

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

CD4+-Zelldepletion durch MDM2-Deletion vermindert bei Mäusen die Nierenschädigung in der akuten und in der späten Phase der nephrotoxischen Serum-Nephritis

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jakob Simon Molnar

aus Eisenstadt

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Klaus Parhofer
PD Dr. Dejana Mokranjac

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. med. Dana Thomasova, Ph.D.

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hicckel

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2019

Eidesstattliche Versicherung

von Jakob Simon Molnar

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Folgende Personen haben an der Durchführung dieser Arbeit mitgewirkt:

- PD Dr. Dana Thomasova, Ph.D., LMU München
Sie war als Expertin eine wichtige Betreuungsperson und fertigte Aufnahmen der immunhistologischen Schnitte an.
- Dr. Stefanie Steiger, Ph.D., LMU München
Mit ihrer Hilfe wurden die Durchflusszytometrien durchgeführt.
- Janina Mandelbaum und Dan Draganovici, LMU München
Sie fertigten die histologischen Schnitte an und führten die Genotypisierungen der Versuchstiere durch.
- Martrez Nabil Zaki Ebrahim, LMU München
Sie unterstützte bei den Experimenten und pflegte die Versuchstiere.

München, 29.07.2019

Ort, Datum

Jakob Molnar

Jakob Molnar

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Februar 2016 und Juli 2017 im Nephrologischen Zentrum der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV an der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. med. Hans Joachim Anders betreut.

Förderung des Projekts:

Diese Arbeit wurde durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Ludwig-Maximilians-Universität unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Gudermann gefördert.

Aus dem Projekt hervorgegangene Veröffentlichungen:

Vortrag:

Berichtskolloquium des Förderprogramms Forschung & Lehre 2017, Herrsching: Molnar J., Thomasova, D., Anders H.-J.: CD4-spezifische MDM2-Deletion hat im Mausmodell CD4+-Zelldepletion zur Folge und hat einen nierenprotektiven Effekt im Anti-GBM-Modell.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	3
1.1	Die glomeruläre Filtrationsbarriere	3
1.1.1	Das Kapillarendothel	3
1.1.2	Die glomeruläre Basalmembran (GBM)	4
1.1.3	Das Epithel der Filtrationsbarriere	5
1.2	Das akute Nierenversagen	5
1.3	Die rapid progressive Glomerulonephritis (RPGN)	8
1.3.1	Die Immunkomplexnephritis und Anti-GBM-Glomerulonephritis	9
1.4	Die angeborene und adaptive Immunantwort	12
1.4.1	CD4+-T-Lymphozyten	15
1.5	Das CD4-Protein	20
1.6	p53 und MDM2	21
1.6.1	Das p53-Protein	21
1.6.2	Das MDM2-Protein	23
2	HYPOTHESE	27
3	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1	Versuchstiere	29
3.2	Material	29
3.3	Chemikalien, Puffer und Lösungen	33
3.4	Tierexperimentelle Methoden	37
3.4.1	Cre/LoxP-System	37
3.4.2	Genotypisierung	38
3.4.3	Tierhaltung	41
3.4.4	Markierung und Probennahme für die Genotypisierung	42
3.4.5	Anästhesie und Probengewinnung	43
3.4.6	Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)	44
3.4.7	Anti-GBM-Nierenschädigungsmodell	45
3.4.8	CD4-Zelldepletion durch monoklonalen Antikörper	46
3.5	Analytische Methoden	47
3.5.1	Analyse von Expressionsschemata der Gewebe	47
3.5.2	Kreatininmessung	50
3.5.3	Messung der Serumkonzentration von Harnstoff-Stickstoff	51
3.5.4	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	51
3.5.5	Durchflusszytometrie	54
3.6	Methoden der Zellkultur	56
3.6.1	Isolation von Splenozyten	56
3.6.2	T-Zell-Aktivierung	57
3.6.3	Trypsinisierung von Zellen	57
3.7	Histologische Methoden	58
3.7.1	Perjodsäure Schiff Färbung	58
3.7.2	Immunhistochemie	58

3.7.3	Immunfluoreszenz	59
3.8	Statistische Methoden	60
4	ERGEBNISSE	61
4.1	<i>Cd4CreMdm2^{fl/fl}</i> -Genmodifikation resultiert in partieller CD4-Zelldepletion	61
4.2	Die Anti-GBM-Immunglobuline binden spezifisch an der Basalmembran	62
4.3	<i>Mdm2</i> -Defizienz in CD4-Zellen hat im Anti-GBM-Modell mit Präimmunisierung einen protektiven Effekt	64
4.3.1	150µl-Dosis Anti-GBM-Serum	65
4.3.2	100µl-Dosis Anti-GBM-Serum	69
4.3.3	200µl-Dosis Anti-GBM-Serum	71
4.4	Anti-GBM-Modell ohne Präimmunisierung resultiert in geringerer Proteinurie	75
4.4.1	100µl Dosis Anti-GBM-Serum	76
4.4.2	200µl Dosis Anti-GBM-Serum	77
4.5	Mit Präimmunisierung hat <i>Mdm2</i> -Defizienz in CD4-Zellen in der frühen Phase einen protektiven Effekt	79
4.6	Ohne Präimmunisierung gibt es in der frühen Phase keinen Unterschied in der Proteinurie	83
4.7	CD4-Zell-Depletion durch Antikörper hat keinen Vorteil im Anti-GBM-Modell mit Präimmunisierung	86
5	DISKUSSION	88
5.1	<i>Mdm2</i> -Defizienz in CD4-Zellen führt zu partieller Depletion von CD4+-T-Lymphozyten	88
5.2	<i>Mdm2</i> -Defizienz in CD4-Zellen vermindert das akute Entzündungsgeschehen im Anti-GBM-Modell	90
5.3	<i>Mdm2</i> -Defizienz in CD4-Zellen wirkt im Anti-GBM-Modell protektiv gegen tubuläre Schädigung	93
5.4	Die Immunkomplexnephritis konnte im Verlauf nicht nachgewiesen werden	94
5.5	MDM2-Inhibitoren sind erfolgsversprechend, therapeutisch bei RPGN eingesetzt zu werden	95
5.6	Limitationen der Studie	96
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	99
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	103
9	TABELLENVERZEICHNIS	105
10	REFERENZEN	106
11	DANKSAGUNG	113

1 Einleitung

1.1 Die glomeruläre Filtrationsbarriere

Die Niere hat neben endokrinologischen, homöostatischen und metabolischen Funktionen die Hauptaufgabe, das Blut im Körperkreislauf stetig von harnpflichtigen Stoffen zu befreien. Dies geschieht durch Filtration des durch die Nierenarterie zugeführten Blutes im Nierenkörperchen, dem Glomerulus. Die *Vas afferens*, die zuführende Arteriole, leitet das Blut in das komplexe Kapillarkonvolut, in dem die Filtration stattfindet. Insgesamt werden etwa 20 Prozent des zugeführten Blutplasmas durch die Filtrationsbarriere gepresst, was beim Menschen einer absoluten Filtrationsleistung von durchschnittlich 125ml pro Minute entspricht (glomeruläre Filtrationsrate, GFR).

Durch die Filtration wird im Bowman'schen Kapselraum ein Ultrafiltrat generiert, das nur für Moleküle bis zu einer Größe von etwa 1,8nm und einer Molekülmasse bis etwa 50kDa durchlässig ist. Myoglobin mit 17kDa wird noch zu 75% filtriert, während Albumin mit 69kDa nur zu etwa 0,03% die Filtrationsbarriere überwinden kann (Filtrationskoeffizient).

Durch verschiedene schädigende Mechanismen pathogener Vorgänge können die Filtrationsfläche sowie die hydraulische Leitfähigkeit der filtrierenden Funktionseinheit verringert werden. In den vorgestellten Experimenten wurde durch die Injektion von Anti-GBM-Serum die Filtrationsbarriere direkt angegriffen, weshalb hier ein Fokus auf dieses anatomische Konstrukt gerichtet wird.

Die Filtrationsbarriere besteht aus drei Teilen:

- dem fenestrierten Kapillarendothel
- der glomerulären Basalmembran
- und Podozyten

Das regulierte Zusammenspiel der drei Bestandteile ist sowohl für die Funktion als auch für die Entwicklung der Niere von größter Bedeutung.

1.1.1 Das Kapillarendothel

Die glomerulären Kapillaren bestehen aus fenestriertem Endothel. Es besteht nur aus einer Zellschicht und hat im Gegensatz zu kontinuierlichen und diskontinuierlichen Kapillarendothelien Fenestrationsporen, also transzytoplasmische Poren mit 60-80nm Durchmesser [2]. Die Endothelzelle selbst nimmt wichtige Funktionen im Entzündungsgeschehen, Blutkoagulation und Tonus der

glatten Muskulatur ein. Sie trägt an ihrer Oberfläche eine Glykokalyx aus Proteoglykanen und Glykoproteinen mit vielen Funktionen wie Signal- und Rezeptorfunktion, Mechanotransduktion und Interaktionen der Blutzelle mit dem Endothel [3]. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) der Kapillarzelle verdient ihren hohen Stellenwert durch Einflüsse im Muskeltonus, dem Entzündungsgeschehen durch die Inhibierung von Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) und der antioxidativen Wirkung [4].

1.1.2 Die glomeruläre Basalmembran (GBM)

Die Basalmembran ist die nicht-zelluläre Mittelschicht der Filtrationsbarriere aus einem Netz von zusammenhängenden Proteinen. Sie ist 250-400nm dick und ist neben der Stabilisation der Glomerulusstruktur eine mechanische Barriere zur Ladungs- und Größenselektivität. Außerdem bietet sie mit ihren einzelnen Komponenten auch Liganden für Rezeptoren der angrenzenden Mesangial- und Endothelzellen sowie der Podozyten, was vor allem in der Entwicklung einen großen Einfluss zu haben scheint [5].

Die GBM wird in der Entwicklung sowohl von Podozyten als auch von den Endothelzellen aufgebaut, wobei die jeweiligen Zellen für bestimmte Proteine zuständig sind [6-8]. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man, dass die Basalmembran aus drei Schichten aufgebaut ist (s. Abbildung 1):

- Lamina rara externa
- Lamina densa
- Lamina rara interna.

Die Hauptkomponenten sind wie auch in anderen Basalmembranen Laminin, Kollagen Typ IV, Heparansulfat, Proteoglykane und Nidogen, welche untereinander systematisch vernetzt sind [9].

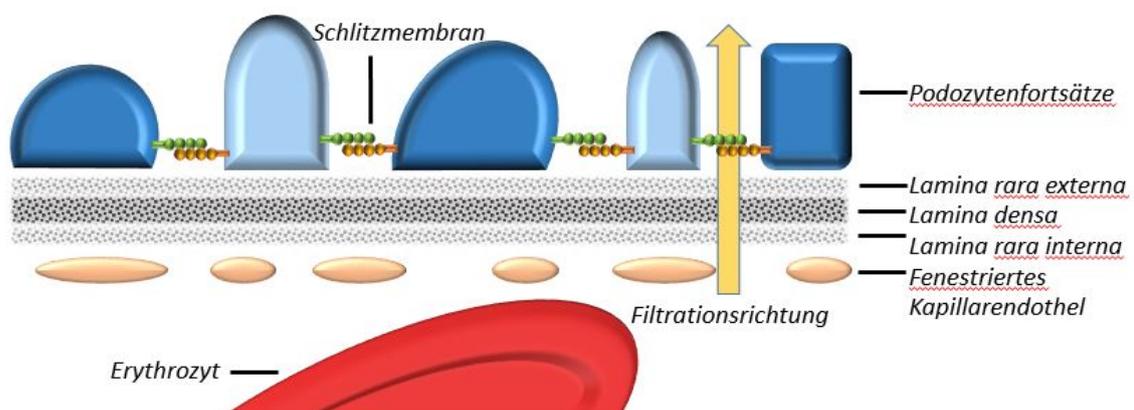


Abbildung 1: Die glomeruläre Filtrationsbarriere.

