine verringerte Anzahl von IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>T-Zellen (Abbildung 5.10A) und TNF<sup>+</sup> DCs und MPs (Abbildung 5.10B) in den Nieren der CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Tiere, was auf eine mildere DTH-Reaktion hinweist. Auch Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktion wie Kreatininclearance, Blut-Harnstoff-Stickstoff und Proteinurie waren zu diesem Zeitpunkt in den CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant verbessert (Abbildung 5.10C-E).

Histologische Untersuchungen des Nierenschadens in CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten und -defizienten Mäusen zeigten geringere glomeruläre und tubuläre Schäden in den CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen an Tag 10 (Daten nicht gezeigt) und noch ausgeprägter an Tag 15 nach NTN Induktion (Abbildung 5.11A-C). In den CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen waren außerdem weniger peri-glomeruläre F4/80<sup>+</sup> Zellen zu finden, was auf eine Reduktion von DCs und/oder MPs hinweist (Abbildung 5.11D, E). Trotz reduzierter Anzahl konnten GFP<sup>+</sup> Zellen peri-glomeruläre Infiltrate bilden, was zeigt, dass CX<sub>3</sub>CR1 nicht für intrarenale APC-Migration zu entzündeten Glomeruli notwendig ist (Abbildung 5.11F).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz die Glomerulonephritis mildert und CX<sub>3</sub>CR1 ein potentielles Ziel der Glomerulonephritis-Therapie darstellen könnte.



**Abbildung 5.10:** CX<sub>3</sub>CR1-defizienz reduziert intrarenale DTH-Reaktionen und verbessert die Nierenfunktion in NTN. **(A und B)** Anzahl der IFN-g produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen **(A)** und der TNF-a produzierenden DCs und MPs **(B)** in den Nieren nephritischer CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (GFP/+) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (GFP/GFP) Mäuse an Tag 10 nach NTN-Induktion. **(C)** Kreatinin clearance in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (GFP/+) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (GFP/GFP) Mäusen an Tag 10 nach NTN-Induktion. **(D)** Blut-Harnstoff-Stickstoff in CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten (+/+) und -defizienten (GFP/GFP) Mäusen an Tag 15 nach NTN-Induktion. **(E)** Albuminausscheidung normalisiert auf Kreatininkonzentration im Urin in CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten (+/+) und -defizienten (GFP/GFP) Mäusen an den Tagen 4 und 9 nach NTN-Induktion. Daten sind repräsentativ für zwei bis drei Experimente mit 2-4 (A, B, C) oder 12-16 (D,E) Mäusen pro Gruppe. Datenpunkte repräsentieren individuelle Mäuse. Statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten Student's t-test (A, B), dem Mann-Whitney-Test (C, D) oder dem one-way ANOVA in Kombination mit dem Bonferroni-Vergleichstest berechnet.



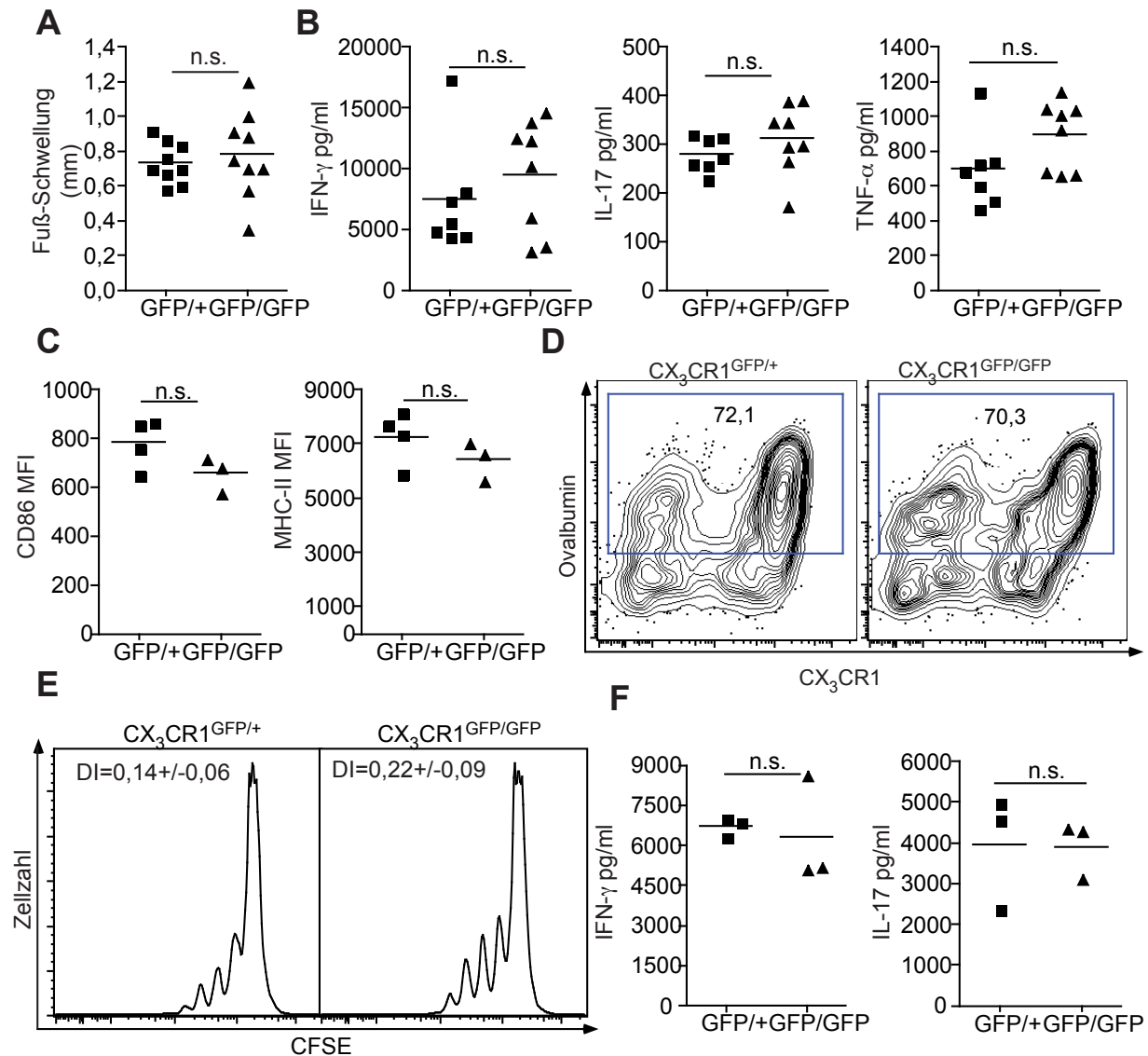
**Abbildung 5.11:** Die NTN ist in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen verringert. **(A)** Repräsentative Histologien (Masson Trichrom-Färbung, 200-fache Vergrößerung (oben) und 400-fache Vergrößerung (unten)) in CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten (+/+) und -defizienten (GFP/GFP) Mäusen an Tag 15 nach NTN-Induktion. **(B und C)** Quantifizierung der crescentischen Glomeruli **(B)** und der tubulären Protein-Einlagerungen **(C)** in CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten (+/+) und -defizienten (GFP/GFP) Mäusen an Tag 15 nach NTN-Induktion. **(D und E)** Repräsentative immunzytochemische Färbungen von F4/80<sup>+</sup> Zellen **(D)** und Quantifizierung der F4/80<sup>+</sup> Zellen **(E)** in den Nieren nephritischer CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen an Tag 15 nach NTN-Induktion. **(F)** Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Nieren aus nephritischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen an Tag 10 nach NTN-Induktion (rot=Autofluoreszenz, grün=GFP-Signal). Die Datenpunkte repräsentieren individuelle Mäuse, die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-Test berechnet. Histologische und immunzytochemische Färbungen und die Quantifizierung des Nierenschadens (A-E) wurden von Pierre-Louis Tharoux in Paris durchgeführt. Die Fotografien in F wurden von Torsten Krause aufgenommen.

### 5.11 Zell-intrinsische DC-Funktionen sind nicht abhängig von CX<sub>3</sub>CR1

Um zu testen, ob die verminderte NTN nur durch eine Reduktion der DC-Zahlen oder auch durch eine Beeinträchtigung der DC-Funktionen zustande kommt, wurde zunächst die systemische Immunreaktion auf das NTS untersucht. Dazu wurden mit NTS immunisierte CX<sub>3</sub>CR1-kompetente und -defiziente Mäuse an Tag 10 mit 20µl NTS, das subcutan in die linke Fußsohle injiziert wurde, restimuliert. Nach 12 Stunden wurde mit einem Dickenschnellmesser die Schwellung des Fußes im Vergleich zum mit PBS injizierten rechten Fuß gemessen. Die Fußschwellung als Maß für die intradermale DTH-Reaktion unterschied sich nicht zwischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen (Abbildung 5.12A). Auch die Produktion der Th1 und Th17-Zytokine IFN-γ, TNF-α und IL-17 unterschied sich nicht in Milzzellkulturen von immunisierten CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen (Abbildung 5.12B). Diese Ergebnisse schließen aus, dass die systemische Reaktion auf die Immunisierung mit NTS durch die CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz beeinträchtigt wurde und dies der Grund für eine schwächere DTH-Reaktion in der Niere war.

Als Nächstes wurden die renalen DCs bezüglich ihrer Maturierung, Antigenaufnahme und Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation analysiert. GFP<sup>+</sup> DCs aus nephritischen CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten und -defizienten Mäusen exprimierten gleiche Levels von CD86 und MHC-II, was zeigt, dass die Reifung der DCs durch die CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz nicht beeinträchtigt ist (Abbildung 5.12C). Auch die Aufnahme von Fluoreszenz-markiertem OVA war durch die CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz nicht verändert (Abbildung 5.12D). Zudem konnten OVA-beladene DCs aus nephritischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen OT-II-Zellen in einer Kokultur gleich gut zur Proliferation (Abbildung 5.12E) und zur Produktion von IFN-γ und IL-17 (Abbildung 5.12F) anregen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die zellintrinsische Funktion der renalen DCs durch die CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz nicht beeinträchtigt ist, und weisen darauf hin, dass die Reduktion der intrarenalen DTH-Reaktion und die Verbesserung der Nephritis auf die verringerten DC-Zahlen zurückzuführen sind.