1.1.3 Das Epithel der Filtrationsbarriere

Die Bowman'sche Kapsel besteht aus dem parietalen Blatt, dem Bowman'schen Raum in dem der Primärharn gesammelt wird und dem viszerale Blatt. Das viszerale Epithel wird rein von Podozyten gebildet, welche aus dem Zellkörper, den primären und den sekundären Fortsätzen bestehen. Die Podozytenfortsätze sind im Reißverschlussystem angeordnet, sodass sich die Fortsätze unterschiedlicher Zellen abwechseln. Sie sind durch die sogenannte Schlitzmembran miteinander verbunden, welche die Permeabilität dieser Schicht gewährleistet.

Die Schlitzmembran ist ein komplexer extrazellulärer Aufbau aus spezifischen Proteinen wie Nephrin, Podocin, CD2AP und Neph1 und typischen Zelladhäsionsproteinen wie P-Cadherin und Catenin [10]. Diese Proteine sind mit dem Zytoskelett der Podozytenfortsätze verbunden und haben die Möglichkeit, durch Signale die Zellmorphologie und Permeabilität zu regulieren. Dies geschieht durch Signaltransduktionskaskaden beispielsweise durch Phosphorylierungen von Nephrin durch Enzyme wie die Phosphoinositid 3-Kinase, was die Neuordnung von Aktinfilamenten in den Fortsätzen bewirkt [11].

Die glomeruläre Filtrationsbarriere muss als Einheit die erforderliche Filtration gewährleisten. Durch die Vielzahl an Krankheiten in Bezug auf dieses Konstrukt ist ein Fokus der Forschung auf die Pathogenese der Schäden nachvollziehbar.

Die Nieren sind durch eine Vielzahl an Erkrankungen bedroht. Dazu gehört das akute Nierenversagen, welches in vielen Fällen zu Niereninsuffizienz führt.

1.2 Das akute Nierenversagen

Das akute Nierenversagen (ANV) ist ein lebensgefährlicher Zustand verschiedenster Ursachen mit seit Jahren steigender Inzidenz [12]. Die Deutsche Gesellschaft für Nephrologie definiert: „Beim akuten Nierenversagen (engl. acute kidney injury; AKI) kommt es zu einem raschen Abfall der GFR. Ein akutes Nierenversagen liegt bei Anstieg des Serumkreatinins von einem gemessenen oder angenommenen Ausgangswert um mehr als 50% innerhalb von 7 Tagen oder bei einem Anstieg über einen gemessenen Ausgangswert um mehr als 0,3 mg/dl innerhalb von 48 Stunden vor. Außerdem liegt ein akutes Nierenversagen bei nicht dehydrierten Patienten mit einer gemessenen Urinausscheidung von weniger als 0,5 ml/kg/h in 6 Stunden vor [13]“. Zusätzlich kommt es bei Ausfall der Nierenfunktion zu Blutdruck- und Elektrolytstörungen, einem Anstieg der

Harnstoffkonzentration im Blut, Ödemen aufgrund der Unfähigkeit zur Volumenregulation und Azidose [14].

Der Anstieg der Inzidenzrate wird unter anderem mit sensitiveren diagnostischen Methoden, der alternden Gesellschaft, dem vermehrten Auftreten von Kreislauf- und Gefäßerkrankungen und Diabetes mellitus sowie der breiteren Exposition durch nephrotoxische Substanzen begründet [15]. Bis zu zwei Drittel der intensivpflichtigen Patienten leiden unter einem akutem Nierenversagen [16]. Zur Diagnostik gibt es aktuell die RIFLE und die AKIN Klassifikationsmethode [17]. Beide Methoden fußen auf der Bestimmung des Serumkreatinins und der Urinausscheidung [18]. Das mittlere Alter von Patienten mit ANV ist je nach Studie unterschiedlich, aber liegt im Bereich von 64 [1] und 77 Jahren [19], wobei in den meisten Fällen bereits vorher eine verminderte Nierenleistung vorgelegen hat.

Es gibt verschiedene Umstände, die zu akutem Nierenversagen führen können. Man unterteilt diese in prärenale, intrarenale und postrenale Ursachen. Prärenalem Nierenversagen liegt meist ein Engpass der Blutversorgung zugrunde. Dies kann durch Herzversagen, toxisch bedingter Vasokonstriktion oder auch durch Volumenmangel geschehen. Die Sepsis ist etwa für die Hälfte aller ANV verantwortlich und somit der häufigste Grund für ein akutes Nierenversagen [20]. Intrarenales Nierenversagen, kann mannigfaltige Ursachen haben. Es kann toxisch, infektiös, metabolisch oder perfusionsbedingt durch Embolien oder Kristalle entstehen. Auch eine Hämolyse kann renales Nierenversagen auslösen, da die freien Hämoglobin-Moleküle nicht mehr in ausreichendem Maß von Haptoglobin gebunden werden können. Die dabei entstehenden Hämoglobin-Dimere werden filtrierte und schädigen vor allem proximale Tubulusepithelzellen [21]. In gleichem Maße können auch immunologische Prozesse ein intrarenales Nierenversagen verursachen, indem Immunzellen und immunologisch aktive Proteine die Nierenstrukturen angreifen. Postrenal führt ein Rückstau von Harn zu akutem Nierenversagen. In den meisten Fällen verhindert die benigne Prostatahyperplasie den Harnabfluss und führt zu einem Rückstau von Harn in die Niere, was eine Druckatrophie auslöst und zu einer Hydronephrose führt [22]. Zu dem gleichen Mechanismus können auch einengende Tumoren, Harnsteine oder verstopfte Katheter führen.

Die Therapie richtet sich nach der Ursache, wobei generell als oberste Prämisse gilt, weiteren Nierenschaden zu vermeiden. Je nach dem erfolgen Herzmanagement, Therapie zur Wiederherstellung des Elektrolythaushaltes und des pH-Wertes im Blut, Behandlung von

Lungenödemen und andere symptomorientierte Methoden unter Zuhilfenahme von Pharmazeutika wie Diuretika, Betablockern und Vasopressoren [14, 23].

Die Klassifikationsmethoden RIFLE und AKIN sind laut mehreren Studien gute Prädiktoren für die Prognosen von Patienten mit ANV, wobei mit den Stadien die Mortalität und Dialysepflichtigkeit ansteigt [24]. Sechs Monate nach Auftreten eines ANV liegt die Mortalität der Patienten bei 50% oder noch höher, wobei Patienten mit bereits davor eingeschränkter Nierenfunktion eine erheblich schlechtere Prognose von 63% Mortalität aufweisen [19].

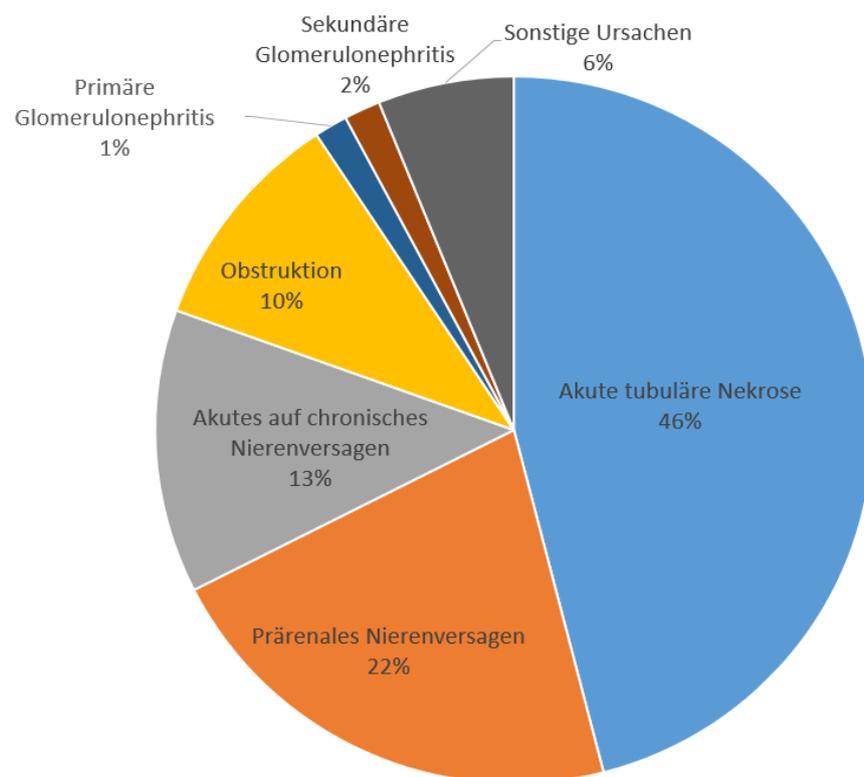


Abbildung 2: Verschiedene Ursachen für das akute Nierenversagen. Unter sonstige Ursachen fallen vaskuläre Genesen, Vaskulitiden, kortikale Nekrosen oder unbekannte Mechanismen. Die ATN führt am häufigsten zum ANV, während Glomerulonephritiden eine seltene Ursache darstellen (nach Liaño et al.; [1]).

Die akute tubuläre Nekrose (Acute Tubular Necrosis, ATN) beschreibt den raschen Zelluntergang von Tubulusepithelzellen und kann durch prärenale oder intrarenale Ursachen zum ANV führen. ATN hat unter allen spezifischen Ursachen des akuten Nierenversagens den größten Anteil, während Glomerulonephritiden relativ selten zum ANV führen (s. Abbildung 2).

Die Glomerulonephritiden, zu denen auch die rapid progressive Glomerulonephritis (RPGN) gehört, werden in primär oder sekundär eingeteilt, je nachdem ob die Erkrankung in der Niere entsteht oder durch eine systemische Begleiterkrankung mitgeschädigt wird. Sie sind eine

spannende Entität, welche ein Verständnis für die Immunologie und Nierenphysiologie voraussetzt.

1.3 Die rapid progressive Glomerulonephritis (RPGN)

Die rapid progressive Glomerulonephritis geht mit einem raschen Verlust der Nierenfunktion einher und wird in drei Typen eingeteilt:

- Typ 1 entsteht durch gegen die glomeruläre Basalmembran gerichtete Antikörper, welche dort eine Immunreaktion auslösen und das Nierenkörperchen nachhaltig schädigen. Ein Beispiel für eine RPGN Typ 1 ist das Goodpasture-Syndrom, welches zu den sekundären Glomerulonephritiden gezählt wird.
- Typ 2 wird durch Ablagerung von Immunkomplexen verursacht. Eine Vielzahl an Erkrankungen kann zur Bildung von Immunkomplexen führen, wie etwa die IgA-Nephropathie oder die Poststreptokokken-Glomerulonephritis.
- In die Kategorie Typ 3, auch Pauci-Immun-Glomerulonephritis genannt (*pauci*=Latein für „wenig“), werden RPGN zusammengefasst, bei denen keine oder nur wenige Anti-Basalmembranantikörper oder Immunkomplexe am Glomerulus zu finden sind. Häufig führen ANCA-positive Vaskulitiden wie die Granulomatose mit Polyangiitis zu diesem Typ.

Die RPGN führt rasch zu Symptomen wie Bluthochdruck und dem nephrotischen Syndrom mit Proteinurie, Hypoalbuminämie, Hyperlipoproteinämie sowie zu Ödemen. Unbehandelt kommt es häufig zum Nierenversagen.

Typisch für die RPGN sind die histologisch sichtbaren Halbmondformationen (engl. Crescent Formation) am Glomerulus. Sie sind Ausdruck einer extrakapillär proliferativen Glomerulonephritis und entstehen dadurch, dass durch die Inflammation und Komplementaktivierung eine erhöhte Durchlässigkeit und auch Ruptur von intraglomerulären Kapillaren entsteht, was zu einem Austritt von Plasma in den extraglomerulären Raum führt. Zusätzlich kommt es zur Ansammlung von Immunzellen, Fibrin und Fibronectin, welche eine weitere Entzündung und einen narbigen Umbau initiieren [25]. Ryu et al. hat die Rolle von parietalen Epithelzellen im Glomerulus untersucht, welche durch Proliferation entscheidende Aufgaben im Regenerationsgeschehen des entzündeten Nierenkörperchens einnehmen [26]. Der Kontakt der parietalen Epithelzellen mit Blutserum triggert eine Proliferation und einen Polaritätswechsel. Dadurch kann eine Entzündung zur Entstehung von Halbmondformationen führen [27] (s. Abbildung 3). Für diese Vorgänge typisch sind die Immunkomplexnephritis und die nephrotoxische Serum-Nephritis.

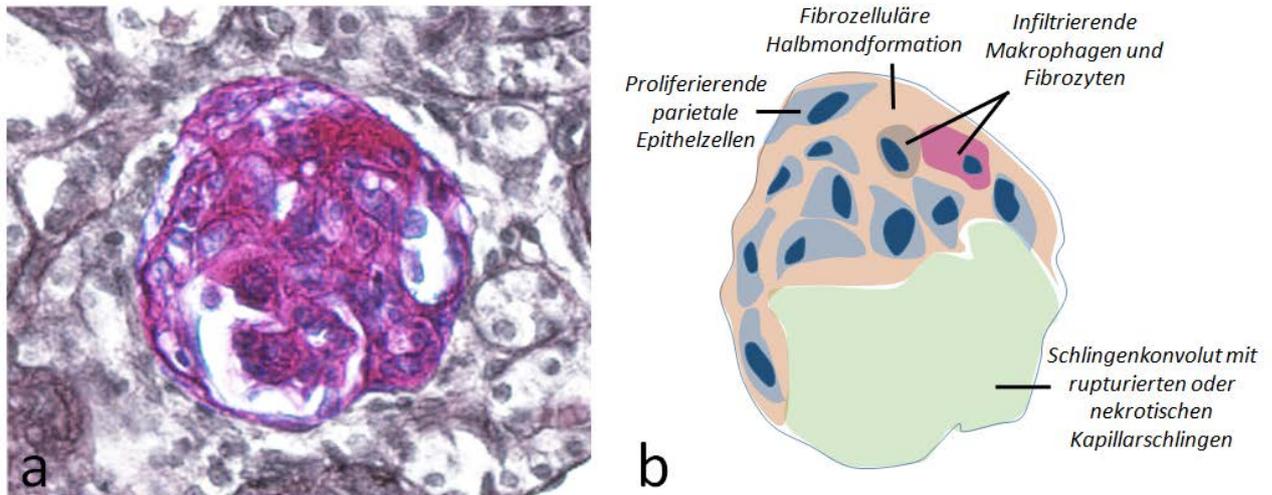


Abbildung 3: Halbmondbildung des Glomerulus. **a** zeigt eine histologische Aufnahme eines Nierenkörperchens mit Halbmondformation, welche im Laufe der Experimente entstanden ist (PAS-Färbung, Vergr.: 40x). **b** zeigt schematisch die Halbmondformation (orange) mit eingewanderten und proliferierenden Zellen und interstitiellem nichtzellulärem Gewebe. Die grüne Fläche zeigt Kapillarschlingen, welche durch die Inflammation in geschädigt wurden.

1.3.1 Die Immunkomplexnephritis und Anti-GBM-Glomerulonephritis

In den durchgeführten Experimenten kamen Schädigungsmodelle der Niere in Mäusen zum Einsatz, die sich auf Krankheitsbilder des Menschen übertragen lassen. Das verwendete Modell lässt sich am ehesten mit der Anti-GBM-Glomerulonephritis sowie mit der Immunkomplexnephritis vergleichen, welche zu den RPGN Typ 1 und 2 gehören.

1.3.1.1 Die Immunkomplexnephritis

Eine Immunkomplexnephritis ist eine chronisch verlaufende Nierentzündung, die im klinischen Alltag oftmals im Zusammenhang mit einer IgA-Nephritis, postinfektiösen Nephritis, Lupusnephritis oder membranösen Glomerulonephritis auftritt. Auch im Rahmen einer nephrotoxischen Serumnephritis kann es zur Ausbildung von Immunkomplexen kommen. Hierbei bilden sich Antikörper-Antigen-Komplexe, welche sich in der Niere ablagern und ein nephrotisches Syndrom auslösen. Die genaue Pathogenese ist häufig nicht bekannt, bei der membranösen Glomerulonephritis scheinen jedoch körpereigene Antigene wie die Phospholipase A2 eine Rolle zu spielen [28]. Die größen- und ladungsabhängige Filtration prädisponiert die Nierenkörperchen jedenfalls für die Ablagerungen [29].

Die mittlerweile seltene postinfektiöse Glomerulonephritis entsteht durch zirkulierende Immunkomplexe oder der *in-situ*-Bildung durch Antigene, welche ladungsabhängig die Basalmembran penetrieren [30]. Sie tritt vor allem nach Infektionen mit dem Erreger

Streptococcus pyogenes auf, welche durch molekulare Mimikry Antikörperbildung gegen Eigengewebe hervorrufen kann.

Die IgA-Nephritis ist die am häufigsten vorkommende Glomerulonephritis und ebenfalls ein Vertreter der Immunkomplexnephritiden. Sie kommt regional unterschiedlich häufig vor und steht im Zusammenhang mit aberrant glykosyliertem Immunglobulin A₁. Dieses Galaktose-defiziente IgA alleine ist jedoch noch nicht zu einer suffizienten Immunreaktion befähigt. Hierzu sind zusätzliche Antikörper notwendig, welche an das aberrant glykosylierte IgA₁ binden. Als Immunkomplex kommt es zur Akkumulation dieser dimeren Strukturen im glomerulären Mesangium, wodurch es zur Aktivierung und Proliferation der Mesangiumzellen führt. Dadurch wird die Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und zum Aufbau von extrazellulärer Matrix angestoßen, was zum Nierenversagen führt [31]. Abhängig von Faktoren wie Bluthochdruck, Proteinurie und histologischer Beurteilung nach der Oxford-Klassifikation resultiert die IgA-Nephritis in bis zu 29% der Fälle nach 10 Jahren in Dialyse oder Tod [32-34].

Eine weitere wichtige Immunkomplexerkrankung der Niere ist die Lupus-Nephritis. Sie tritt im Rahmen der systemischen Erkrankung Lupus erythematoses auf und ist eine Folge von autoimmunen polyklonalen Immunglobulinen, welche sich als Komplexe in der Niere ablagern. Langlebige Plasmazellen, welche dsDNA-Antikörper produzieren, wurden in großer Zahl im Tubulointerstitium von erkrankten Mäusen gefunden. Sie unterscheiden sich in ihrem Zellzyklus- und Teilungsverhalten von Immunzellen, welche in den lymphoiden Organen zu finden sind, und residieren an tiefen interstitiellen Stellen der Niere, weshalb die Therapie mit herkömmlichen Immunsuppressiva oft nicht anschlägt [35]. Der Einsatz von Rituximab als monoklonaler Antikörper gegen CD20, welches die verantwortlichen B-Zellen eliminieren soll, brachte nicht den erhofften Erfolg. In vielen Fällen muss im Krankheitsverlauf eine Dialyse oder Nierentransplantation erwogen werden.

Im unten beschriebenen Tierversuch wird die autologe Krankheitsphase im Anti-GBM-Modell mit einer Immunkomplexnephritis verglichen, wo sich ebenfalls Antigen-Antikörper-Komplexe in der Niere bilden, was zu einem Abfall der Nierenleistung führt. Um das Anti-GBM-Modell in einen klinischen Kontext zu bringen, wird im Anschluss das humanmedizinische Korrelat vorgestellt.

1.3.1.2 Die Anti-glomeruläre-Basalmembran-Glomerulonephritis und das Goodpasture-Syndrom

Die Anti-GBM-Glomerulonephritis ist eine autoimmune Nierenerkrankung. Die Pathogenese erklärt sich durch eine Ablagerung von Immunkomplexen in den Kapillargefäßen der Nierenkörperchen und führt in der Niere zur Ausbildung einer RPGN Typ 1 [36]. Plasmazellen bilden aus unbekanntem Ursachen Antibasalmembran-Antikörper, welche an das NC-1-Epitop der $\alpha 3$ -Kette des Typ IV-Kollagens binden (s. Abbildung 4).

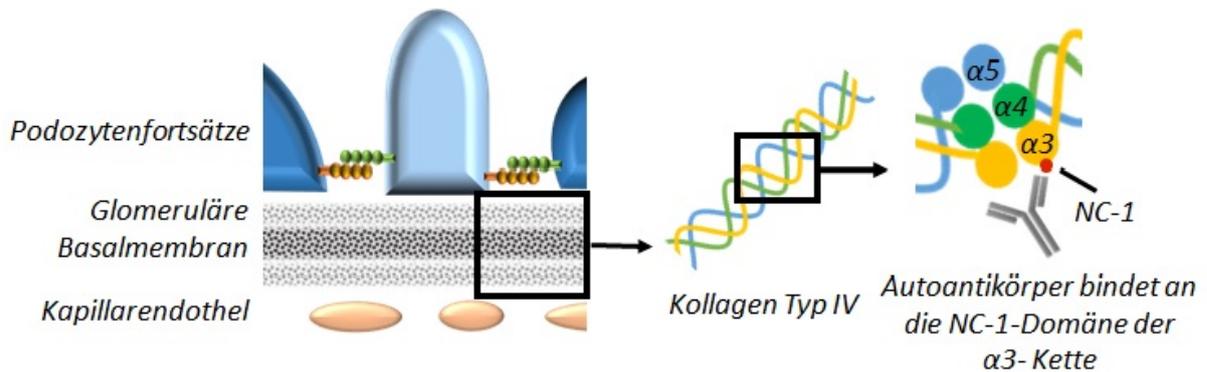


Abbildung 4: Die Nephrotoxische Serumnephritis. Das Kollagen Typ IV besteht aus drei Ketten, welche in einer rechtsgängigen Tripelhelix um einander gewunden sind. Beim Goodpasture-Syndrom binden Autoantikörper an die $\alpha 3$ -Kette und leiten die Entzündungsreaktion ein.

Bei etwa einem Drittel der Patienten können zusätzlich antinukleäre Antikörper (ANAs) nachgewiesen werden [37-39]. Bei 30-40% der Fälle liegt eine isolierte renale Beteiligung vor, wobei bei der Mehrzahl eine Mitbeteiligung der Lunge besteht [40]. Bei der Beteiligung beider Organe nennt man den Symptomkomplex Goodpasture-Syndrom, benannt nach dem gleichnamigen amerikanischen Pathologen. Es kommt im klinischen Alltag selten vor und die Ursache des Syndroms ist bislang unbekannt, wobei Assoziationen zu Triggern wie Rauchen und virale Infektionen angenommen werden [41, 42]. Von den bislang 28 bekannten Kollagentypen in Vertebraten kommt die $\alpha 3$ -Kette des Typ IV-Kollagen in den Nieren, Lungen, Hoden und Augen vor [43]. Durch lineare Ablagerung der Immunglobuline wird das Komplementsystem aktiviert, wobei vor allem Komplementfaktor C3 nachgewiesen werden konnte [44]. In der weiteren Folge kommt es zu einer massiven Aktivierung und Rekrutierung weiterer Immunzellen, gefolgt von schnell fortschreitendem Nierenversagen, Proteinurie, Anämie durch Hämaturie, Hämoptysen und zu systemischen Symptomen wie B-Symptomatik und Arthralgien.