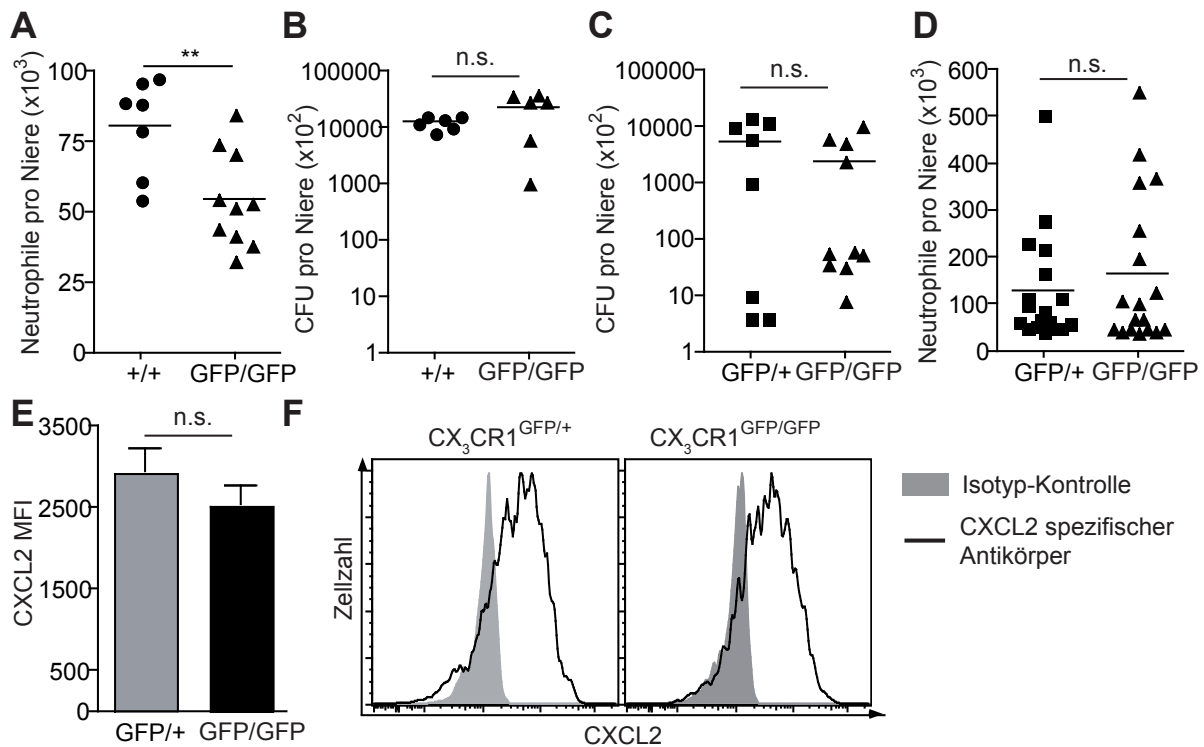


**Abbildung 5.12:** DC-intrinsische Funktionen sind unabhängig von CX<sub>3</sub>CR1. **(A)** DTH Reaktion in der Haut von nephritischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Reporter Mäusen (GFP/+) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> defizienten Mäusen (GFP/GFP), restimuliert durch Injektion von nephrotoxischem Schafserum (NTS) in die Fußsohle. Aufgetragen ist die Schwellung im Vergleich zum kontralateralen Fuß, der mit PBS injiziert wurde. **(B)** IFN $\gamma$ , IL-17- und TNF-Konzentration im Überstand von 24h Milzzellkulturen von nephritischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen, restimuliert mit NTS. 10<sup>7</sup> Milzzellen wurden für 24h in 1ml medium und 1:200 NTS. **(C)** Fluoreszenzintensität (MFI) der CD86 und MHC-II Expression auf Nieren DCs von nephritischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen. **(D)** Repräsentative FACS Abbildungen der *in vivo* Aufnahme von Fluoreszenz-gefärbtem Ovalbumin (OVA) durch Nieren DCs in nephritischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen, gated auf CD45<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> Zells. Die Zahlen geben den Prozentsatz OVA<sup>+</sup> DCs an. **(E)** Repräsentative Histogramme der T-Zell-Proliferation und CFSE-Verdünnung und Divisions-Indices (DI) in einer Kokultur von OVA-spezifischen T-Zellen und Nieren DCs von nephritischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen, die mit 1mg OVA 1h vor der Tötung injiziert worden waren. **(F)** IFN $\gamma$  und IL-17 Konzentrationen im Überstand von 72h Kokulturen aus E. Datenpunkte repräsentieren individuelle Mäuse, Ergebnisse sind repräsentativ für zwei bis vier Experimente mit 3-4 Mäusen pro Gruppe, statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten Student's t-test berechnet.



## 5.12 Die Pyelonephritis ist in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen nicht signifikant verschlimmert

Während cortikale DCs in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen stark reduziert waren, war die Reduktion der medullären DCs, zumindest in der Homöostase, weniger ausgeprägt. Darum stellte sich die Frage, ob die intrarenale antibakterielle Immunantwort in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen reduziert ist, was eine potentielle Nebenwirkung bei einer CX<sub>3</sub>CR1-gezielten Glomerulonephritis-Therapie darstellen könnte. Um dies zu prüfen, wurden CX<sub>3</sub>CR1-kompetente und -defiziente Mäuse mit UPECs infiziert und die Anzahl der Neutrophilen durchflusszytometrisch sowie die Infektionsstärke durch Ausstrich von Homogenat auf CPS-Platten nach 3h und 6h analysiert. 3h nach der zweiten Infektion waren signifikant weniger Neutrophile in den Nieren CX<sub>3</sub>CR1-defizienter Mäuse im Vergleich zu CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten Mäusen detektierbar, was auf eine initial verminderte Neutrophilen-Rekrutierung hinweist (Abbildung 5.13A). Signifikante Unterschiede in der Infektionsstärke (Colony forming units (CFU)) waren nach 3h nicht zu sehen (Abbildung 5.13B). Auch nach 6h unterschieden sich die CFU der infizierten Nieren aus CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen nicht signifikant (Abbildung 5.13C). Zu diesem Zeitpunkt waren auch keine Unterschiede bei den Neutrophilen-Zahlen mehr zu erkennen (Abbildung 5.13D). Um zu untersuchen, ob die übrig gebliebenen DCs in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen mehr CXCL2 zur Kompensation der verringerten Zellzahl produzieren, wurde die CXCL2-Produktion in CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten und -defizienten Mäusen verglichen. Die CXCL2-Produktion pro DC war in beiden Gruppen gleich (Abbildung 5.13E). Allerdings zeigte sich, dass zu diesem Zeitpunkt sowohl in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> als auch in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen Neutrophile selbst große Mengen CXCL2 produzierten (Abbildung 5.13F). Offenbar können Neutrophile also in einem positiven Rückkopplungsmechanismus weitere Neutrophile in die Niere rekrutieren, sobald sie ins infizierte Gewebe eingewandert sind. Die initiale Produktion von CXCL2 durch die verbleibenden DCs in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen reicht für die Initiierung dieses Mechanismus aus, so dass die intrarenale antibakterielle Immunantwort gegen Pyelonephritis durch die CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz nicht signifikant beeinträchtigt wird.



**Abbildung 5.13:** Die Pyelonephritis ist in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen nicht signifikant verschlimmert. **(A und B)** Absolute Anzahl Neutrophiler pro Niere **(A)** und bakterielle Last (CFU) **(B)** in CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten (+/+) und –defizienten (GFP/GFP) Mäusen 3h nach UPEC-Infektion. **(C und D)** Bakterielle Last (CFU) **(C)** und absolute Anzahl Neutrophiler **(D)** pro Niere in CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten (GFP/+) und –defizienten (GFP/GFP) Mäusen 6h nach UPEC-Infektion. **(E)** Fluoreszenzintensität (MFI) CXCL2<sup>+</sup> DCs in CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten (GFP/+) und –defizienten (GFP/GFP) Mäusen 6h nach UPEC-Infektion. **(F)** Repräsentative Histogramme der CXCL2-Expression (schwarze Linie) durch CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> Neutrophile in den Nieren CX<sub>3</sub>CR1-kompetenter und –defizienter Mäuse 6h nach UPEC-Infektion im Vergleich zur Isotypen-Färbung (grau hinterlegt). Datenpunkte repräsentieren einzelne Nieren. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-Test berechnet.

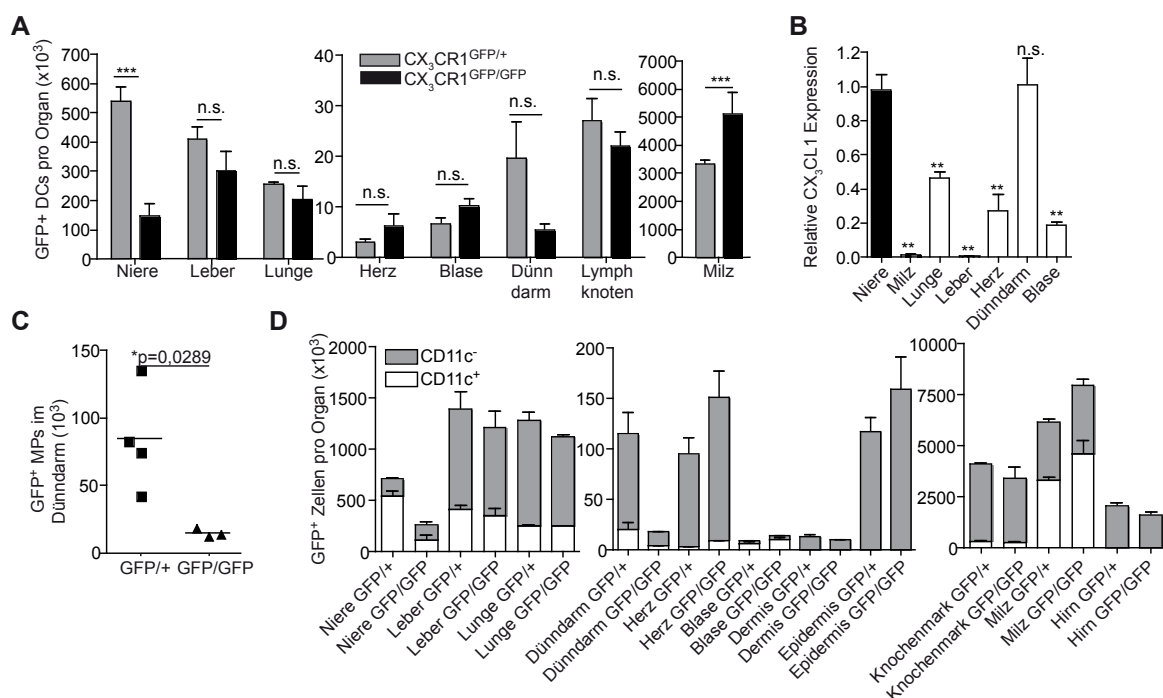
### 5.13 Die Abhängigkeit der DC-Besiedlung von CX<sub>3</sub>CR1 ist spezifisch für die Niere

Zu guter Letzt stellte sich die Frage, ob es sich bei der Reduktion der GFP<sup>+</sup> DCs in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen um ein nierenspezifisches Phänomen handelt oder der Rezeptor auch in anderen Organen für die Besiedlung durch DCs wichtig ist. Um dies zu untersuchen, wurden DC-Zahlen in Leber, Lunge, Herz, Blase, Dünndarm, Lymphknoten und Milz von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen verglichen. In keinem anderen Organ war eine vergleichbare, signifikante Reduktion der GFP<sup>+</sup> DCs zu beobachten (Abbildung 5.14A). Nur im Dünndarm waren deutlich weniger DCs in den CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen zu finden. Die absoluten DC-Zahlen waren im Dünndarm allerdings wesentlich geringer als in der Niere (Abbildung 5.14A) und die Reduktion erreichte keine statistische Signifikanz. Die Milzen der CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäuse enthielten ca. 40% mehr GFP<sup>+</sup> DCs als die der CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten Kontrollen (Abbildung 5.14A), was vielleicht durch eine veränderte Wanderung der DCs-Vorläufer erklärt werden könnte.

Um zu überprüfen, ob die hohe CX<sub>3</sub>CR1-Abhängigkeit von DCs in den Nieren auf eine erhöhte Expression des einzigen CX<sub>3</sub>CR1-Liganden CX<sub>3</sub>CL1 zurückzuführen sein könnte, wurde die CX<sub>3</sub>CL1 Expression in Nieren, Leber, Lunge, Herz, Blase, Darm und Milz mittels RT-PCR untersucht und verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Expression von CX<sub>3</sub>CL1 tatsächlich in den Nieren wesentlich höher war als in allen anderen getesteten Organen, mit Ausnahme des Dünndarms, der eine vergleichbare CX<sub>3</sub>CL1 Expression zeigte (Abbildung 5.14B).

Die Analyse der GFP<sup>+</sup> Zellen im Dünndarm von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen zeigte eine signifikante Reduktion von GFP<sup>+</sup> MPs in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen (Abbildung 5.14C), wie es bereits in der Literatur beschrieben worden ist (107). Eine Reduktion von GFP<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> Zellen in anderen Organen war hingegen nicht zu beobachten (Abbildung 5.14D). Somit liefert die CX<sub>3</sub>CL1 Expression in Nieren und Dünndarm eine Erklärung für die CX<sub>3</sub>CR1-Abhängigkeit der Infiltration CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> DCs bzw. MPs in diese Organe.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Abhängigkeit der homöostatischen DC-Besiedlung von CX<sub>3</sub>CR1 spezifisch für die Niere und in keinem anderen Organ so ausgeprägt ist. Diese organspezifische Abhängigkeit ist zumindest teilweise durch eine vergleichsweise hohe CX<sub>3</sub>CL1-Expression zu erklären.