Diagnostisch wird eine Nierenbiopsie durchgeführt, welche durch die immunhistochemische Färbung der Immunkomplexe die Krankheit bestätigt. Zusätzlich werden aus dem Blut Anti-GBM-Antikörper und ANCA's mittels ELISA bestimmt [45]. Obwohl die Antikörpersynthese oftmals nur transient ist, ist der Nierenschaden bereits nach kurzer Zeit so groß, dass er ohne Behandlung zu irreversibler Nierenschädigung und zum Tod führt. Therapeutisch werden Plasmapheresen zur raschen Entfernung der nephropathogenen Immunglobuline und pharmazeutisch die Applikation von Corticosteroiden und Cyclophosphamid durchgeführt, um durch Immunsuppression die Bildung von B-Zellklonen zu verhindern [46].

Antikörper werden im Zuge der adaptiven Immunreaktion nach komplizierten Abläufen vieler beteiligter Zellen gebildet. Diese Abläufe sind für das Leben essentiell, da ohne funktionierender Immunkaskade keine Abwehr gegen Krankheitserreger stattfinden kann. Das angeborene und das adaptive Immunsystem sind für dafür verantwortlich, den Organismus gegen äußere und innere Einflüsse zu schützen.

1.4 Die angeborene und adaptive Immunantwort

Das Immunsystem dient dazu, als Abwehrsystem den Organismus vor Krankheitserregern und schädigenden Einflüssen zu beschützen. Es ist ein komplexes Netzwerk aus Organen, Zellen und Proteinen, welche ein geregeltes Zusammenspiel orchestrieren müssen, um schädigende äußere und innere Einflüsse rasch zu erkennen und darauf die richtige Antwort zu geben. Außerdem spielt das Immunsystem bei der Bekämpfung entarteter Zellen und bei der Beseitigung von Zelldetritus eine große Rolle.

Grundsätzlich unterscheidet man das angeborene vom adaptiven Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ist durch seine sofortige Verfügbarkeit die erste Abwehrfront gegenüber Eindringlingen. Es besteht aus mechanischen Barrieren, Zellen und humoralen Bestandteilen. Makrophagen, Granulozyten und Natural-Killer-Zellen bilden den zellulären Bestandteil und können zuverlässig binnen Minuten eingedrungene Partikel phagozytieren und lysieren. Interleukine ermöglichen als Botenstoffe die Kommunikation unter den Zellen. Die Faktoren des Komplementsystems können als Proteine verschiedene Oberflächenstrukturen von Bakterien binden und sorgen dafür, dass sie unschädlich gemacht werden. Das angeborene Immunsystem leitet darüber hinaus mit Antigenpräsentation und der Ausschüttung von Zytokinen auch die spezifische Immunreaktion ein.

Das adaptive oder spezifische Immunsystem zeichnet sich durch spezifische, gegen Antigene gerichtete Immunreaktionen aus. Für diese gezielte Immunantwort benötigt der Organismus jedoch auch mehr Zeit als das angeborene Immunsystem. Den zellulären Bestandteil bilden B- und T-Lymphozyten sowie dendritische Zellen. T-Lymphozyten werden in CD4- und CD8-Zellen unterschieden. Dendritische Zellen haben wie die Makrophagen die Aufgabe, in den lymphatischen Organen den T- und B-Lymphozyten auf speziellen MHC-Proteinen Antigene zu präsentieren. B-Lymphozyten können auch selbst unprozessierte Antigene mit ihrem B-Zellrezeptor binden und aufnehmen, um sie im Anschluss naiven T-Lymphozyten präsentieren zu können. In der Regel braucht ein Lymphozyt zwei Signale, um aktiviert zu werden.

B-Lymphozyten binden zunächst selbst mit dem B-Zellrezeptor ein Antigen und werden im Anschluss von einer CD4+-Th2-Helferzelle durch das Oberflächenprotein CD40 stimuliert, nachdem sie der Helferzelle das internalisierte Peptid durch MHCII präsentiert hat (s. Abbildung 5).

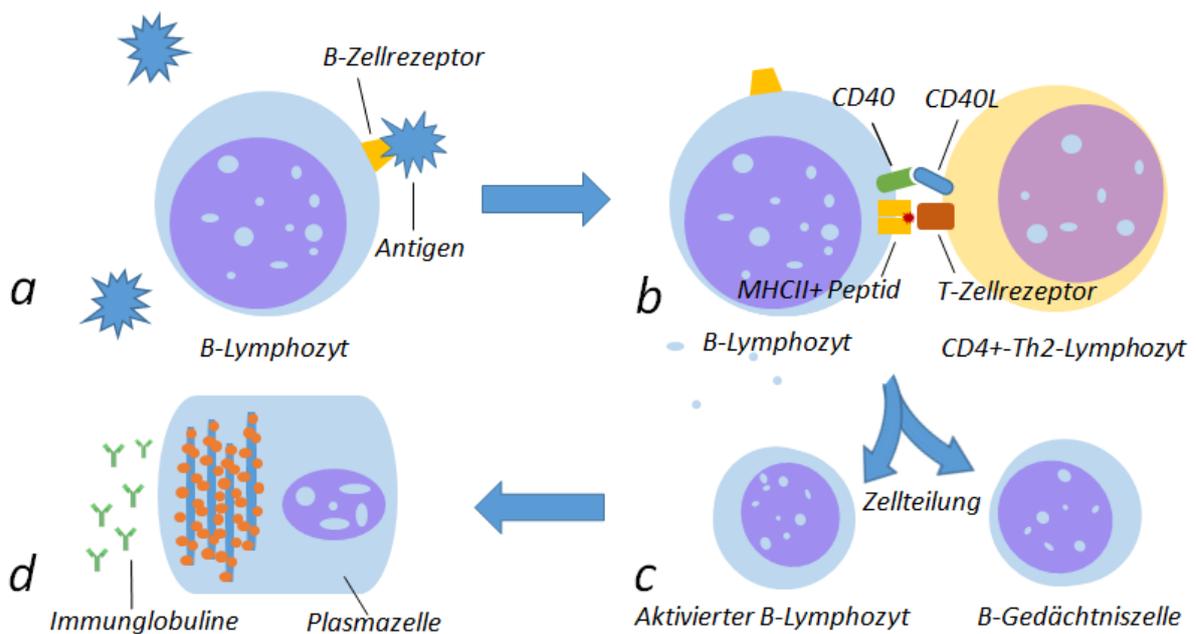


Abbildung 5: B-Zell-Aktivierung. Der B-Lymphozyt kann durch den BCR selbst Antigene binden, wodurch es das erste Signal erhält (a). Dann benötigt er als 2. Signal die Bindung einer T-Helferzelle durch CD40 (b). Es erfolgt die weitere Zellteilung und Differenzierung in Gedächtniszelle oder in Richtung Plasmazelle (c), welche dann die Immunglobuline produziert (d).

T-Lymphozyten müssen ein an MHC-Protein gebundenes Antigenfragment einer antigenpräsentierenden Zelle binden und dann von einem ko-stimulatorischen Molekül derselben Zelle aktiviert werden, indem CD80 an CD28 bindet (s. Abbildung 6).

Dann beginnt die sogenannte klonale Selektion, bei der sich die aktivierten Zellen teilen und proliferieren. Somit ist sichergestellt, dass die Zellen, welche mit ihren Rezeptoren befähigt sind, die Antigene zu binden, sich vermehren und im Blutkreislauf die Erreger bekämpfen.

B-Lymphozyten differenzieren sich zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen und zu B-Gedächtniszellen. Sie sind für die humorale Abwehr zuständig und bilden spezifische Antikörper, welche an die Antigene der zu bekämpfenden Partikel binden. Die verschiedenen Antikörperklassen können durch Neutralisation Eiweiße direkt unschädlich machen. Durch Opsonierung können Epitope markiert werden, welche damit für andere Immunzellen erkennbar gemacht werden. Außerdem können Antikörper das Komplementsystem aktivieren, welches als humoraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems für eine Perforation der markierten Zellen sorgt.

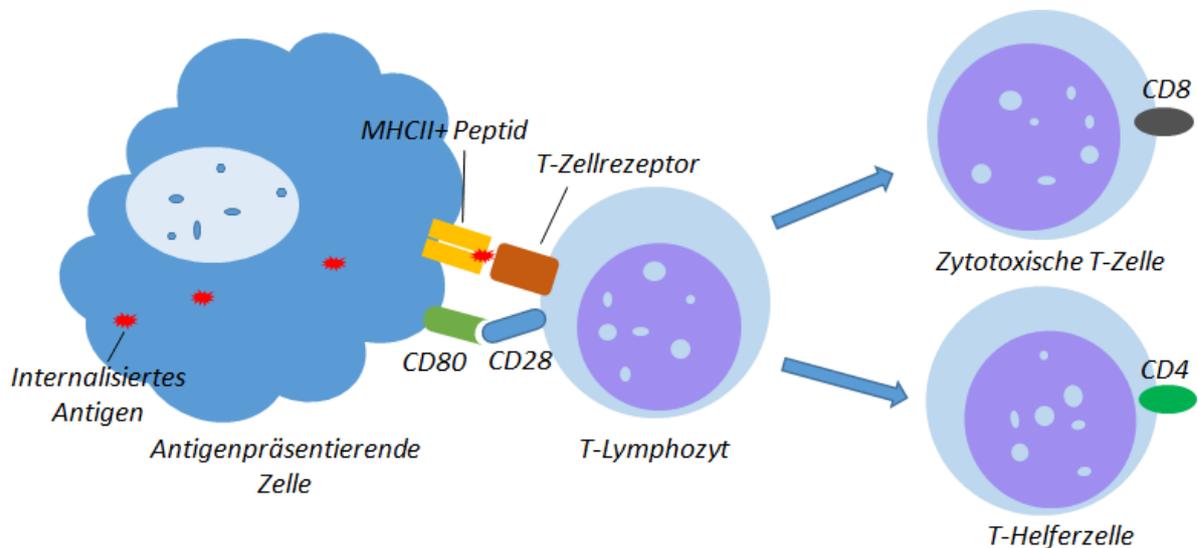


Abbildung 6: T-Zellaktivierung. Eine antigenpräsentierende Zelle bindet die T-Zelle mit dem MHCII-Protein und einem ko-stimulatorischen Molekül, worauf die Proliferation des Lymphozyten mit klonaler Selektion beginnt.

T-Lymphozyten differenzieren sich zu CD4- oder CD8-Zellen und zahlreichen weiteren Unterarten. CD4-Zellen übernehmen als Helferzellen stimulatorische Aufgaben und werden im Anschluss noch genauer betrachtet. CD8-T-Lymphozyten zerstören als zytotoxische Zellen nach der Bindung von Antigenen direkt andere Zellen durch die Ausschüttung von lysierenden und apoptoseinduzierenden Substanzen wie Perforin und Granulysin.

Die verschiedenen Bestandteile des Immunsystems greifen komplex ineinander und sorgen in der Regel für eine verlässliche Abwehr. Im Speziellen sind für die folgenden Inhalte die CD4-Zellen von Interesse und werden nun detaillierter beleuchtet.

1.4.1 CD4+-T-Lymphozyten

CD4-Zellen sind als Aktivatoren des adaptiven Immunsystems unverzichtbarer Bestandteil einer spezifischen, zielgerichteten Immunantwort. Sie gehören zu der Klasse der T-Lymphozyten, zu denen noch die zytotoxischen CD8-Zellen, die regulatorischen T-Zellen, T-Gedächtniszellen, NK-T-Zellen und die γ/δ -T-Lymphozyten gehören.