**Abbildung 5.14:** Die Abhängigkeit der homöostatischen DC-Besiedlung von CX<sub>3</sub>CR1 ist spezifisch für die Niere. **(A)** Absolute Zahl von GFP<sup>+</sup> DCs in verschiedenen Organen von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> (grau) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> (schwarz) Mäusen. **(B)** Relative CX<sub>3</sub>CL1 Expression in verschiedenen Organen von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> Mäusen im Vergleich zur Expression in der Niere; normalisiert auf 18s rRNA-Expression. **(C)** Absolute Zahl GFP<sup>+</sup> MPs im Dünndarm von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen. **(D)** Absolute Zahl GFP<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> und GFP<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> Zells pro Organ, (Knochenmark pro Bein, Dermis und Epidermis pro 2 Ohren). Ergebnisse sind repräsentativ für zwei individuelle Experimente mit 3-4 Mäusen pro Gruppe. Statistische Signifikanz wurde mit dem one-way ANOVA im Kombination mit dem Bonferroni- (A) oder Dunnetts- (B) Vergleichstest oder dem ungepaarten Student's t-test (C) berechnet.

## 6 Diskussion

### 6.1 DC-Reifung in NTN

CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> DCs machen den größten Teil der intrarenalen Leukozyten aus und durchziehen das Tubulointerstitium als dichtes Netzwerk (76). Unter homöostatischen Bedingungen halten sie die Toleranz gegenüber ungefährlichen filtrierten Antigenen aufrecht (27, 84), können aber auf Gefahrensignale unverzüglich reagieren und dienen so der Überwachung des Gewebes (32). Im inflammatorischen Kontext können DCs abhängig vom Krankheitsmodell protektiv oder proinflammatorisch wirken (85). Dabei ist ihre Rolle in der Glomerulonephritis unklar, denn die Depletion von DCs mit Hilfe von CD11c.DTR-Mäusen führte im NOH-Modell zu einer Verbesserung und im NTN-Modell zu einer Verschlimmerung der Krankheit (30, 65). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kontroversen Ergebnisse zur Rolle von DCs in der GN möglicherweise darauf zurückzuführen sind, dass die Depletion von DCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. in verschiedenen Stadien der GN-Progression, nämlich im NOH-Modell zum Zeitpunkt einer etablierten Nephritis an Tag 5 und im NTN-Modell während der Initiation der Nephritis an Tag 4, durchgeführt worden waren. Die Zeitpunkte scheinen nicht weit auseinander zu liegen, jedoch wird die GN im NOH-Modell durch die Injektion von antigenspezifischen CTL und voraktivierten Th-Zellen induziert, während die GN im NTN-Modell durch die Injektion von Antigen induziert wird und endogene T-Zellen erst *in vivo* aktiviert werden müssen. Die T-Zell-Aktivierung nimmt normalerweise 3-4 Tage in Anspruch, somit entspricht der Tag 5 im NOH-Modell ungefähr dem Tag 8 oder 9 im NTN-Modell. Um die Rolle der DCs in der etablierten NTN zu betrachten, wurde allerdings der Tag 7 als Depletions-Zeitpunkt gewählt, da die NTN an Tag 10 analysiert werden sollte, um die Effekte auf die DTH-vermittelte Phase der Krankheit ohne Einflüsse der Immunkomplex-vermittelten Phase bestimmen zu können (54), und zwischen Depletion und Analyse genügend Zeit für die Auswirkung der DC-Depletion zur Verfügung stehen sollte. Die DC-Depletion an Tag 7 nach NTN-Induktion führte zu einer Verbesserung der GN mit verringertem histologischen Schaden und weniger MP- und T-Zell-Infiltraten. Die phänotypische Analyse der renalen DCs aus gesunden Mäusen und nephritischen Mäusen an Tag 4 und 10 nach NTN-Induktion zeigte, dass die Zellen im Verlauf der NTN reiften und die Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern wie CD40, CD80 und CD86 anstieg, während das in der NTN protektive Molekül ICOS-L zwischen Tag 4 und Tag 10 wieder herunterreguliert wurde (65, 130). Des Weiteren begannen die DCs proinflammatorische Zytokine wie TNF und IL-12/23p40 zu produzieren und nahmen mit steigender Proteinurie mehr und anderes Antigen auf als unter homöostatischen Bedingungen. Isolierte DCs aus den Nieren von Tag 10-nephritischen Mäusen, die zuvor mit OVA injiziert worden waren, aktivierten OT-II-Zellen *ex vivo* und induzierten die Produktion von Th1-spezifischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und TNF

sowie IL-2, IL-6 und IL-17. DCs aus gesunden Mäusen induzierten keine pro-inflammatorische Zytokin-Produktion in den antigenspezifischen T-Zellen und DCs aus Tag 4-nephritischen Mäusen induzierten lediglich die Produktion von IL-17, was konsistent mit einigen kürzlich veröffentlichten Studien ist, die zeigen, dass IL-17 (in dieser Phase hauptsächlich von „innate“ T-Zellen, wie  $\gamma\delta$ -T-Zellen produziert) früh in der NTN eine Rolle spielt, während IFN- $\gamma$ -produzierende Th1 Zellen erst später involviert sind (133, 134). Somit scheinen die renalen DCs zwischen Tag 4 und Tag 10 eine funktionale Wandlung zu durchlaufen, die sie von protektiven zu pro-inflammatorischen Th1-induzierenden Zellen werden lässt. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei dieser funktionalen Umschaltung um eine Überschreitung des Schwellenwerts der drei für die immunogene T-Zell-Stimulation notwendigen Signale (Antigen, Kostimulation und Zytokine) handelt, die alle zwischen Tag 4 und Tag 10 ansteigen. Obwohl die stimulatorische Aktivität der renalen DCs nur *in vitro* und nur mit naiven OT-II-Zellen gezeigt wurde, lassen die Ergebnisse vermuten, dass die maturierten DCs in der späten Phase der NTN, nicht aber DCs in gesunden Mäusen und in der frühen Phase der NTN, intrarenal einwandernde T-Zellen stimulieren können, wie es auch im NOH-Modell der Fall ist (29, 30). Formell ist dies jedoch nicht gezeigt, denn erstens können endogene T-Zellen einen anderen Aktivierungs-Schwellenwert haben als OT-II-Zellen und zweitens sind die bei der NTN in die Niere einwandernden T-Zellen bereits aktiviert im Gegensatz zu den OT-II-Zellen in der Kokultur (54). Dennoch sprechen alle Ergebnisse dafür, dass die renalen DCs im Verlauf der NTN so stark maturieren, dass sie ihren nicht-immunogenen Phänotyp verlieren und T-Zell-stimulatorisch werden.

Die Produktion des regulatorischen Zytokins IL-10 in den Kokulturen war insgesamt sehr gering und stieg zwischen Tag 4 und Tag 10 der NTN leicht an. Diese Ergebnisse schließen nicht aus, dass die DCs an Tag 4 unter anderem durch IL-10-Produktion und -Induktion in T-Zellen protektiv wirken, jedoch zeigen sie, dass die Wandlung der protektiven DCs zu pro-inflammatorischen Zellen nicht durch Reduktion der IL-10-Produktion bedingt ist. Obwohl die DCs in der späten Phase mehr IL-10 produzieren, wirken sie dann, vermutlich durch die gesteigerte Produktion und Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, insgesamt krankheitsaggravierend.

Ob nur einwandernde inflammatorische DCs oder auch nierenresidente DCs funktionell maturierten und zur T-Zell-Stimulation fähig wurden, wurde nicht explizit untersucht. Die Expression der Maturierungsmarker schien auf allen DCs anzusteigen, während zu jedem Zeitpunkt nur wenige DCs pro-inflammatorische Zytokine exprimierten. Ob es sich dabei um einwandernde inflammatorische DCs oder/und gereifte nierenresidente DCs handelt, ist nicht klar.

Ein Grund für den ausgeprägten nicht-immunogenen Phänotyp der renalen DCs unter homöostatischen Bedingungen und zu Beginn der Nephritis könnte ihr ständiger Kontakt mit Fremd-Antigenen, z.B. aus der Nahrung, sein. Das Blut wird konstitutiv von den Nieren gefiltert. Moleküle mit einem Molekulargewicht  $\leq 45$ kDa werden dabei frei filtrierte und in der Niere konzentriert. Gegen diese

ungefährlichen Antigene muss eine Toleranz aufrechterhalten werden. Eine leichte Aktivierbarkeit der renalen DCs hätte häufige Entzündungsreaktionen innerhalb der Niere zur Folge. Starke oder lang anhaltende inflammatorische Signale, wie das inflammatorische Milieu beim Fortschreiten der NTN, scheinen den toleranten Phänotyp der DCs durch deren (graduelle) Reifung zu durchbrechen. Die physiologische Relevanz dieses funktionellen Umschaltens könnte in der Notwendigkeit liegen, dass trotz nicht-immunogenen Phänotyps Gefahrensignale durch Pathogene in eine Immunantwort übersetzt werden müssen. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn Bakterien in die Nieren eindringen (32). Dann reagieren DCs umgehend mit der Produktion von CXCL2 und der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. Ob adaptive Immunantworten bei der bakteriellen Pyelonephritis eine Rolle spielen, ist nicht bekannt. Normalerweise folgen sie den innatent Antworten aber mit einigen Tagen Verzögerung. Somit könnte die Reifung der renalen DCs in Anwesenheit pro-inflammatorischer Stimuli für die Stimulation adaptiver Immunantworten bei Niereninfektionen essentiell sein. Im Falle der Glomerulonephritis fördern die DC-Maturation und das funktionelle Umschalten die Hypersensitivitäts-vermittelte Entzündung. Ein therapeutischer Eingriff, der die DC-Reifung verhindert, könnte somit vorteilhaft auf die Progression der Nephritis wirken.

## 6.2 Proteinurie und Nephritis-Progression

In der Glomerulonephritis bleibt der Schaden nicht auf die Glomeruli beschränkt, sondern breitet sich ins Tubulointerstitium aus. Die Schädigung des Nierenparenchyms, die häufig Vernarbungen des Gewebes (Fibrose) nach sich zieht, führt letztendlich zum Verlust der Nierenfunktion (69). Die Mechanismen, mit denen sich der Schaden ausbreitet, sind unvollständig geklärt. Es ist bekannt, dass die aus der Schädigung des glomerulären Filters resultierende hohe Proteinkonzentration im Ultrafiltrat die Tubuluszellen schädigt, die daraufhin durch Zytokin- und Chemokin-Produktion Immunzellen in die Niere rekrutieren (67).

Aus meinen Befunden kann man die Hypothese ableiten, dass die erhöhte Aufnahme der filtrierte Proteine durch renale DCs einen weiteren Mechanismus der Ausbreitung der Entzündung einleiten: Bei steigender Proteinkonzentration im Ultrafiltrat bzw. Nierengewebe nehmen DCs mehr Proteine auf und können sie infiltrierenden T-Zellen präsentieren. Auch größere Proteine, die normalerweise nicht in das Filtrat gelangen, können so von den renalen DCs endozytiert, prozessiert und präsentiert werden (135). Je nach Reifungszustand der DCs führt das zur Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen, die ihre Effektorfunktionen in der Niere ausüben können und die Nephritis somit verstärken.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen also einen neuen Mechanismus auf, wie der glomeruläre Schaden und die daraus resultierende Proteinurie zur progressiven Schädigung der Niere führen können.

### 6.3 Cortikale DCs fördern die NTN-Progression

Funktionelle *in vitro* Analysen der DCs in der Nierenrinde und im Nierenmark deuten darauf hin, dass die cortikalen DCs die NTN vorantreiben. Nur sie, nicht aber die medullären DCs, waren zur Aktivierung von OT-II-Zellen in der Lage. Dabei beschränkte sich die Reifung der DCs nicht auf den Nierencortex, in dem die entzündeten Glomeruli lokalisiert sind. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 war an Tag 10 nach NTN-Induktion gleichermaßen auf cortikalen und medullären DCs erhöht. In einigen Experimenten zeigten cortikale DCs eine leicht erhöhte Expression von MHC-II und CD40 gegenüber medullären DCs, die marginalen Unterschiede können allein aber kaum die vergleichsweise großen Diskrepanzen bezüglich der T-Zell-Stimulation erklären. Analysen der Endozytose-Fähigkeiten der DCs in den zwei Kompartimenten ergaben eine relative Überlegenheit der medullären Zellen. Die Unterschiede waren aber *in vivo* deutlich stärker ausgeprägt als *in vitro*, was darauf hindeutet, dass die stärkere Antigen-Aufnahme *in vivo* hauptsächlich durch eine größere Verfügbarkeit im Nierenmark bedingt und nur zu einem kleinen Teil ein Zell-intrinsisches Phänomen ist.

Dennoch legte die erhöhte Endozytoseaktivität *in vitro* die Vermutung nahe, dass medulläre CD11c<sup>+</sup> Zellen eher MP-Funktionalität aufweisen, während cortikale CD11c<sup>+</sup> Zellen eher DC-ähnlich sind. Die Abgrenzung von DCs und MPs ist ein kontrovers diskutiertes Thema (136). Ursprünglich wurden murine DCs durch die gleichzeitige Expression von CD11c und MHC-II definiert und von anderen Zelltypen, wie z.B. MPs, unterschieden. Als APCs können auch MPs MHC-II auf ihrer Oberfläche tragen, lassen sich aber zumeist von den DCs durch die fehlende Expression von CD11c unterscheiden. Es gibt allerdings Ausnahmen zu dieser Regel, denn einige Gewebs-Makrophagen, z.B. MPs in der Lunge, exprimieren hohe CD11c-Levels. Des Weiteren gibt es DC-Typen, die nur wenig CD11c auf ihrer Oberfläche exprimieren. Außerdem führt eine Aktivierung von DCs zu Veränderungen der CD11c-Expressionslevels. Die fließenden Übergänge machen eine Abgrenzung zwischen DCs und MPs auf phänotypischer Ebene schwierig, so dass funktionelle Parameter in Betracht gezogen werden müssen. Doch auch bezüglich der Funktion zeigt sich immer mehr, dass die ursprünglich in lymphatischen Organen charakterisierten und definierten Makrophagen (große Fresszellen) und Dendritischen Zellen (T-Zell-Aktivatoren) in diesen klassischen Formen nicht in peripheren Geweben existieren. Vielmehr stellen sie zwei Extreme eines mehr oder weniger kontinuierlichen Phänotyps myeloider APCs in nicht-lymphatischen Organen dar (33, 136). Diese myeloiden Zellpopulationen können Funktionen sowohl von klassischen Makrophagen als auch von klassischen DCs ausüben und lassen sich manchmal nicht eindeutig nur dem einen oder anderen Zelltyp zuordnen. Für die renalen CD11c<sup>+</sup> Zellen wurde kürzlich in einer Studie gezeigt, dass sie funktionell eher DCs als MPs gleichen (77). Auch ihr Transkriptosom gleicht eher dem von anderen Gewebe-DCs als dem von MPs (80). In den vorangegangenen Studien wurden allerdings immer die gesamten CD11c<sup>+</sup> Zellen der Niere betrachtet und so lässt sich nicht ausschließen, dass nur ein Teil dieser Zellen, z.B. nur die CD11c<sup>+</sup>

Zellen der Nierenrinde, zu den DCs gezählt werden können. Zu der Annahme, dass medulläre APCs eher MP-ähnlich seien, passt die niedrige CD11c-Expression auf den medullären APCs, die erhöhte Endozytose-Aktivität und die geringe T-Zell-Stimulation (33). Klassische MPs nehmen viel Antigen auf, degradieren es aber sehr schnell und können es schlechter präsentieren als DCs (137). Medulläre APCs zeigten keine schnelle Antigen-Degradation, wie sie für MPs typisch ist (137). Allerdings exprimierten sie weniger H-2M und Invariante Kette, zwei Proteine, die für die Beladung von MHC-II Molekülen und damit für die Antigen-Präsentation und T-Zell-Aktivierung essentiell sind (18). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass medulläre APCs aufgenommene Antigene schlechter auf MHC-II laden und präsentieren können. Gemeinsam mit der verringerten CD40-Expression könnte das ein Grund für die schlechte T-Zell-Aktivierung medullärer APCs sein. Weitere Gründe, die in dieser Arbeit nicht betrachtet wurden, könnten Unterschiede in der Expression von inhibitorischen Molekülen, z.B. CTLA-4 oder PD-L1 oder PD-L2, oder von pro-inflammatorischen und/oder regulatorischen Zytokinen sein. Aufgrund mangelnder zwingender Gründe für eine Zugehörigkeit der medullären APCs zu den MPs werden sie im Folgenden weiterhin als medulläre DCs bezeichnet. Die Analysen weiterer MP-Charakteristika cortikaler und medullärer DCs, z.B. NO-Produktion nach Stimulation, wurden hier nicht betrachtet, könnten aber für die Einordnung der Zellen in das DC-MP-Kontinuum hilfreich sein.

#### **6.4 Innate und adaptive Funktionen medullärer und cortikaler DCs**

Während cortikale DCs in der NTN T-Zellen stimulieren können, befinden sich die medullären DCs in geeigneter Position zur frühen Erkennung bakterieller Infektionen, denn sie sind direkt neben den Sammelrohren, die sich vom Nierenbecken, wo die Bakterien in die Niere einwandern, zur Nierenrinde hochziehen, lokalisiert (72, 76). Tatsächlich produzierte ein hoher Prozentsatz medullärer DCs große Mengen des neutrophile Granulozyten rekrutierenden Chemokins CXCL2. Die CXCL2-Produktion durch cortikale DCs war wesentlich geringerer. Die für renale DCs beschriebene Funktion in der Pyelonephritis wird also hauptsächlich von den DCs im Nierenmark ausgeführt (32).

Sind also cortikale DCs auf die Initiation adaptiver Immunantworten (adaptive Funktion) und medulläre DCs auf die Induktion innater Immunantworten (innate Funktion) spezialisiert? Diese Frage kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend beantwortet werden, da nur zwei Krankheitsmodelle betrachtet wurden: ein hauptsächlich die Nierenrinde betreffendes T-Zell-vermitteltes Glomerulonephritis-Modell (NTN), bei dem DCs eher adaptive Funktionen aufweisen, und ein primär das Nierenmark betreffendes Infektions-Modell (PN), in dem DCs innate Funktionen aufweisen. Um darauf schließen zu können, ob die hier beobachteten adaptiven vs. innaten Funktionen in cortikalen bzw. medullären DCs zellintrinsisch oder nur durch das jeweilige Modell bedingt sind, müssten weitere Parameter in den Modellen betrachtet werden. Die Analyse der Produktion von CXCL16, das früh in der NTN durch renale DCs produziert wird und regulatorische NKT-



Zellen rekrutiert, könnte Aufschluss darüber geben, welche Zellen die frühen „innaten“ Funktionen in der Glomerulonephritis ausüben. Durch diese Analyse ließe sich feststellen, ob cortikale DCs zur Chemokin-Produktion und damit zu innate Funktionen befähigt sind. Des Weiteren könnten die Fähigkeiten cortikaler und medullärer DCs zur T-Zell-Stimulation zu späteren Zeitpunkten in der PN betrachtet werden. Ob T-Zell-Aktivierung im Falle der PN allerdings überhaupt relevant ist, ist nicht bekannt. Es ist zu bedenken, dass GN und PN ihren Ursprung in der Nierenrinde bzw. im Nierenmark nehmen, wodurch cortikale und medulläre DCs in beiden Modellen wahrscheinlich zeitlich versetzt aktiviert werden und ein direkter Vergleich zellintrinsic Funktionen kaum möglich ist. Zur Klärung der Funktionalität cortikaler und medullärer DCs sollten aus diesen Gründen weitere Modelle betrachtet werden, z.B. eine bakterielle Infektion, die zuerst den Cortex befällt, oder ein T-Zell-vermitteltes Entzündungsmodell, das primär das Nierenmark betrifft. Insgesamt lässt sich an dieser Stelle schlussfolgern, dass die DCs in der Nierenrinde die Progression der Glomerulonephritis durch T-Zell-Stimulation steigern (auch wenn das nicht formell, sondern nur *in vitro* gezeigt wurde), während medulläre DCs für die Einleitung der anti-bakteriellen Immunantworten in der Pyelonephritis verantwortlich sind. Ob die Zellen intrinsisch unterschiedlich sind oder die Funktionen durch ihre Lokalisation und die betrachteten Modelle bestimmt sind, bleibt an dieser Stelle ungeklärt. Auch die Frage, ob ein selektives Fehlen der cortikalen bzw. medullären DCs Einfluss auf die Progression von NTN oder PN hätte, kann nicht beantwortet werden. Mäuse, die die selektive Depletion cortikaler oder medullärer DCs erlauben, könnten weitere Aufschlüsse über die Funktion der DCs in verschiedenen Modellen bringen.

Eine weitere Frage, die sich in dem Zusammenhang stellt, ist, wodurch die Funktion der cortikalen und medullären DCs beeinflusst wird. Inflammatorische Stimuli lassen die APCs reifen, doch auch unter homöostatischen Bedingungen unterscheiden sich die APCs in Nierenrinde und Nierenmark bezüglich der CD11c-Expression und der Endozytose-Aktivität. Ob die cortikalen und medullären DCs den gleichen Vorläufer haben und unterschiedliche Reifungs-Stadien oder verschiedene Differenzierungsausprägungen der gleichen Zelle darstellen oder ob es sich bei den DCs um verschiedene Zelltypen handelt, ist nicht klar. Wahrscheinlich ist jedoch, dass Phänotyp und Funktionalität der DCs durch das lokale Milieu beeinflusst werden können. Hohe Salzkonzentrationen sind assoziiert mit der Differenzierung von naiven T-Zellen in Th17-Zellen (138, 139). Im Nierenmark liegen hohe Salzkonzentrationen vor und es ist bekannt, dass neben T-Zellen auch andere Zelltypen durch Salz beeinflussbar sind (140). Auch die im Nierenmark vergleichsweise hohe harnstoffbedingte Osmolarität und die Hypoxie könnten die DC-Differenzierung oder –Funktion in diesem Kompartiment beeinflussen. Studien, die dies belegen, gibt es bislang nicht. Transgene Mäuse, denen der durch hohe Salzkonzentrationen aktivierte Transkriptionsfaktor NFAT5 (auch TONEBP genannt), die durch Salz

aktivierte Serum Glucocorticoid Kinase 1 (SGK1) oder andere Osmolaritäts- oder Hypoxie-Sensoren (z.B. HIF-1a) fehlen, wären hilfreiche Werkzeuge zur Aufklärung dieser Fragen (138, 139).