Mittlerweile wurde auch eine ganze Reihe von Subtypen der CD4-T-Zellen identifiziert. Darunter fallen die seit langem bekannten Th1- und Th2-Zellen sowie Th17-Zellen, Th9-Zellen, folliculäre Helfer-T-Zellen, induzierte regulatorische T-Zellen und die regulatorischen Typ 1-Zellen.

Das wichtigste Werkzeug der T-Zellen ist der T-Zellrezeptor (TCR). Er entwickelt sich ähnlich wie Immunglobuline durch zufällige Genrekombinationen, um eine möglichst große Diversität zu ermöglichen. Der TCR ist einem Fab-Fragment eines Immunglobulins ähnlich aufgebaut und kann in weiterer Folge Epitope von Molekülen binden.

1.4.1.1 Entwicklung der CD-4+-T-Lymphozyten

Alle T-Zellen werden im Knochenmark aus lymphatischen hämatopoietischen Stammzellen gebildet. Sie verlassen als unreife und naive Zellen ihren Ursprungsort und wandern über den Blutweg in den Thymus. Im Thymus unterlaufen die T-Zellen eine strenge Prüfung, um im Endeffekt die immunologische Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen zu gewährleisten.

Es finden zwei Selektionsmechanismen im Thymus statt: die positive und die negative Selektion. Während der positiven Selektion müssen die T-Zellen an durch Thymusepithelzellen präsentierte MHC-Proteine binden. Binden sie zu stark, werden sie aufgrund der Gefahr der Überaktivierung eliminiert, während bei zu geringer Bindung die Zellen aufgrund von stimulatorischer Vernachlässigung zu Grunde gehen [47]. Bei der negativen Selektion wird den Thymozyten ein ganzes Spektrum an körpereigenen Epitopen präsentiert, welche sie nicht erkennen dürfen (s. Abbildung 7).

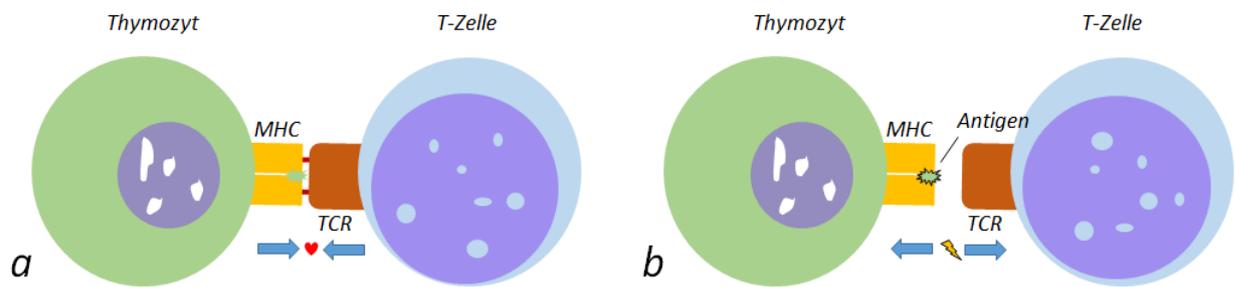


Abbildung 7: Positive und negative Selektion der T-Zellen im Thymus. **a: Positive Selektion:** Der Thymozyt präsentiert der unreifen T-Zelle das MHC-Protein mit einem eigenen Antigen. Bei inadäquater oder fehlender Bindung mit dem MHC-Rezeptor kommt es zur Apoptose der T-Zelle. **b: Negative Selektion:** Der Thymozyt präsentiert der unreifen T-Zelle viele unterschiedliche körpereigene Antigene, die nicht gebunden werden dürfen. Bei Bindung kommt es zur Apoptose der T-Zelle.

Dabei spielt das AIRE-Protein eine wichtige Rolle, welches als Transkriptionsfaktor die Produktion von Tissue Specific Antigens ermöglicht, welche an MHC-Klasse-I-Proteinen präsentiert werden [48]. Eine Bindung dieser intrazellulär prozessierten Proteinbestandteile durch den TCR führt zur Apoptose der Thymozyten und verhindert ein Überschießen der Immunreaktion in Autoimmunkrankheiten. Über 95% der eingewanderten Zellen gehen im Thymus durch die positive und negative Selektion zugrunde und werden durch Makrophagen phagozytiert [49].

Ob sich ein Thymozyt in eine CD4+-oder CD8+-Zelle oder einen anderen Subtyp entwickelt, hängt von Faktoren ab wie dem Bindungsverhalten und dem umgebenden Zytokin- und Zellmilieu. Beispielsweise aktiviert die richtige Bindung eines Thymozyten an MHC-Klasse-II und dem Korezeptor CD3 eine Signalkaskade, welche eine weitere Bestimmung als CD4+-Zelle determiniert [50]. Im unreifen Stadium sind jedoch alle T-Lymphozyten CD4-CD8-doppelpositiv [51].

Die Entwicklung in die spezifischen Unterarten der CD4+-T-Zellen hängt von Zytokinen, Transkriptionsfaktoren und nicht zuletzt von epigenetischen Modifikationen ab, welche durch Stimulationen von den antigenpräsentierenden Thymusepithelzellen ausgeschüttet und initiiert werden [50].

Nach dieser Entwicklung expandieren die T-Zellen in die Peripherie in sekundäre lymphatische Gewebe wie Lymphknoten, Tonsillen oder die Milz und bilden dort ein Reservoir an immunopotenten Zellen, die auf ihre Aktivierung warten. Beginnend mit der Pubertät wird der Thymus abgebaut und wird größtenteils in Fettgewebe umgewandelt, genannt Involution. Der Grund dafür ist, dass der Körper nun ein großes Repertoire an verschiedenen T-Zellen in der Peripherie aufweist, welche sich dort auch vermehren können. Dennoch wurde bei athymischen Mäusen gefunden, dass T-Zell-Reifung auch extrathymisch in den sekundären lymphatischen Organen,

besonders aber in mesenterialen Lymphknoten stattfindet [52]. Jedoch unterscheiden sich die dort gereiften Zellen funktionell und von der Ausstattung her von thymusgereiften Zellen [53]. Zusätzlich besteht der Verdacht, dass die Entwicklung von autoimmunen Reaktionen durch extrathymisch gereifte T-Lymphozyten begünstigt wird [54]. Die drastische Verminderung des Thymusgewebes ist jedenfalls eine Erklärung für die Immunoseneszenz, also das Phänomen, dass ältere Menschen oftmals keine optimale Immunreaktion mehr zeigen können [55].

1.4.1.2 Funktion von CD4+-T-Zellen

Die Aktivität von T-Lymphozyten wird von dendritischen Zellen gesteuert. Dendritische Zellen wie Langerhans-Zellen oder interdigitierende dendritische Zellen nehmen eingedrungenes Fremdmaterial auf, prozessieren deren Proteine intrazellulär und präsentieren auf dem MHC-Klasse-II-Protein die verarbeiteten Peptidreste auf ihrer Oberfläche in den sekundären lymphatischen Organen [56]. Bindet nun eine T-Zelle mit ihrem TCR mit einer gewissen Affinität diese Epitope, so wird sie aktiviert, teilt sich und expandiert in den Blutstrom. Je nach Subtyp erfüllen die CD4-Zellen unterschiedliche Aufgaben.

Die Th1-Zelle, von T Helper Cell type 1, ist eine Helferzelle und ist vor allem für die Eliminierung von intrazellulären Pathogenen wie Viren oder intrazellulären Bakterien zuständig. Erkennen diese Zellen auf MHC-Klasse-II präsentierte Epitope, schütten diese vor allem Interleukin 2 und Interferon γ (IFN- γ) aus und aktivieren damit Phagozyten wie Makrophagen oder Mikroglia [57]. Damit wird die Phagozytoseaktivität verstärkt und führt durch die Produktion von lytischen Substanzen zur intrazellulären Bekämpfung der Eindringlinge. Zusätzlich aktivieren Th1-Zellen zytotoxische CD8+ Zellen und NK-Zellen und potenzieren deren Aktivität [58].

Die Th2-Zelle ermöglicht durch die Ausschüttung von vielen verschiedenen Interleukinen vor allem die Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen. IL4 aktiviert B-Zellen und führt zur Hochregulation von IgE-Rezeptoren auf Mastzellen, was in der allergischen Reaktion zu bekannten Kaskaden führt [59]. IL5 zielt vor allem auf die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten ab, zu deren Funktion die Bekämpfung von Parasiten wie Schistosomulalarven oder die Auslösung von Asthma gehört [60]. IL10 reguliert antiinflammatorisch die Immunreaktion und inhibiert Th1-Zelle, Makrophagen und NK-Zellen [61]. Diese und noch weitere Interleukine wie IL9, IL13 oder IL25 werden durch Th2-Zellen ausgeschüttet und regulieren damit unterschiedliche Bestandteile des Immunsystems.

Th17-Zellen sind durch die Sekretion von hauptsächlich IL17 für die extrazelluläre Bekämpfung von Mikroben zuständig. IL17 induziert die Ausschüttung von weiteren Zytokinen wie IL6 oder TNF- α

und ist als Ligand mehrerer Rezeptoren in unterschiedlichen Geweben proinflammatorisch wirksam [62].

Regulatorische CD4-Zellen haben ihren Stellenwert in der Negativregulation der Immunreaktion und spielen eine wichtige Rolle in der Prävention von Autoimmunkrankheiten. Die Ausschaltung dieser FOXP3-exprimierenden Zellen löst die Entstehung von autoimmunen Reaktionen aus und verlagert die Homöostase zwischen pro- und antiinflammatorischen Aktivatoren auf die Seite der Überreaktion [63].

Erstaunlicherweise wurde entdeckt, dass CD4-Zellen nicht nur in der adaptiven Immunreaktion, sondern auch in der akuten, angeborenen Phase einer Immunantwort eine Rolle spielen. So wurde bei Th1-Zellen gezeigt, dass sie die Extravasation von Neutrophilen fördern und dass Th17-Zellen auch in die Rekrutierung von Neutrophilen involviert sind [64, 65]. Dies weist darauf hin, dass CD4⁺-T-Lymphozyten bei schnell ablaufenden, akuten Nierenerkrankungen ebenfalls einen Beitrag leisten.

1.4.1.3 Die Rolle von CD4⁺-T-Lymphozyten bei akutem Nierenversagen

In der gesunden Niere ist das Immunsystem hauptsächlich mit Zellen des mononukleären Phagozytensystems vertreten [66]. Bei immunologischen Nierenerkrankungen, welche zum ANV führen können, wurde jedoch eine Vielzahl weiterer Zellen gefunden. Dabei wurde bereits vor langem entdeckt, dass T-Lymphozyten einen großen Einfluss auf das renale Entzündungsgeschehen haben.

Kurze Zeit nach einem induzierten Nierenschaden (wie bei Ischämie-Modellen) kommt es zur Infiltration und Akkumulation von T-Zellen im Nierengewebe [67]. Bei Nierenschaden kommt es durch immunostimulatorische Moleküle, genannt Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), welche von geschädigten Zellen ausgeschüttet werden, zur Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren und dem NLRP3-Inflammasom [68]. Immunzellen werden angelockt und fördern durch die weitere Ausschüttung von Chemokinen die Extravasation von Zellen, darunter auch T-Lymphozyten. Die CD4⁺-Th1- und Th2-Zellen werden ihrer Aufgabe gerecht und befeuern durch die Ausschüttung von beispielsweise IFN- γ weiter die Entzündungsreaktion in der Niere. Dies konnte durch mehrere Studien untermauert werden. In diesen wurde in Mausmodellen die Produktion von Zytokinen unterbunden, welche CD4⁺-T-Zellen aktivieren oder von diesen produziert werden. In diesen Experimenten, in denen Cisplatin- oder ischämieinduzierte ANV-Modelle zum Einsatz kamen, konnte dadurch ein protektiver Effekt nachgewiesen werden [69].