## 6.5 CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz reduziert die homöostatische DC-Kolonisierung der Nieren

Der Chemokinrezeptor CX<sub>3</sub>CR1 wird von einem Großteil der DCs und MPs in der Niere exprimiert. Seine Funktionen unter homöostatischen Bedingungen und in der NTN waren bisher nicht bekannt. Mit Hilfe von CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup>-Reporter-Mäusen und CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen konnte ich zeigen, dass die Anzahl der GFP<sup>+</sup> DCs in den Nieren CX<sub>3</sub>CR1-defizienter Mäuse unter homeostatischen Bedingungen signifikant um durchschnittlich 75% reduziert war. Der Rezeptor scheint also für die Kolonisierung der Nieren durch DCs essentiell zu sein. Vor allem die DCs in der Nierenrinde, und weniger die DCs im Nierenmark, waren von der Reduktion betroffen. Auf die Kolonisierung der Nieren mit MPs, die auch CX<sub>3</sub>CR1 exprimieren, hatte die Rezeptor-Defizienz kaum einen Einfluss. Die Anzahl der MPs stieg sogar leicht, wenn auch nicht statistisch signifikant, an. Andere Zelltypen wie Mastzellen, NK-Zellen und T-Zellen, die niedrige Levels von CX<sub>3</sub>CR1 exprimieren können, waren kaum durch die CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz beeinflusst. In anderen Organen, einschließlich Lunge, Leber, Herz, Harnblase und Lymphknoten waren keine signifikanten Änderungen der DC- und MP-Zahlen zu beobachten. Nur im Dünndarm hatte der Rezeptor einen Einfluss auf die APC-Kolonisierung. Hier waren vor allem MPs betroffen, wie es auch in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt wurde (107). In den Milzen CX<sub>3</sub>CR1-defizienter Mäuse waren sogar mehr GFP<sup>+</sup> DCs zu finden als in den Milzen CX<sub>3</sub>CR1-kompetenter Mäuse, was durch eine Umverteilung der DC-Vorläufer erklärt werden könnte. Der CX<sub>3</sub>CR1-Ligand CX<sub>3</sub>CL1 war besonders stark in den Nieren und im Darm exprimiert, was eine Erklärung für die CX<sub>3</sub>CR1-Abhängigkeit der DC- bzw. MP-Zahlen in diesen Geweben sein könnte. Dass CX<sub>3</sub>CR1 die Rekrutierung sowie das Überleben von Leukozyten beeinflussen kann, ist bereits im Zusammenhang mit Arteriosklerose und Leberfibrose gezeigt worden (90, 110, 114). Ob die DC-Zahlen in den Nieren durch verminderte Rekrutierung von DC-Vorläufern, gehemmte Differenzierung, vermindertes Überleben oder verminderte Retention durch die CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz beeinflusst werden, ist nicht klar und der langsame Umsatz der renalen DCs macht es schwierig, zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden (59). Trotzdem identifizieren diese Ergebnisse CX<sub>3</sub>CR1 als einen Chemokinrezeptor, der unter homöostatischen Bedingungen DC-Zahlen in der Niere relativ spezifisch beeinflusst.

Der präferentielle Effekt von CX<sub>3</sub>CR1 auf die DCs in der Nierenrinde ist mit den momentan vorliegenden Daten nicht erklärbar. Auf mRNA-Ebene war CX<sub>3</sub>CL1 nicht weniger in der Medulla als im Cortex exprimiert (Daten nicht gezeigt). Mögliche Erklärungen könnten unterschiedliche Expressionslevels auf Protein-Ebene in Nierenrinde und Nierenmark oder die Verteilung von CX<sub>3</sub>CL1-Protein im Nierengewebe sein. Quantifizierung und Verteilung im Gewebe können mit Hilfe von Westernblots bzw. CX<sub>3</sub>CL1-Reporter-Mäusen, die in Kürze zu Verfügung stehen werden, untersucht werden (116).

Wie oben beschrieben, scheinen medulläre DCs außerdem mehr MP- und weniger DC-Charakteristika aufzuweisen als cortikale DCs. MPs waren von der CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz nicht beeinflusst und so könnten auch medulläre DCs weniger stark von CX<sub>3</sub>CR1 abhängen als cortikale DCs. Warum DCs, aber nicht MPs von der Rezeptor-Defizienz beeinträchtigt waren, obwohl beide Zelltypen diesen Rezeptor exprimieren, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Weitere Studien zur Aufklärung der Ontogenese und Einwanderung von renalen DCs und MPs sind dafür notwendig (141). Die leichte Erhöhung der MPs könnte aus einem „Auffüll-Effekt“ resultieren, der die verminderte DC-Zahl anteilig kompensiert.

## 6.6 CX<sub>3</sub>CR1 rekrutiert DC-Vorläufer in der NTN

Auch unter inflammatorischen Bedingungen trug CX<sub>3</sub>CR1 zur Besiedlung der Nieren mit CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> DCs bei. Die Anzahl der DCs in den Nieren nephritischer CX<sub>3</sub>CR1-defizienter Mäuse war im Vergleich zu nephritischen CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten Mäusen reduziert. Auch die Anzahl der MPs war in nephritischen CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen leicht, wenn auch nicht statistisch signifikant, verringert, was dafür spricht, dass die gemeinsamen Vorläufer inflammatorischer DCs und MPs, die Monozyten, schlechter in die Nieren einwandern können. Wie unter homöostatischen Bedingungen waren andere CX<sub>3</sub>CR1-exprimierende Zellen wesentlich weniger stark beeinflusst. Der Transfer von Knochenmark aus CX<sub>3</sub>CR1-Reporter-Mäusen führte zu mehr GFP<sup>+</sup> Zellen in den Nieren nephritischer wt-Mäuse verglichen mit dem Ergebnis beim Transfer von Knochenmark aus CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen. Unabhängig vom Knochenmark-Donor konnten die GFP<sup>+</sup> Zellen in den Nieren zu DCs differenzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verringerten DC-Zahlen in nephritischen Mäusen nicht nur ein Resultat von geringerer Kolonisation unter homöostatischen Bedingungen war, sondern auch direkt aus verringerter/m Einwanderung/Überleben/Retention von DC-Vorläufern unter inflammatorischen Bedingungen resultierte. Im Kontrast zu den Nieren wurde die Milz vermehrt von CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Zellen infiltriert, wie es auch unter homöostatischen Bedingungen in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen zu beobachten war. Die stärkere Besiedlung der Milz durch CX<sub>3</sub>CR1-defiziente Knochenmarks-Zellen schließt aus, dass die verringerten Zellzahlen in den Nieren ausschließlich durch Unterschiede im Überleben der DC-Vorläufer bedingt waren (90). Nichtsdestotrotz war die Einwanderung der CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Zellen nur partiell gehemmt, was bedeutet, dass weitere Chemokinrezeptoren für die Einwanderung mononukleärer Zellen in die nephritischen Nieren verantwortlich sind. Mögliche Kandidaten sind z.B. CCR2 und CCR1, die von Monozyten exprimiert werden, welche die Vorläufer von inflammatorischen DCs und MPs sein können (33, 141, 142) und für die bereits eine Rolle bei der Rekrutierung in die entzündete Niere gezeigt worden ist (117, 143). Den jeweiligen Beitrag eines Chemokinrezeptors zur Rekrutierung könnte man mit Hilfe von Mäusen, die defizient für einen oder mehrere Chemokinrezeptoren sind, oder mit verschiedenen Kombinationen von Chemokinrezeptor-

Inhibitoren untersuchen. Allerdings muss bei den Experimenten bedacht werden, dass eine große Redundanz bei den Chemokin-Chemokinrezeptor-Interaktionen herrscht. Anders als CX<sub>3</sub>CL1, das der einzige Ligand für CX<sub>3</sub>CR1 ist und das auch nicht an andere Chemokinrezeptoren binden kann, können viele andere Chemokine an mehrere Rezeptoren binden. Zudem kann die Chemokin-Konzentration im Gewebe durch die Bindung an die jeweiligen Rezeptoren reguliert werden (142, 143). Die Blockade oder Defizienz eines Rezeptors kann somit eine erhöhte Chemokinkonzentration und Rekrutierung über andere Rezeptoren zur Folge haben (143). Ein Problem bei der Analyse von CCR2-defizienten Mäusen stellt des Weiteren die relative Monozyten-Defizienz dar, denn inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten benötigen CCR2, um aus dem Knochenmark auswandern zu können (96). Mit Hilfe von Transfer-Experimenten, bei denen gleiche Zahlen von Chemokinrezeptor-kompetenten und -defizienten Monozyten transferiert werden, können diese Einschränkungen umgangen werden (117).

## 6.7 Die NTN ist in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen verringert

Mit der DC-Reduktion war auch die NTN in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen vermindert. Die DC-Funktionen selbst waren dabei nicht durch die CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz beeinträchtigt, so dass die Verbesserung des Krankheitsbildes wahrscheinlich auf die verringerte DC-Zahl zurückzuführen ist, die in einer verminderten DTH-Reaktion in den Nieren resultierte. Die Inkonsistenz dieser Ergebnisse mit einer Studie von Haskell et al., die beim Vergleich des Nierenschadens bei der GN in CD1 Mäusen mit und ohne CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz keine Unterschiede detektieren konnte (109), könnte zum einen auf den genetischen Hintergrund der Mäuse, von dem der Verlauf der Nephritis unter anderem abhängt (54), und zum anderen durch die zwei unterschiedlichen benutzten GN-Modelle zurückzuführen sein. Während Haskell et al. ein akzeleriertes NTN-Modell betrachtet haben, bei dem die Mäuse vor der Injektion des nephrotoxischen Serums mit irrelevantem Schaf-Immunglobulin immunisiert worden waren, wurde in dieser Arbeit die nicht-akzelerierte NTN untersucht, deren Pathomechanismus sich von dem der akzelerierten NTN durch die in der Anfangsphase fehlende Beteiligung von Immunkomplexen und stärkere Abhängigkeit von der DTH-Reaktion unterscheidet (54).

Die Beobachtung, dass mit der DC-Reduktion die NTN in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen vermindert ist, passt zu den Ergebnissen, die zeigen, dass die Depletion von maturierten DCs an Tag 7 der NTN zu einer Verbesserung der Krankheit führt. Allerdings müsste in den CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen auch der protektive Effekt der DCs, der durch CXCL16-vermittelte Rekrutierung regulatorischer NKT-Zellen und die Induktion von IL-10 vermittelt wird, in der frühen Krankheitsphase verringert sein (31, 65). Frühe Zeitpunkte der NTN wurden in den CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen in dieser Arbeit nicht betrachtet. Möglicherweise kommt es also auch in den CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen zu einer initialen Verschlimmerung der Krankheit, die durch die späten Effekte der CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz umgekehrt wird. Allerdings wurden auch in der Studie von Scholz et al. DCs an den Tagen 4 und 10 nach NTN-Induktion depletiert, also zu

einem frühen und einem späten Zeitpunkt. Die späte Depletion konnte die negativen Effekte der frühen DC-Depletion in der Studie von Scholz et al. nicht ausgleichen. Für diese unterschiedlichen Ergebnisse gibt es einige mögliche Gründe: (1) Die protektiven Eigenschaften der DCs in der frühen NTN werden durch ein mit Diphtherie-Toxin depletierbares, aber CX<sub>3</sub>CR1-unabhängiges DC-Subset, z.B. CD103<sup>+</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup> DCs, vermittelt. (2) Die Effizienz der DC-Depletion in den CD11c.DTR-Mäusen (an Tag 5 der NTN 85% (65)) ist größer als die Reduktion in den CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen (in der Homöostase ca. 75%, an Tag 10 der NTN 50%) und die übrigen DCs in den letzteren Mäusen reichen aus, um die protektiven Effekte in der frühen NTN zu vermitteln. (3) Die (geringen) Reduktionen von MPs und anderen CX<sub>3</sub>CR1-exprimierenden Zellen (z.B. Mastzellen und T-Zellen) in den CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen vermitteln zusätzlich protektive Effekte, die in den CD11c.DTR-Mäusen nicht zum Tragen kommen (144, 145). (4) Durch die DT-Injektion in CD11c.DTR-Mäuse werden CD11c<sup>+</sup> Zellen in allen Geweben depletiert, in den CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen sind DCs selektiv in der Niere (und im Darm) reduziert. Dies könnte den Verlauf der NTN durch systemische Effekte beeinflussen. (5) Die DC-Depletion in CD11c.DTR-Mäusen geht mit einer ausgeprägten Neutrophilie einher (146). Die hohen Neutrophilen-Zahlen im Blut könnten sich auf die NTN auswirken, denn Neutrophile scheinen früh in der NTN in die Nieren einzuwandern und könnten den Gewebeschaden verstärken (133, 147).

Um den Effekt der CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz auf die protektiven DC-vermittelten Funktionen zu untersuchen, müssten frühere Zeitpunkte in der NTN betrachtet werden. Festzuhalten bleibt, dass bei der CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz Schutzfunktionen überwiegen und potentielle negative Effekte nicht zum Tragen kommen.

Die protektive Wirkung der CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz bei der NTN identifiziert diesen Chemokin-Rezeptor als einen potentiellen Angriffspunkt zur Behandlung der GN, vor allem, weil die Expression des Rezeptors auch bei der GN im Menschen in den Nieren erhöht ist und somit eine Rolle zu spielen scheint (122). Die zumindest unter homöostatischen Bedingungen vorhandene relative Spezifität der CX<sub>3</sub>CR1-Abhängigkeit in der Niere legt die Vermutung nahe, dass bei einer Therapie der GN durch systemische CX<sub>3</sub>CR1-Blockade mit relativ wenigen Nebenwirkungen gerechnet werden muss. Eventuelle frühe protektive Funktionen von renalen CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> DCs wären nicht durch die Therapie beeinflusst, denn ein therapeutischer Eingriff bei Patienten würde erst in einer späteren Phase der Nephritis getätigt, da bei der Initiation keine Symptome vorhanden sind, die eine Behandlung rechtfertigten. Ob der Effekt der CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz durch verminderte Rekrutierung, schlechteres Überleben oder verringerte Retention der DCs im Gewebe vermittelt wird, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Sollte CX<sub>3</sub>CR1 hauptsächlich für die Rekrutierung verantwortlich sein, so würden bei einer Rezeptorblockade primär einwandernde DC-Vorläufer, aber nicht die nierenresidenten DCs erreicht. Da nicht bekannt ist, ob bei der NTN alle DCs (auch die nierenresidenten) oder nur die einwandernden DCs pro-inflammatorisch sind, ist nicht klar, wie effektiv eine therapeutische CX<sub>3</sub>CR1-Blockade ist. Die

Antikörperblockade von CX<sub>3</sub>CR1 in einem Ratten-GN-Modell schützte die behandelten Tiere durch verminderte Einwanderung von Monozyten und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (125). CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind am Pathomechanismus der murinen NTN jedoch nicht beteiligt (144). Zur Evaluation von CX<sub>3</sub>CR1 als Ziel der GN-Therapie sind weitere Studien, bei denen die CX<sub>3</sub>CR1-Blockade in der murinen NTN angewandt wird, notwendig.

### **6.8 Die antibakterielle Immunantwort ist in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt**

Da die Einleitung der anti-bakteriellen Immunantwort bei der Pyelonephritis (PN) von renalen DCs abhängt, die durch CXCL2-Produktion CXCR2<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten in die Niere rekrutieren, stellte sich die Frage, ob eine höhere Infektionsanfälligkeit eine Nebenwirkung der CX<sub>3</sub>CR1-gerichteten GN-Therapie sein könnte (32). Um dies zu untersuchen, wurde in CX<sub>3</sub>CR1-kompetenten und -defizienten Mäusen PN induziert und die Einwanderung von Neutrophilen sowie die Infektionsstärke untersucht. Es zeigte sich, dass die PN in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen nicht verschlimmert war. Für dieses unerwartete Ergebnis stellten sich zwei Gründe heraus: (1) Medulläre DCs, die die Hauptproduzenten von CXCL2 sind, waren in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/GFP</sup> Mäusen nur leicht verringert und initiierten den Neutrophilen-Einstrom. (2) Rekrutierte Neutrophile produzierten große Mengen von CXCL2, die die anfängliche leichte Verzögerung der Neutrophilen-Rekrutierung ausgleichen konnten. Die letztere Beobachtung ist konsistent mit früheren Studien, die zeigen, dass in die Nieren rekrutierte Neutrophile ab ca. 6h nach Infektion stark zur CXCL2-Produktion beitragen (75). Tittel et al. analysierten die CXCL2 Produktion nur kurze Zeit (3h) nach der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt scheinen Neutrophile noch kein CXCL2 zu produzieren (32). Die physiologische Relevanz dieser verspätet initiierten Chemokin-Produktion könnte darin begründet sein, dass bei sehr schwachen Infektionen, die schon durch die initial einwandernden Neutrophilen vollständig geklärt werden können, kein weiterer Neutrophilen-Einstrom nötig ist. Nur wenn die bakteriellen Stimuli anhalten, beginnen die Neutrophilen mit der Rekrutierung weiterer Effektorzellen. Entgegen früheren Studien, die nicht-hämatopoetische Zellen als primäre Quelle von CXCL2 identifizierten (75, 148-150), konnte in dieser Arbeit in CD45-negativen Zellen kaum CXCL2-Produktion detektiert werden. Diese Beobachtung ist konsistent mit den Ergebnissen von Tittel et al., die keine signifikante CXCL2-Produktion durch CD45-negativen Zellen zeigten (32). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bestimmte Zelltypen, wie z.B. Epithelien, durchflusszytometrisch nicht erfasst werden.

Die anti-bakterielle Immunantwort ist in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen also nicht beeinträchtigt, was vermuten lässt, dass eine CX<sub>3</sub>CR1-gerichtete Therapie der GN nicht mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen der Nieren einhergehen würde.

## 7 Zusammenfassung

Als zentrale Regulatoren von Immunantworten sind Dendritische Zellen (DCs) in allen lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen zu finden. Auch die Nieren sind von einem dichten Netzwerk von DCs durchzogen. Diese spielen sowohl bei der Aufrechterhaltung der Organhomöostase als auch beim Einleiten von Immunantworten gegen einwandernde Mikroorganismen eine wichtige Rolle und können kontextabhängig sowohl protektive als auch destruktive Funktionen ausüben. Ob sie in den häufigsten immunvermittelten Nierenerkrankungen, den Glomerulonephritiden (GNs), protektiv oder pro-inflammatorisch wirken, wird kontrovers diskutiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle renaler DCs in der Nephrotoxischen Nephritis (NTN), einem murinen Modell der rapid-progressiven crescentischen GN zu klären. Diese stellt die aggressivste Form der GN dar, die unbehandelt meist zum terminalen Nierenversagen mit Dialysepflicht führt.

Ich konnte zeigen, dass renale DCs, die unter homöostatischen Bedingungen nicht-immunogen und im frühen Stadium der NTN protektiv sind, während der NTN-Progression eine funktionelle Wandlung zu pro-inflammatorischen Zellen durchlaufen. Sie reifen, beginnen pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren und nehmen unter proteinurischen Bedingungen vermehrt filtrierte Antigen auf. Dies befähigt vor allem die DCs in der Nierenrinde, in der sich die bei der GN primär betroffenen Glomeruli befinden, dazu, T-Zellen zu aktivieren und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zu induzieren.

Während meiner Arbeit beobachtete ich, dass sich in den Nieren von Mäusen, denen der Chemokinrezeptor CX<sub>3</sub>CR1 fehlt, sehr viel weniger DCs befanden als bei Kontrollmäusen. In keinem anderen Organ war eine solche CX<sub>3</sub>CR1-Abhängigkeit der DCs zu beobachten. Als mögliche Erklärung konnte ich eine vergleichsweise hohe Expression des Liganden CX<sub>3</sub>CL1 in der Niere feststellen. Meine Befunde identifizieren CX<sub>3</sub>CR1 als ersten nierenspezifischen „Homing-Rezeptor“ für DCs. Dies ist im Zusammenhang mit der NTN interessant, vor allem, weil über die Funktion dieses Chemokinrezeptors, der von einem Großteil aller DCs in nicht-lymphatischen Organen exprimiert wird, wenig bekannt ist. Durch die CX<sub>3</sub>CR1-abhängige Reduktion der DCs, insbesondere in der Nierenrinde, war die NTN in CX<sub>3</sub>CR1-defizienten Mäusen abgemildert. Im Gegensatz dazu war die Immunabwehr gegen die häufigste Niereninfektion, die bakterielle Pyelonephritis (PN), durch CX<sub>3</sub>CR1-Defizienz nicht beeinträchtigt, was durch die geringere CX<sub>3</sub>CR1-Abhängigkeit der DCs im Nierenmark, die bei der PN antibakterielle Effektorzellen in die Nieren rekrutieren, erklärt werden kann. Zudem übernehmen CX<sub>3</sub>CR1-unabhängig eingewanderte neutrophile Granulozyten teilweise Funktionen der DCs.

Zusammenfassend schlage ich CX<sub>3</sub>CR1 als Therapie-Angriffspunkt bei der GN vor, da die Abwesenheit von CX<sub>3</sub>CR1 selektiv DCs in der Niere beeinflusst, ohne die Neigung zu bakteriellen Niereninfektionen zu verstärken.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Murphy, K. 2012. *Janeway's Immunobiology 8th edition (english)*.
2. Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173:89-97.
3. Warren, H.S., and Smyth, M.J. 1999. NK cells and apoptosis. *Immunol Cell Biol* 77:64-75.
4. Silva, M.T. 2010. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol* 87:93-106.
5. Dunkelberger, J.R., and Song, W.C. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 20:34-50.
6. Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9:4-9.
7. Steinman, R.M., Bonifaz, L., Fujii, S., Liu, K., Bonnyay, D., Yamazaki, S., Pack, M., Hawiger, D., Iyoda, T., Inaba, K., et al. 2005. The innate functions of dendritic cells in peripheral lymphoid tissues. *Adv Exp Med Biol* 560:83-97.
8. Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. 1998. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* 10:351-353.
9. Ahmed, R., and Gray, D. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54-60.
10. Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:11-22.
11. Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
12. Mosmann, T.R. 1992. T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. *Ann N Y Acad Sci* 664:89-92.
13. Steinman, R.M., Gutchinov, B., Witmer, M.D., and Nussenzweig, M.C. 1983. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med* 157:613-627.
14. Adams, D.O., and Hamilton, T.A. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol* 2:283-318.
15. Ting, J.P., and Trowsdale, J. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 Suppl:S21-33.
16. Zamoyska, R. 1998. CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr Opin Immunol* 10:82-87.
17. Honey, K., and Rudensky, A.Y. 2003. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3:472-482.
18. Bryant, P., and Ploegh, H. 2004. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr Opin Immunol* 16:96-102.
19. Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137:1142-1162.
20. Shortman, K., and Liu, Y.J. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151-161.
21. Naik, S.H. 2008. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol* 86:439-452.
22. Shortman, K., and Naik, S.H. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7:19-30.
23. Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., and Shortman, K. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* 176:47-58.



24. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31:563-604.
25. Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
26. Randolph, G.J., Angeli, V., and Swartz, M.A. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5:617-628.
27. Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. 1997. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 186:239-245.
28. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
29. Wakim, L.M., Waithman, J., van Rooijen, N., Heath, W.R., and Carbone, F.R. 2008. Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* 319:198-202.
30. Heymann, F., Meyer-Schwesinger, C., Hamilton-Williams, E.E., Hammerich, L., Panzer, U., Kaden, S., Quaggin, S.E., Floege, J., Grone, H.J., and Kurts, C. 2009. Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *J Clin Invest* 119:1286-1297.
31. Riedel, J.H., Paust, H.J., Turner, J.E., Tittel, A.P., Krebs, C., Disteldorf, E., Wegscheid, C., Tiegs, G., Velden, J., Mittrucker, H.W., et al. 2012. Immature renal dendritic cells recruit regulatory CXCR6(+) invariant natural killer T cells to attenuate crescentic GN. *J Am Soc Nephrol* 23:1987-2000.
32. Tittel, A.P., Heuser, C., Ohliger, C., Knolle, P.A., Engel, D.R., and Kurts, C. 2011. Kidney dendritic cells induce innate immunity against bacterial pyelonephritis. *J Am Soc Nephrol* 22:1435-1441.
33. Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656-661.
34. Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496:445-455.
35. Shaughnessy, L.M., and Swanson, J.A. 2007. The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. *Front Biosci* 12:2683-2692.
36. Ciofani, M., and Zuniga-Pflucker, J.C. 2007. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:463-493.
37. Barry, M., and Bleackley, R.C. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2:401-409.
38. Liu, Q.J., and Gao, B. 2008. Manipulation of MHC-I/TCR interaction for immune therapy. *Cell Mol Immunol* 5:171-182.
39. Gerner, M.Y., Casey, K.A., and Mescher, M.F. 2008. Defective MHC class II presentation by dendritic cells limits CD4 T cell help for antitumor CD8 T cell responses. *J Immunol* 181:155-164.
40. Tipping, P.G., and Holdsworth, S.R. 2006. T cells in crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 17:1253-1263.
41. Murphy, K.M., and Reiner, S.L. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933-944.
42. Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453:1051-1057.
43. Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-173.
44. Stevens, T.L., Bossie, A., Sanders, V.M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R.L., Mosmann, T.R., and Vitetta, E.S. 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334:255-258.
45. Kurts, C. 2008. Th17 cells: a third subset of CD4+ T effector cells involved in organ-specific autoimmunity. *Nephrol Dial Transplant* 23:816-819.

46. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278:1910-1914.
47. Awasthi, A., and Kuchroo, V.K. 2009. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 21:489-498.
48. Bacchetta, R., Gregori, S., and Roncarolo, M.G. 2005. CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun Rev* 4:491-496.
49. Masopust, D., and Schenkel, J.M. 2013. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol* 13:309-320.
50. June, C.H., Ledbetter, J.A., Gillespie, M.M., Lindsten, T., and Thompson, C.B. 1987. T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 7:4472-4481.
51. Bretscher, P., and Cohn, M. 1970. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169:1042-1049.
52. Chen, L., and Flies, D.B. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13:227-242.
53. Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. 2010. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* 22:333-340.
54. Kurts, C., Heymann, F., Lukacs-Kornek, V., Boor, P., and Floege, J. 2007. Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology. *Semin Immunopathol* 29:317-335.
55. Mueller, D.L., Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 7:445-480.
56. Schmidt, L., Thews (Hrsg.). 2005. *Physiologie des Menschen 29. Auflage (deutsch)*.
57. Georgas, K., Rumballe, B., Wilkinson, L., Chiu, H.S., Lesieur, E., Gilbert, T., and Little, M.H. 2008. Use of dual section mRNA in situ hybridisation/immunohistochemistry to clarify gene expression patterns during the early stages of nephron development in the embryo and in the mature nephron of the adult mouse kidney. *Histochem Cell Biol* 130:927-942.
58. Haraldsson, B., and Sorensson, J. 2004. Why do we not all have proteinuria? An update of our current understanding of the glomerular barrier. *News Physiol Sci* 19:7-10.
59. Dong, X., Swaminathan, S., Bachman, L.A., Croatt, A.J., Nath, K.A., and Griffin, M.D. 2005. Antigen presentation by dendritic cells in renal lymph nodes is linked to systemic and local injury to the kidney. *Kidney Int* 68:1096-1108.
60. Assmann, K.J., Tangelder, M.M., Lange, W.P., Schrijver, G., and Koene, R.A. 1985. Anti-GBM nephritis in the mouse: severe proteinuria in the heterologous phase. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 406:285-299.
61. Timoshanko, J.R., Kitching, A.R., Holdsworth, S.R., and Tipping, P.G. 2001. Interleukin-12 from intrinsic cells is an effector of renal injury in crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 12:464-471.
62. Paust, H.J., Turner, J.E., Steinmetz, O.M., Peters, A., Heymann, F., Holscher, C., Wolf, G., Kurts, C., Mittrucker, H.W., Stahl, R.A., et al. 2009. The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 20:969-979.
63. Kitching, A.R., Turner, A.L., Wilson, G.R., Semple, T., Odobasic, D., Timoshanko, J.R., O'Sullivan, K.M., Tipping, P.G., Takeda, K., Akira, S., et al. 2005. IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J Am Soc Nephrol* 16:2023-2033.
64. Duffield, J.S., Tipping, P.G., Kipari, T., Cailhier, J.F., Clay, S., Lang, R., Bonventre, J.V., and Hughes, J. 2005. Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol* 167:1207-1219.
65. Scholz, J., Lukacs-Kornek, V., Engel, D.R., Specht, S., Kiss, E., Eitner, F., Floege, J., Groene, H.J., and Kurts, C. 2008. Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis. *J Am Soc Nephrol* 19:527-537.

66. Abbate, M., Zoja, C., and Remuzzi, G. 2006. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 17:2974-2984.
67. Strutz, F.M. 2009. EMT and proteinuria as progression factors. *Kidney Int* 75:475-481.
68. Andrews, P.M. 1977. A scanning and transmission electron microscopic comparison of puromycin aminonucleoside-induced nephrosis to hyperalbuminemia-induced proteinuria with emphasis on kidney podocyte pedicel loss. *Lab Invest* 36:183-197.
69. Bohle, A. 1982. [Importance of the renal interstitium for kidney function]. *Klin Wochenschr* 60:1186-1190.
70. Rees, A. 2009. Cross dendritic cells anger T cells after kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 20:3-5.
71. Koch, K.-M. 2000. *Klinische Nephrologie*. Jena.
72. Mulvey, M.A., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Roth, R., Parks, W.C., Heuser, J., and Hultgren, S.J. 1998. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282:1494-1497.
73. Beauchamp, D., and Bergeron, M.G. 1999. Pharmacologic Basis for the Treatment of Pyelonephritis. *Curr Infect Dis Rep* 1:371-378.
74. Hewitt, I.K., Zucchetta, P., Rigon, L., Maschio, F., Molinari, P.P., Tomasi, L., Toffolo, A., Pavanello, L., Crivellaro, C., Bellato, S., et al. 2008. Early treatment of acute pyelonephritis in children fails to reduce renal scarring: data from the Italian Renal Infection Study Trials. *Pediatrics* 122:486-490.
75. Hang, L., Haraoka, M., Agace, W.W., Leffler, H., Burdick, M., Strieter, R., and Svanborg, C. 1999. Macrophage inflammatory protein-2 is required for neutrophil passage across the epithelial barrier of the infected urinary tract. *J Immunol* 162:3037-3044.
76. Soos, T.J., Sims, T.N., Barisoni, L., Lin, K., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Nelson, P.J. 2006. CX3CR1+ interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney. *Kidney Int* 70:591-596.
77. Kruger, T., Benke, D., Eitner, F., Lang, A., Wirtz, M., Hamilton-Williams, E.E., Engel, D., Giese, B., Muller-Newen, G., Floege, J., et al. 2004. Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 15:613-621.
78. Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., et al. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med* 206:3115-3130.
79. Hume, D.A., and Gordon, S. 1983. Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtaglomerular complex. *J Exp Med* 157:1704-1709.
80. Miller, J.C., Brown, B.D., Shay, T., Gautier, E.L., Jojic, V., Cohain, A., Pandey, G., Leboeuf, M., Elpek, K.G., Helft, J., et al. 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13:888-899.
81. Dong, X., Swaminathan, S., Bachman, L.A., Croatt, A.J., Nath, K.A., and Griffin, M.D. 2007. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 71:619-628.
82. Edgton, K.L., Kausman, J.Y., Li, M., O'Sullivan, K., Lo, C., Hutchinson, P., Yagita, H., Holdsworth, S.R., and Kitching, A.R. 2008. Intrarenal antigens activate CD4+ cells via co-stimulatory signals from dendritic cells. *J Am Soc Nephrol* 19:515-526.
83. Roake, J.A., Rao, A.S., Morris, P.J., Larsen, C.P., Hankins, D.F., and Austyn, J.M. 1995. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med* 181:2237-2247.
84. Lukacs-Kornek, V., Burgdorf, S., Diehl, L., Specht, S., Kornek, M., and Kurts, C. 2008. The kidney-renal lymph node-system contributes to cross-tolerance against innocuous circulating antigen. *J Immunol* 180:706-715.
85. Hochheiser, K., Tittel, A., and Kurts, C. 2011. Kidney dendritic cells in acute and chronic renal disease. *Int J Exp Pathol* 92:193-201.

86. Tadagavadi, R.K., and Reeves, W.B. Renal dendritic cells ameliorate nephrotoxic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 21:53-63.
87. Dong, X., Bachman, L.A., Miller, M.N., Nath, K.A., and Griffin, M.D. 2008. Dendritic cells facilitate accumulation of IL-17 T cells in the kidney following acute renal obstruction. *Kidney Int* 74:1294-1309.
88. Iwata, Y., Furuichi, K., Sakai, N., Yamauchi, H., Shinozaki, Y., Zhou, H., Kurokawa, Y., Toyama, T., Kitajima, S., Okumura, T., et al. 2009. Dendritic cells contribute to autoimmune kidney injury in MRL-Fas<sup>lpr</sup> mice. *J Rheumatol* 36:306-314.
89. Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52:145-176.
90. Landsman, L., Bar-On, L., Zerneck, A., Kim, K.W., Krauthgamer, R., Shagdarsuren, E., Lira, S.A., Weissman, I.L., Weber, C., and Jung, S. 2009. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 113:963-972.
91. Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33.
92. Islam, S.A., and Luster, A.D. 2012. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med* 18:705-715.
93. Bromley, S.K., Mempel, T.R., and Luster, A.D. 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* 9:970-980.
94. Saeki, H., Moore, A.M., Brown, M.J., and Hwang, S.T. 1999. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 162:2472-2475.
95. Eash, K.J., Greenbaum, A.M., Gopalan, P.K., and Link, D.C. 2010. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest* 120:2423-2431.
96. Serbina, N.V., and Pamer, E.G. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7:311-317.
97. Sigmundsdottir, H., and Butcher, E.C. 2008. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* 9:981-987.
98. Mora, J.R., Bono, M.R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L.L., Rosenthal, M., and Von Andrian, U.H. 2003. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 424:88-93.
99. Uehara, S., Grinberg, A., Farber, J.M., and Love, P.E. 2002. A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J Immunol* 168:2811-2819.
100. Hadeiba, H., Lahl, K., Edalati, A., Oderup, C., Habtezion, A., Pachynski, R., Nguyen, L., Ghodsi, A., Adler, S., and Butcher, E.C. 2012. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity* 36:438-450.
101. Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D.P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., et al. 1999. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 400:776-780.
102. Panina-Bordignon, P., Papi, A., Mariani, M., Di Lucia, P., Casoni, G., Bellettato, C., Buonsanti, C., Miotto, D., Mapp, C., Villa, A., et al. 2001. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J Clin Invest* 107:1357-1364.
103. Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., and Schall, T.J. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385:640-644.
104. Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20:4106-4114.

105. Lyszkiewicz, M., Witzlau, K., Pommerencke, J., and Krueger, A. 2011. Chemokine receptor CX3CR1 promotes dendritic cell development under steady-state conditions. *Eur J Immunol* 41:1256-1265.
106. Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., et al. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307:254-258.
107. Medina-Contreras, O., Geem, D., Laur, O., Williams, I.R., Lira, S.A., Nusrat, A., Parkos, C.A., and Denning, T.L. 2011. CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *J Clin Invest* 121:4787-4795.
108. Lee, Y.S., Morinaga, H., Kim, J.J., Lagakos, W., Taylor, S., Keshwani, M., Perkins, G., Dong, H., Kayali, A.G., Sweet, I.R., et al. 2013. The fractalkine/CX3CR1 system regulates beta cell function and insulin secretion. *Cell* 153:413-425.
109. Haskell, C.A., Hancock, W.W., Salant, D.J., Gao, W., Csizmadia, V., Peters, W., Faia, K., Fituri, O., Rottman, J.B., and Charo, I.F. 2001. Targeted deletion of CX(3)CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection. *J Clin Invest* 108:679-688.
110. Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T.J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., et al. 2007. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 117:185-194.
111. Lesnik, P., Haskell, C.A., and Charo, I.F. 2003. Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest* 111:333-340.
112. Bonduelle, O., Duffy, D., Verrier, B., Combadiere, C., and Combadiere, B. 2012. Cutting edge: Protective effect of CX3CR1<sup>+</sup> dendritic cells in a vaccinia virus pulmonary infection model. *J Immunol* 188:952-956.
113. Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., et al. 2009. CX3CR1<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>+</sup> common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 206:595-606.
114. Karlmark, K.R., Zimmermann, H.W., Roderburg, C., Gassler, N., Wasmuth, H.E., Luedde, T., Trautwein, C., and Tacke, F. 2010. The fractalkine receptor CX(3)CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. *Hepatology* 52:1769-1782.
115. Combadiere, C., Feumi, C., Raoul, W., Keller, N., Rodero, M., Pezard, A., Lavalette, S., Housier, M., Jonet, L., Picard, E., et al. 2007. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 117:2920-2928.
116. Kim, K.W., Vallon-Eberhard, A., Zigmond, E., Farache, J., Shezen, E., Shakhar, G., Ludwig, A., Lira, S.A., and Jung, S. 2011. In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood* 118:e156-167.
117. Li, L., Huang, L., Sung, S.S., Vergis, A.L., Rosin, D.L., Rose, C.E., Jr., Lobo, P.I., and Okusa, M.D. 2008. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 74:1526-1537.
118. Furuichi, K., Gao, J.L., and Murphy, P.M. 2006. Chemokine receptor CX3CR1 regulates renal interstitial fibrosis after ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 169:372-387.
119. Shimizu, K., Furuichi, K., Sakai, N., Kitagawa, K., Matsushima, K., Mukaida, N., Kaneko, S., and Wada, T. 2011. Fractalkine and its receptor, CX3CR1, promote hypertensive interstitial fibrosis in the kidney. *Hypertens Res* 34:747-752.
120. Nakatani, K., Yoshimoto, S., Iwano, M., Asai, O., Samejima, K., Sakan, H., Terada, M., Hasegawa, H., Nose, M., and Saito, Y. 2010. Fractalkine expression and CD16<sup>+</sup> monocyte accumulation in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F207-216.
121. Cockwell, P., Chakravorty, S.J., Girdlestone, J., and Savage, C.O. 2002. Fractalkine expression in human renal inflammation. *J Pathol* 196:85-90.