Auf der anderen Seite befinden sich unter den CD4-Zellen auch regulatorische CD4-Zellen (Tregs), welche eine immunmodulierende Aufgabe haben. Es wurde mehrfach gezeigt, dass Tregs im ANV protektiv wirken und Heilungsmechanismen anstoßen [70]. Es wurden bereits klinische Studien bei Menschen nach Nierentransplantation durchgeführt, welchen aufbereitete Tregs injiziert wurden, um die Inflammation der transplantierten Niere zu begrenzen. Tatsächlich konnte man das Auftreten einer Abstoßungsreaktion signifikant vermindern [71].

Autoimmunkrankheiten wie die nephrotoxische Serumnephritis oder die Lupus-Nephritis können ebenfalls im ANV enden. Auch dabei nehmen CD4-Zellen eine wichtige Rolle ein.

1.4.1.4 Die Rolle von CD4+-T-Zellen bei autoimmunen Nierenerkrankungen

Wie beschrieben läuft kaum eine Immunreaktion ohne Aktivierung des adaptiven Immunsystems ab. Dies geschieht auch bei Immunreaktionen gegen eigene Zellen. Dementsprechend spielen CD4+-T-Zellen in Verstärkung und Inhibierung dieser Vorgänge eine große Rolle.

Man hat in Autoimmunitätsmodellen bei Mäusen bereits häufig Akkumulationen von CD4+-T-Zellen beobachtet [72]. CD4-Zellen fördern die Produktion von Immunglobulinen, welche an Antigene binden und die Zellen durch Opsonierung markieren oder das Komplementsystem aktivieren, was bei Autoimmunreaktionen eine Zellschädigung zur Folge hat. Besonders im Anti-GBM-Modell, welche eine Halbmondformation der Glomeruli induziert, konnte man durch Knockout von Zytokinen wie IL-12 oder IFN- γ , welche CD4-Zellen ausschütten, eine Verminderung von Nierenschaden erreichen [73, 74]. Umgekehrt konnte bei höheren Konzentrationen dieser Zytokine eine vermehrte Schädigung der Niere nachgewiesen werden [72]. Zusätzlich konnte man beobachten, dass bei der nephrotoxischen Serumnephritis in Ratten die Anzahl der Makrophagen und Monozyten in der Niere reduziert wird, wenn T-Zellen durch Antikörper depletiert werden [75]. Dadurch konnte die Halbmondformation in der Niere wesentlich vermindert werden. Dies lässt alles darauf schließen, dass CD4-Zellen bei dieser Autoimmunkrankheit direkten oder indirekten Einfluss auf das Geschehen haben.

Bei Lupus-Nephritis-Modellen in Mäusen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass CD4+-T-Zellen wichtig für die Krankheitsentstehung ist. Interessanterweise ist dies jedoch nicht nur wegen der Anstoßung zur Antikörperproduktion in B-Zellen der Fall. In MRL/lpr-Mäusen, welche Lupus-Glomerulonephritis entwickeln, konnte man zeigen, dass Antikörper für die Entwicklung der Glomerulonephritis nicht zwingend notwendig sind. Diesen Mäusen wurde zusätzlich die Fähigkeit genommen, Immunglobuline zu bilden, und durch Depletion von IL-4 durch Antikörper konnte das

Ausmaß des Nierenschadens vermindert werden [72, 76], was wiederum CD4+-T-Zellen in den Fokus des Geschehens rückt, da Th2-Zellen die Hauptquelle von IL4 darstellen.

Auch wenn viele Mechanismen noch nicht genau erforscht sind, haben CD4+-T-Zellen einen wesentlichen Beitrag in der Ausbildung von Nierenschäden bei autoimmunen Krankheiten. Eine Möglichkeit, die Anzahl an CD4+-T-Zellen zu verringern, ist sie mit CD4-Antikörpern zu depletieren. T-Zellen sind jedoch nicht die einzigen Zellen, welche CD4 exprimieren.

1.5 Das CD4-Protein

CD4 ist ein Membranprotein von Zellen des Immunsystems, welches direkt mit MHC-II-Proteinen antigenpräsentierender Zellen interagiert und in der T-Zell-Aktivierung eine Rolle spielt. Es besteht aus vier Domänen und erlangte Berühmtheit durch die Entdeckung, dass CD4 der Rezeptor für das HI-Virus bzw. seinem Glykoprotein gp120 ist und somit diese Zellen anfällig für eine Infektion macht [77]. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen durchgeführt, weswegen die Expression einer näheren Betrachtung bedarf.

CD4 hat die Funktion, als Korezeptor zusammen mit dem TCR die MHC-II-Komplexe anderer Körperzellen zu binden. Dadurch wird die T-Zelle aktiviert, differenziert sich weiter und proliferiert. Ohne CD4 würde die alleinige Bindung des MHC-II-Komplexes an TCR eine größere Antigenmenge benötigen, um die T-Zelle zu aktivieren [78].

CD4 ist kein zellspezifisches Protein, sondern auf vielen Blutzellen vorhanden. Die wichtigsten Vertreter dieser CD4-Zellen sind T-Lymphozyten. Alle T-Lymphozyten exprimieren im frühen CD4-CD8-doppelpositiven Stadium das Protein [51]. Im fortgeschrittenen Stadium sind jedoch nur mehr T-Helferzellen CD4-positiv und repräsentieren den größten Teil der CD4-Zellen im Organismus. In den letzten Jahren wurde jedoch eine ganze Reihe weiterer Zellen gefunden, deren Subtypen in zumindest geringem Maße ebenfalls CD4 an ihrer Oberfläche tragen. Dazu gehören Monozyten, Makrophagen und Eosinophile, wobei jeweils die Molekülzahl pro Zelle geringer ist als bei CD4+-T-Lymphozyten [79, 80]. Es gibt Untersuchungen, in denen ein geringer Prozentsatz von HIV+-Patienten auch CD4+-Neutrophile im Blut hatte [81]. In kleiner Menge wird CD4 von Subpopulationen dendritischer Zellen sowie Mastzellen und Basophilen exprimiert [82, 83]. Bei 25-65% der CD34+-Zellen im Knochenmark konnte ebenfalls CD4 nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um Blutprogenitorzellen, welche das Molekül in 50% beziehungsweise 5% der Dichte von peripheren Blutvorläuferzellen und T-Lymphozyten exprimieren. In Experimenten konnte man bei diesen Knochenmarkzellen nach dem Einsatz von monoklonalen CD4-Antikörpern

vor allem eine Reduktion von Megakaryozyten, Granulozyten und Makrophagen beobachten [84, 85]. In HIV-positiven Patienten konnte in einer CD56+CD3- Subpopulation von NK-Zellen ebenfalls CD4 nachgewiesen werden, welche selbst nach hochdosierter antiretroviraler Therapie HIV-DNA in sich trugen [86].

Unterschiedliche Viren scheinen einen Einfluss auf die CD4-Expression zu haben. Besonders gut untersucht wurde der Einfluss von humanen Herpesvirus 6 (HHV6), welcher durch transkriptionale Mechanismen die CD4-Expression in CD8⁺-Zellen, NK-Zellen und γ/δ -T-Lymphozyten induziert [87-89]. Das Epstein-Barr-Virus wird für die Immortalisierung von Zelllinien, sogenannte lymphoblastioiden Zelllinien, verwendet. In diesen Linien konnte selbst in B-Zellen CD4 nachgewiesen werden [90].

CD4 hat wichtige Funktionen als Aktivator von CD4-Zellen und ist nicht ausschließlich, aber zum überwiegenden Großteil auf T-Zellen zu finden. Im Gegensatz dazu sind andere Proteine ubiquitär in allen Körperzellen zu finden. Dazu gehören die Proteine p53 und MDM2, welche die Viabilität von Zellen wie den CD4-Zellen steuern und noch weitere Funktionen in Zellzyklus und Entzündungsreaktion einnehmen.

1.6 p53 und MDM2

1.6.1 Das p53-Protein

Seit der Entdeckung von p53 im Jahre 1979 und der Identifizierung seiner Funktionen sind viele Zusammenhänge vor allem in der Krebsentstehung verstanden worden [91]. Es wird geschätzt, dass p53 für mehr als 50% aller Krebsarten durch Mutationen oder Deletionen im Gen verantwortlich ist, was seine große Relevanz unterstreicht [92]. Es ist 393 Aminosäuren lang, 54kDa schwer und ist beim Menschen auf dem Chromosom 17 am TP53-Gen lokalisiert [93]. Ohne externe oder interne Stressoren, welche auf die Zelle einwirken, ist p53 wegen Negativregulation durch MDM2 nur in geringen Mengen in der Zelle vorhanden [94].

Wesentliche Aufgaben während des Zyklus einer eukaryotischen Zelle sind für p53 reserviert. Die Bezeichnung „Wächter des Genoms“ hat es erlangt, da es bei Schäden am Genom phosphoryliert wird und sich somit der Degradation entzieht um als Transkriptionsfaktor eine Reihe von Mechanismen zu starten, welche die DNA reparieren oder die Zelle in den apoptotischen Zelltod schicken. Bislang wurden mindestens 542 Genloci identifiziert, an die p53 als Transkriptionsfaktor bindet [95]. Schäden der DNA geschehen ununterbrochen durch chemische oder physikalische

Noxen wie oxidativen Stress, UV-Strahlung, Zigarettenrauch oder enzymatische Transkriptionsfehler. Daraus erleidet der DNA-Strang Einzel-oder Doppelstrangbrüche, falsche Verbindungen oder Mutationen [96]. Es wird sogar geschätzt, dass eine einzige Zelle bis zu 1 000 000 DNA-Schäden pro Tag erleiden kann [97].

Die Phosphorylierung von p53 wird je nach Ursache von verschiedenen Kinasen durchgeführt. Die Ataxia-Telangiectasia-Mutated-Proteinkinase wird vorwiegend bei Doppelstrangbrüchen durch eine Reihe von anderen Proteinen aktiviert und phosphoryliert p53 am Serin 15 vor allem nach Exposition in ionisierender Strahlung [98]. Die DNA-Activated Protein Kinase, Casein Kinase 1, AMP-Activated Protein Kinase sind ebenfalls Proteine, welche p53 nach DNA-Schäden durch Phosphorylierung aktivieren [99-101]. Neben der Phosphorylierung regulieren weitere posttranslationale Modifikationen wie Acetylierungen und Methylierungen die Aktivität von p53 zusätzlich [101]. In Folge kann nun p53 als Transkriptionsfaktor hunderte von Gene aktivieren, welche für den Zellzyklusarrest, der Reparatur von DNA sowie im weiterer Folge auch für die Apoptose verantwortlich sind und somit Tumorsuppressorgene genannt werden [102]. Das bekannteste Target von p53 ist *p21*, auch genannt *Waf1/Cip1*, dessen Produktion durch die Aktivierung *p21*-Genes ermöglicht wird [103]. Das p21-Protein ist ein Inhibitor von Cyklin-abhängigen Kinasen, welche durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Cyclinen immensen Einfluss auf den Zellzyklus haben. Dadurch kann p21 bei DNA-Schäden das Fortschreiten des Zellzyklus von der G1-in die S-Phase und G2-Phase in die Mitose verhindern und eine Reparatur der DNA ermöglichen [104]. Neben der Zellzyklusregulation ermöglicht p53 die Produktion von DNA-Reparaturproteinen (GADD45), zelltodfördernden Proteinen (Bax, GML), Angiogenese-Inhibitoren (TSP-1) und anderen wichtigen Stressfaktoren [105].