122. Segerer, S., Hughes, E., Hudkins, K.L., Mack, M., Goodpaster, T., and Alpers, C.E. 2002. Expression of the fractalkine receptor (CX3CR1) in human kidney diseases. *Kidney Int* 62:488-495.
123. Hoffmann, U., Bergler, T., Segerer, S., Rummele, P., Kruger, B., Banas, M.C., Reinhold, S., Banas, B., and Kramer, B.K. 2010. Impact of chemokine receptor CX3CR1 in human renal allograft rejection. *Transpl Immunol* 23:204-208.
124. Cox, S.N., Sallustio, F., Serino, G., Loverre, A., Pesce, F., Gigante, M., Zaza, G., Stifanelli, P.F., Ancona, N., and Schena, F.P. 2012. Activated innate immunity and the involvement of CX3CR1-fractalkine in promoting hematuria in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int* 82:548-560.
125. Feng, L., Chen, S., Garcia, G.E., Xia, Y., Siani, M.A., Botti, P., Wilson, C.B., Harrison, J.K., and Bacon, K.B. 1999. Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX3CR1 rapid communication. *Kidney Int* 56:612-620.
126. Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., et al. 2002. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17:211-220.
127. Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76:34-40.
128. Ruth, A.J., Kitching, A.R., Li, M., Semple, T.J., Timoshanko, J.R., Tipping, P.G., and Holdsworth, S.R. 2004. An IL-12-independent role for CD40-CD154 in mediating effector responses: studies in cell-mediated glomerulonephritis and dermal delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 173:136-144.
129. Odobasic, D., Kitching, A.R., Tipping, P.G., and Holdsworth, S.R. 2005. CD80 and CD86 costimulatory molecules regulate crescentic glomerulonephritis by different mechanisms. *Kidney Int* 68:584-594.
130. Odobasic, D., Kitching, A.R., Semple, T.J., and Holdsworth, S.R. 2006. Inducible co-stimulatory molecule ligand is protective during the induction and effector phases of crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 17:1044-1053.
131. Kitching, A.R., Holdsworth, S.R., and Tipping, P.G. 1999. IFN-gamma mediates crescent formation and cell-mediated immune injury in murine glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 10:752-759.
132. Timoshanko, J.R., Sedgwick, J.D., Holdsworth, S.R., and Tipping, P.G. 2003. Intrinsic renal cells are the major source of tumor necrosis factor contributing to renal injury in murine crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 14:1785-1793.
133. Turner, J.E., Paust, H.J., Bennstein, S.B., Bramke, P., Krebs, C., Steinmetz, O.M., Velden, J., Haag, F., Stahl, R.A., and Panzer, U. 2012. Protective role for CCR5 in murine lupus nephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 302:F1503-1515.
134. Paust, H.J., Turner, J.E., Riedel, J.H., Disteldorf, E., Peters, A., Schmidt, T., Krebs, C., Velden, J., Mittrucker, H.W., Steinmetz, O.M., et al. 2012. Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 82:72-83.
135. Macconi, D., Chiabrando, C., Schiarea, S., Aiello, S., Cassis, L., Gagliardini, E., Noris, M., Buelli, S., Zoja, C., Corna, D., et al. 2009. Proteasomal processing of albumin by renal dendritic cells generates antigenic peptides. *J Am Soc Nephrol* 20:123-130.
136. Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D.A., Mowat, A.M., and Randolph, G.J. 2010. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 10:453-460.
137. Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. 2005. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307:1630-1634.
138. Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A., and Kuchroo, V.K. 2013. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* 496:513-517.

139. Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakana, H., Yosef, N., Linker, R.A., Muller, D.N., and Hafler, D.A. 2013. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* 496:518-522.
140. Machnik, A., Neuhofer, W., Jantsch, J., Dahlmann, A., Tammela, T., Machura, K., Park, J.K., Beck, F.X., Muller, D.N., Derer, W., et al. 2009. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med* 15:545-552.
141. Nelson, P.J., Rees, A.J., Griffin, M.D., Hughes, J., Kurts, C., and Duffield, J. 2012. The renal mononuclear phagocytic system. *J Am Soc Nephrol* 23:194-203.
142. Panzer, U., Steinmetz, O.M., Stahl, R.A., and Wolf, G. 2006. Kidney diseases and chemokines. *Curr Drug Targets* 7:65-80.
143. Turner, J.E., Paust, H.J., Steinmetz, O.M., Peters, A., Meyer-Schwesinger, C., Heymann, F., Helmchen, U., Fehr, S., Horuk, R., Wenzel, U., et al. 2008. CCR5 deficiency aggravates crescentic glomerulonephritis in mice. *J Immunol* 181:6546-6556.
144. Tipping, P.G., Huang, X.R., Qi, M., Van, G.Y., and Tang, W.W. 1998. Crescentic glomerulonephritis in CD4- and CD8-deficient mice. Requirement for CD4 but not CD8 cells. *Am J Pathol* 152:1541-1548.
145. Timoshanko, J.R., Kitching, A.R., Semple, T.J., Tipping, P.G., and Holdsworth, S.R. 2006. A pathogenetic role for mast cells in experimental crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 17:150-159.
146. Tittel, A.P., Heuser, C., Ohliger, C., Llanto, C., Yona, S., Hammerling, G.J., Engel, D.R., Garbi, N., and Kurts, C. 2012. Functionally relevant neutrophilia in CD11c diphtheria toxin receptor transgenic mice. *Nat Methods* 9:385-390.
147. Ryan, J., Ma, F.Y., Kanellis, J., Delgado, M., Bleasdale, K., and Nikolic-Paterson, D.J. 2011. Spleen tyrosine kinase promotes acute neutrophil-mediated glomerular injury via activation of JNK and p38 MAPK in rat nephrotoxic serum nephritis. *Lab Invest* 91:1727-1738.
148. Chassin, C., Goujon, J.M., Darche, S., du Merle, L., Bens, M., Cluzeaud, F., Werts, C., Ogier-Denis, E., Le Bouguenec, C., Buzoni-Gatel, D., et al. 2006. Renal collecting duct epithelial cells react to pyelonephritis-associated Escherichia coli by activating distinct TLR4-dependent and -independent inflammatory pathways. *J Immunol* 177:4773-4784.
149. Samuelsson, P., Hang, L., Wullt, B., Irjala, H., and Svanborg, C. 2004. Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Infect Immun* 72:3179-3186.
150. Patole, P.S., Schubert, S., Hildinger, K., Khandoga, S., Khandoga, A., Segerer, S., Henger, A., Kretzler, M., Werner, M., Krombach, F., et al. 2005. Toll-like receptor-4: renal cells and bone marrow cells signal for neutrophil recruitment during pyelonephritis. *Kidney Int* 68:2582-2587.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzung Erklärung

Abkürzung	Erklärung
APC	Antigen-präsentierende Zelle (Antigen presenting cell)
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	Differenzierungs-Cluster (Cluster of differentiation)
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CFU	Kolonie-bildende Einheiten (Colony forming units); Maß für Bakterienlast
CLIP	Klasse II assoziiertes Invariante Kette Peptid (Class II associated invariant chain peptid)
Cortex	Nierenrinde (Cortex renalis)
CTL	Cytotoxischer T-Zelle (Lymphozyt)
DC	Dendritische Zelle (Dendritic cell)
DTH	Hypersensitivität vom verspäteten Typ (Delayed Type Hypersensitivity)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylene diamine tetraacetic acid)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (Fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Kalb-Serum (Fetal calf serum)
GN	Glomerulonephritis
HSR	Hypersensitivitätsreaktion
IFN	Interferon
Ii	Invariante Kette
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
MACS	Magnetisch-aktivierte Zellsortierung (Magnetic activated cell sorting)
MFI	Durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (Mean fluorescence intensity)
Medulla	Nierenmark (Medulla renalis)
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex (Major histocompatibility complex)
MP	Makrophage
NTN	Nephrotoxische Nephritis
NTS	Nephrotoxisches Serum
OPD	o-Phenylendiamin
OT-II Zelle	Transgene CD4 <sup>+</sup> T-Zellen, die OVA-stämmiges Peptid im Kontext von MHC-II erkennen



OVA	Ovalbumin
PAS	Perjodsäure-Schiffsches Reagenz Reaktion(Periodic acid-Schiff reaction)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PMA	Phorbol 12-myristat-13-acetat
PN	Pyelonephritis
RI	Reperusions-Ischämie
RPMI	Zellkulturmedium, das am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde
SLOs	Sekundäre lymphatische Organe
Th-Zelle	CD4 <sup>+</sup> T-Helfer Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β (Transforming growth factor β)
Treg	Regulatorische T-Zelle
UPEC	Uropathogene Escherichia coli
UUO	Unilaterale Ureter-Obstruktion
wt	Wildtyp Maus (nicht transgene Maus)

## 10 Publikationsliste

Semmling V, Lukacs-Kornek V, Thaiss CA, Quast T, **Hochheiser K**, Panzer U, Rossjohn J, Perlmutter P, Cao J, Godfrey DI, Savage PB, Knolle PA, Kolanus W, Förster I, Kurts C. *Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs*. **Nat Immunol**. 2010

Burgdorf S, Schuette V, Semmling V, **Hochheiser K**, Lukacs-Kornek V, Knolle PA, Kurts C. *Steady-state cross-presentation of OVA is mannose receptor-dependent but inhibitable by collagen fragments*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2010

**Hochheiser K**, Tittel A, Kurts C. *Kidney dendritic cells in acute and chronic renal disease*. **Int J Exp Pathol**. 2010.

**Hochheiser K**, Engel DR, Hammerich L, Heymann F, Knolle PA, Panzer U, Kurts C. *Kidney dendritic cells become pathogenic during nephrotoxic nephritis with proteinuria*. **J Am Soc Nephrol**. 2011

Ooi DL, Snelgrove SL, Engel DR, **Hochheiser K**, Ludwig-Portugall I, Nozaki Y, O'Sullivan KM, Hickey MJ, Holdsworth SR, Kurts C, Kitching AR. *Endogenous Foxp3+ T regulatory cells suppress anti-GBM nephritis*. **Kidney Int**. 2011

Teteris SA, **Hochheiser K**, Kurts C *Isolation of functional dendritic cells from murine kidneys for immunological characterization*. **Nephrology** (Carlton). 2012

Thimm D, Schiedel AC, Sherbiny FF, Hinz S, **Hochheiser K**, Bertarelli DC, Maass A, Müller CE. *Ligand-specific binding and activation of the human adenosine A<sub>2B</sub> receptor*. **Biochemistry**. 2013

**Hochheiser K**, Heuser C, Krause TA, Teteris S, Ilias A, Weisheit C, Hoss F, Tittel AP, Knolle PA, Panzer U, Engel DR, Tharaux PL, Kurts C. *Exclusive CX<sub>3</sub>CR1-dependence of kidney dendritic cells impacts glomerulonephritis progression*. Im Druck bei **J Clin Inv**.