Neben seinen Funktionen als Tumorsuppressor sind noch weitere interessante Zusammenhänge erkannt worden. So ist p53 ein negativer Regulator von NF- κ B, während NF- κ B ebenfalls ein negativer Regulator von p53 ist [106]. Das erklärt die Tatsache, dass Tumore oftmals mit einer Entzündung einhergehen, da bei einer p53-Fehlfunktion die suppressive Wirkung entfällt. p53 soll auch in der Embryoimplantation eine Rolle spielen und durch Regulation von Histondeacetylasen Genexpression steuern. Das alles soll abhängig vom Status der posttranslationalen Modifikationen und Faltungszustand sein [94, 107]. Die wechselseitigen Zusammenhänge sind in Abbildung 8 graphisch veranschaulicht.

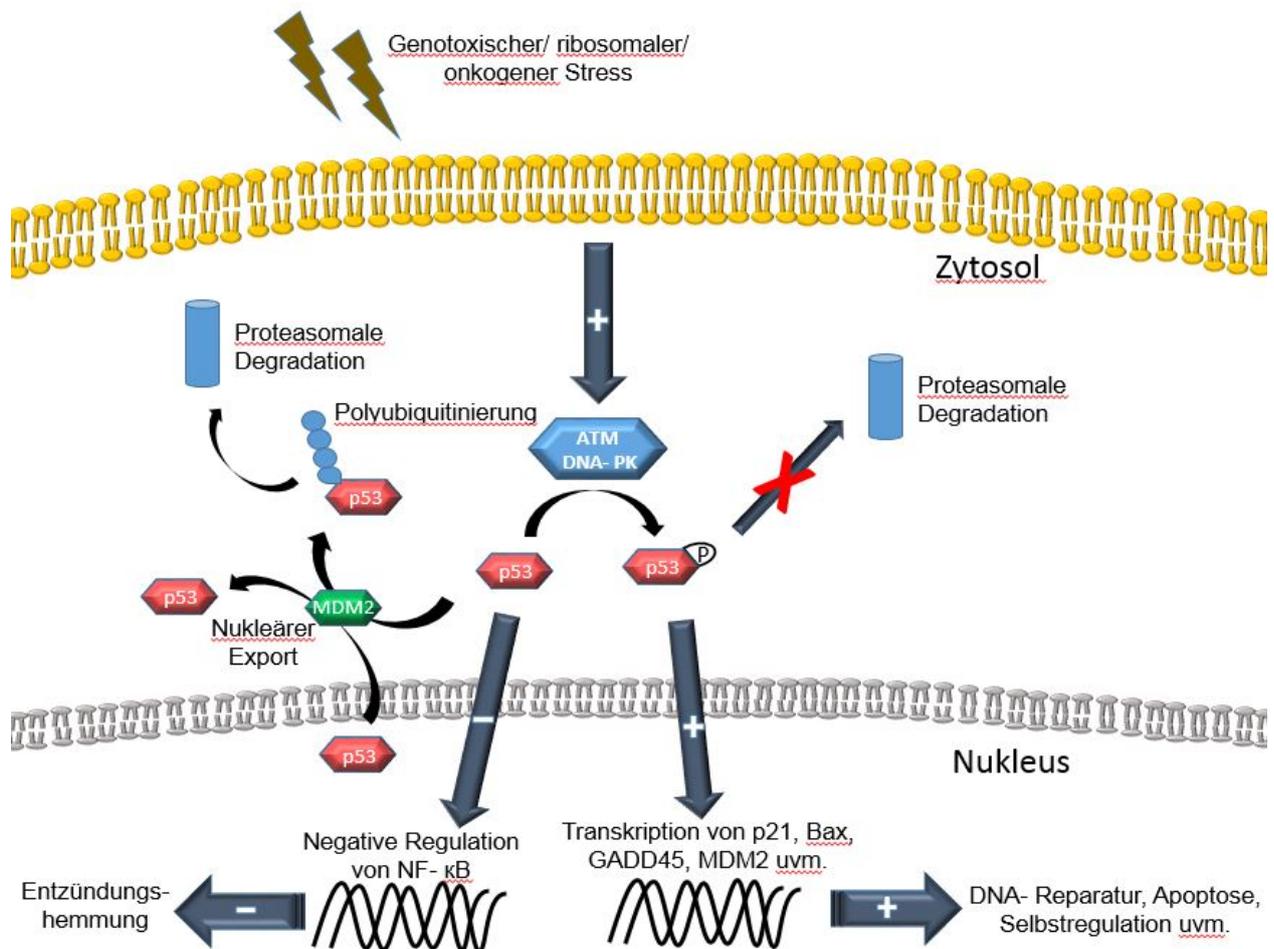


Abbildung 8: Die Regulationsmechanismen von MDM2 und p53. p53 wird durch intra- oder extrazellulären, genotoxischen Stress durch Kinasen wie ATM oder DNA-PK phosphoryliert. Dies verhindert den proteasomalen Abbau und induziert die Transkription von proapoptotischen Faktoren sowie die Einleitung von DNA-Reparaturmechanismen. p53 wirkt durch die negative Regulation von NF- κ B entzündungshemmend. Die wichtigste Regulation von p53 findet durch MDM2 statt.

1.6.2 Das MDM2-Protein

MDM2 (Murine Double Minute-2) ist als wichtiger Regulator vieler Mechanismen in allen Zellen Gegenstand vieler Untersuchungen und Studien. Es wird beim Menschen am *Mdm2*-Genlokus am Chromosom 12 transkribiert und wurde ursprünglich in Mäusen und erst später in Menschen entdeckt. In den beschriebenen Tierexperimenten wurde MDM2 spezifisch in CD4-Zellen ausgeschaltet.

1.6.2.1 Die Funktionen von MDM2

Das MDM2-Protein ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, welches nach bisherigem Wissensstand die Hauptaufgabe besitzt, als E3-Ubiquitinligase seinen Gegenspieler, das p53-Protein, dem Abbau zuzuführen [108, 109]. Das 56kDa schwere und 491 Aminosäuren lange

Protein ist beim Menschen am Chromosom 12 lokalisiert. MDM2 nimmt eine wichtige Rolle in der Zellhomöostase ein, nachdem p53 als Induktor des Zellzyklusarrestes und Zelltodes ohne Regulation die Zellviabilität massiv negativ beeinflusst und die Zellen absterben lässt (Podoptose) [110, 111]. Somit ist MDM2 sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch in allen Phasen des Zellzyklus sowie in der Kanzerogenese für das Gleichgewicht zwischen Zelltod, Viabilität und Mitose verantwortlich [112, 113]. Als Interaktionsdomäne wurden die letzten 52 N-terminalen Aminosäuren des p53-Moleküls identifiziert [114]. Die Expression und der Abbau werden durch verschiedene Feedback-Mechanismen reguliert. Sein Gegenspieler p53 agiert als aktivierender Transkriptionsfaktor am *Mdm2*-Gen, während MDM2 umgekehrt als Negativregulator von p53 wirkt [109]. MDM2 kann p53 sowohl mit einem Monomer als auch mit einem Polymer ubiquitinylieren. Monoubiquitinylierung resultiert in einem Transport aus dem Zellkern in das Zytosol zur räumlichen Trennung von DNA, damit p53 nicht als Transkriptionsfaktor wirken kann, während Polyubiquitinylierung mit mehr als 5 Ubiquitin-Molekülen den proteasomalen Abbau bedeutet [115, 116]. 2007 wurde auch festgestellt, dass abhängig von der Besetzung einer ATP-Bindestelle MDM2 in der Faltung und Entfaltung von p53 involviert ist. Wird eine Zelle gestresst, dissoziiert der MDM2-p53-Komplex und p53 wird wie durch das Hitzeschockprotein Hsp90 in der Faltung beeinflusst und kann mit einer höheren Affinität an die Promotorsequenzen der DNA binden [94].

Neben den p53-abhängigen Funktionen ist MDM2 auch im Entzündungsgeschehen involviert. So wurde gezeigt, dass MDM2 auch als Ko-Transkriptionsfaktor von NF- κ B, einem wichtigen Transkriptionsfaktor der Immunantwort, proinflammatorisch wirkt [117]. NF- κ B wiederum ist ein positiver Regulator von MDM2 und inhibiert damit indirekt p53, was während einer Entzündung die Proliferation und Aktivierung von Immunzellen fördert [116].

Über die Mechanismen der Degradierung von MDM2 selbst ist noch nicht viel bekannt, jedoch nimmt man an, dass sich MDM2 selbst durch Ubiquitinylierung reduziert. Zusätzlich konnte man RNF12, eine weitere E3-Ligase, identifizieren, welche zur Degradation von MDM2 beiträgt [118]. Es wurde jedoch auch eine Autopolyubiquitinylierung festgestellt, an der die Proteine anders als an Lysin 48 aneinander gebunden werden, was offenbar zur Stabilisierung des Proteins beiträgt [119].

1.6.2.2 Klinische Relevanz von MDM2

Wegen seiner verantwortungsvollen Funktion hat MDM2 in verschiedenen Disziplinen der Medizin Beachtung gefunden.

MDM2 führt bei Unterrepräsentation vor allem in der Embryogenese zu einer Verlagerung des Gleichgewichtes zu p53 und somit zu unkontrolliertem Zelltod, wie in Knockout-Experimenten mit Mäusen bewiesen wurde [120]. Es ist auch nachvollziehbar, dass bei allen Zuständen, bei denen exogener Stress eine p53-Aktivierung nach sich zieht, wie es bei Myokardinfarkten oder Infektionen vorkommt, eine zu geringe Produktion von MDM2 den Zelltod und damit den Organschaden fördert, weswegen man erfolgreich Pifithrin als p53-Inhibitor in Mausmodellen testet [121].

Umgekehrter Weise ist bei der Überexprimierung von *Mdm2* die Zelle bei zu starker negativer Regulation von *p53* nicht in der Lage, die physiologische Zellhomöostase aufrecht zu erhalten. Bei zu geringem Schub Richtung Zellzyklusarrest und Zelltod kann es zu überschießendem Zellwachstum und damit zu Tumoren kommen. MDM2 ist bereits seit längerem als Targetmolekül für Krebstherapie im Gespräch [91], nachdem in vielen verschiedenen Krebsarten *Mdm2* abnormal hochreguliert gefunden wurde. Mit einer besonders hohen Anzahl an *Mdm2*-Überexpressionen fielen Weichteiltumore (20%), Osteosarkome (16%) und Ösophaguskarzinome (13%) auf [122]. Auch in immunologisch bedingten Krankheiten wie systemischer Lupus erythematodes wurde die Überexpression von *Mdm2* bestätigt [123]. 2004 wurden schließlich die Imidazole Nutlin-1, -2 und -3 als Inhibitoren von MDM2 identifiziert [124], wobei sich vor allem Nutlin-3a in Studien bewährt hat. Nutlin-3a scheint neben der Aufhebung der MDM2-p53-Interaktion durch Bindung einer N-terminalen hydrophoben Tasche *p53* zu acetylieren und hochzuregulieren. Gleichzeitig wurde in Zellkulturen von AML, Lungenkrebs und Osteosarkomen nachgewiesen, dass mehr Histone und Hitzeschockproteine acetyliert werden und die Bildung von Hitzeschockproteinen verringert wird [125]. Nutlin-3a und deren oral zu verabreichende Form RG7112 ist mittlerweile in verschiedenen Krebsarten im Stadium der klinischen Studie angelangt und wird vor allem in hämatologischen Erkrankungen klinisch erfolgreich getestet [126]. Neben dem erwähnten Beispiel RG7112 sind eine Reihe weiterer MDM2-Inhibitoren aktuell im Fokus vieler klinischer Studien, wobei mit Problemen der Bioverfügbarkeit und allgemeiner Verträglichkeit gekämpft wird [127].

Der Einsatz von MDM2-Inhibitoren ist jedoch nur nach vorangehender Untersuchung des Karzinoms sinnvoll, nachdem die Effekte bei mutiertem *p53* nicht zu erwarten sind. Bei epigenetischen Untersuchungen von Krebs-DNA wurden auch Promotorregionen von *p53* identifiziert, welche bei Hypermethylierung eine erfolgreiche Wirkung unwahrscheinlich machen [128]. Komplizierend wirkt auch die Tatsache, dass mittlerweile über 40 Varianten von MDM2

identifiziert wurden, die durch alternatives Splicen zustande kommen und größtenteils unbekannte Funktionen haben [129].

MDM2 ist, wie oben erwähnt, in die Entzündungsreaktion miteingebunden und wird, wie in dieser Arbeit, im Hinblick von Einsatzmöglichkeiten im klinischen Alltag untersucht. Immunzellen können durch die Hochregulation von *Mdm2* vermehrt proliferieren. Zusätzlich verstärkt MDM2 durch die Aktivierung von NF- κ B die Entzündungsreaktion, was bei der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen eine wesentliche Rolle haben könnte.

1.6.2.3 MDM2 in der Niere

Die MDM2-p53-Interaktion ist durch ihre Aufgaben in allen Zellen von immenser Wichtigkeit, so auch in der Niere. In der Nephrogenese ist es von Bedeutung, wann welche Zellen die Phasen des Zellzyklus durchschreiten und diesen auch verlassen. Defekte dieses empfindlichen Systems können schwerwiegende Krankheiten wie renale Hypoplasie oder chronisches Nierenversagen zur Folge haben [130]. Dass Zelltyp-spezifische Knockout von *Mdm2* zum Nierenversagen führt, konnten Thomasova et al. in ihren Experimenten in Mäusen zeigen. Tubulusspezifisches Doxzyklin-abhängiges Knockdown von *Mdm2* führte durch Podoptose der Tubulusepithelzellen zum akuten Nierenversagen mit Erhöhung des Plasma-Kreatinins und Einbrechen der GFR [131]. Nachdem MDM2 auch im Entzündungs- und Proliferationsgeschehen eine Rolle spielt, scheint nicht verwunderlich, dass es bei tubulointerstitieller Fibrose als Aktivator von Fibroblasten aufgedeckt wurde [132]. Im Anti-GBM-Modell der Glomerulonephritis konnte durch Mulay et al. bestätigt werden, dass die Inhibierung von MDM2 durch Nutlin-3a die Halbmondbildung verringert und den Krankheitsverlauf deutlich verbessert [133]. Damit konnte er eine Empfehlung für den klinischen Gebrauch abgeben.

Durch p53-abhängige und -unabhängige Kaskaden spielt MDM2 bei Entzündung, Zellzyklus, Degeneration und Regeneration in unterschiedlichsten Krankheitsgeschehen der Niere eine Rolle, weshalb Forschung in diesem Bereich große klinische Bedeutung hat [116].

2 Hypothese

Der Einfluss von T-Zellen in der Pathogenese von Glomerulonephritiden wie der Anti-GBM-Nephritis ist bereits seit mehreren Jahren bekannt [72, 134, 135]. Auch *Mdm2* ist aufgrund seiner Funktion als Protoonkogen, seiner Rolle im Zellzyklus und als proinflammatorisches Protein bereits viel beforscht worden. So ist eine protektive Wirkung von allgemeiner Inhibierung von MDM2 durch Nutlin-3a bei rapid progressiver Glomerulonephritis durch Mulay et al. bereits nachgewiesen worden [133]. Es gibt jedoch noch keine Untersuchungen darüber, welchen Effekt ein Knockout von *Mdm2* in CD4-Zellen hat, beziehungsweise welche Folgen dieser Knockout bei einer Immunreaktion hat. Im Anti-GBM-Modell kann sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunreaktion untersucht werden.

CD4-Zellen sind überwiegend durch T-Helferzellen repräsentiert, welche die Bildung von Antikörpern durch B-Zellen anstoßen sowie die Immunreaktion befeuern. Wie bei anderen Zellen bereits gezeigt, liegt die Vermutung nahe, dass CD4-Zellen durch *Mdm2*-Knockout in den spezifischen Zelltod, der Podoptose getrieben werden. Wenn diese Zellen durch das Knockout von *Mdm2* nicht mehr effektiv proliferieren können, führt das theoretisch zu einer Begrenzung von Schaden bei immunologisch bedingten Glomerulonephritiden. Zusätzlich wird durch die Ausschaltung von *Mdm2* auch der Einfluss auf NF- κ B unterbunden, was eine weitere Verminderung der Entzündungsreaktion bedeuten würde.

Beim angewandten Anti-GBM-Nierenschädigungsmodell wird bei Mäusen ein Serum injiziert, welches die α 3-Domäne des Typ IV-Kollagens schädigt, was zu einer RPGN sowie einer Bildung von Halbmondformationen in den Glomeruli führt (s. im Kapitel „Methoden“). Die akute Entzündungsreaktion, welche durch die Bindung der injizierten Antikörper an die Basalmembran in Gang gesetzt wird, sollte durch den veränderten Einfluss von CD4-Zellen keinen Unterschied zeigen. Im Modell mit Präimmunisierung wird vermutet, dass durch die Verminderung der Immunreaktion durch den *Mdm2*-Knockout in CD4-Zellen die sekundäre autologe Nierenschädigung durch Immunkomplexe in geringerem Maße auftritt als in der Kontrollgruppe ohne Knockout. Dies lässt sich damit begründen, dass die Immunkomplexe aus neu gebildeten Antikörpern und den injizierten Antigenen bestehen, und die Produktion von neuen Antikörpern durch CD4-Zellen angestoßen wird. Da die CD4-Zellen durch *Mdm2*-Knockout dezimiert sind und die NF- κ B- Signalkaskade zusätzlich gestört ist, wird eine verminderte Immunkomplexbildung erwartet.

Hypothese: *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse besitzen weniger CD4-Zellen als die *Mdm2^{fl/fl}*-Kontrollmäuse. Bei *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen ist die Nierenschädigung während der autologen Phase des Anti-GBM-Nierenschädigungsmodells mit Immunkomplexnephritis geringer als bei der Kontrollgruppe. Im Modell ohne Präimmunisierung und in der Akutphase tritt kein Unterschied auf.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse wurden im Nephrologischen Institut aus *Cd4CreGarp^{fl/fl}*- und *Mdm2^{fl/fl}*-Mäusen gezüchtet. Die *Cd4CreGarp^{fl/fl}*-Mäuse kamen von Prof. Schulze-Koops, Rheumatologische Klinik, LMU München und die *Mdm2^{fl/fl}*-Mäuse von Prof. Lozano von der University of Texas, Houston, USA. Die Kontrollgruppe mit dem Genotyp *Cd4^{wt/wt}Mdm2^{fl/fl}* wird zur Vereinfachung im weiteren Text *Mdm2^{fl/fl}* bezeichnet.

3.2 Material

Zentrifugen:

Zentrifuge Universal 16	Hettich, Bäch, CH
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode, DE
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, DE
Mini-Zentrifuge Sprout	Kisker Biotechnologie, Steinfurt, DE

Pipettiergerät:

Pipettierhilfe EasyPet 3	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettierhilfe Pipetus-classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipette Pipetman (2, 20, 200, 1000µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipette Research Plus (30-300µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipette Research Pro (5-100µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Elektrische Pipette Research Pro (0,5-10µl und 20-300µl Multikanal)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen Sapphire (10µl, 200µl, 1000µl)	Grainer Bio-One, Frickenhausen, DE
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	BD, Heidelberg, DE
Pipettenspitzen epT.I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg, DE

Mikroskope:

Lichtmikroskop Leica DMRBE	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
----------------------------	---------------------------------

Lichtmikroskop Leitz DM IL LED	Leica Microsysteme, Solms, DE
Lichtmikroskop Wild MPS 52	Leica Microsysteme, Solms, DE

Waagen:

Waage BP 110S	Sartorius, Göttingen, DE
Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen, DE
Waage Cs200	Ohaus Corporation, USA

RNA-Isolation:

Homogenisator Ultra Turrax T25	IKA-Werke, Staufen, DE
--------------------------------	------------------------

cDNA-Synthese:

Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, DE
Nano drop	PEQLAB Biotechnology, Erlangen DE

qPCR:

LightCycler 480 Real-Time PCR System	Roche, Basel, CH
Klebefolie	Roche, Basel, CH
LightCycler 480 Multiwell-Platte 96	Roche, Basel, CH

Durchflusszytometrie:

BD FACSCalibur	BD Biosciences, San Diego, USA
BD FACS Canto II	BD Biosciences, San Diego, USA

Elisa:

ELISA-Reader GENios Plus	Tecan, Crailsheim, DE
ELISA-Reader MRX TC II	Dynex Technologies, VA, USA
ELISA Micoplate Strip Washer ELx50	BioTek, Bad Friedrichshall, DE
Mouse Albumin ELISA Quantitation Set	Bethyl-Lab's, Montgomery, USA
96-Well Maxisorp Elisaplatten	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Analyse-Sets:

Creatinine FS	DiaSys, Holzheim, DE
---------------	----------------------

Urea FS

DiaSys, Holzheim, DE

GFR-Messung:

„NIC-Kidney“-GFR-Messgerät

Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, DE

„NIC-Kidney“-Akkus und Ladegeräte

Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, DE

„NIC-Kidney patch“ Klebefolie

Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, DE

Leukoplast Klebeband

BSN medical, Hamburg, DE

Rasierklingen

Wilkinson, Solingen, DE

Histologie:

Mikrotom HM 340E

Microm, Heidelberg, DE

Einbettkassetten

Simport, St.-M.-de-Beloeil, CA

Zellkultur:

Inkubator Heracell 150

Heraeus Sepatech, Osterode, DE

Inkubator Type B5060 EC-CO2

Heraeus Sepatech, München, DE

Sicherheitswerkbank SterilGard Class II,
Typ A/B3

Baker Company, Sanford, USA Sicherheitswerkbank

Microflow Class II

Nunc, Wiesbaden, DE

UV-Licht

Bachofer LG, Reutlingen, DE

Zählkammer Neubauer

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

EASYstrainer 70µm Zellfilter

Greiner Bio-one

Medium RPMI1640

ThermoFisher, Waltham, USA

6-Well-Platten (Zellkulturschalen)

TPP, Trasadingen, CH

12-Well-Platten (Zellkulturschalen)

TPP, Trasadingen, CH

24-Well-Platten (Zellkulturschalen)

TPP, Trasadingen, CH

96-Well-Platten (Zellkulturschalen)

TPP, Trasadingen, CH

Vakuum-Pumpsystem BVC-21

Vacuubrand GmbH, Wertheim, DE

Vakuumfiltration 150 „rapid“-Filtermax

TPP, Trasadingen, CH

Wasserbad HI 1210

Leica Microsysteme, Wetzlar, DE

Sonstige Geräte:

Magnetrührer IKAMAG REO

IKA-Werke, Staufen, DE

pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, DE
Vortex Genie 2™	Scientific Industries, Bohemia, USA
Autoklaven	
Trockner für autoklavierte Utensilien	
Eismaschine	

Software:

ImageJ 1.50i	National Institutes of Health, USA
Graphpad Prism 5	GraphPad Software, Inc., CA, USA
XFlour 4	Tecan, Crailsheim, DE
Nanodrop ND-1000 V3.1.0	Thermo Scientific, Rockford, USA
Tree Star FlowJo X 10.0.7 R2 x64	FlowJo LLC, OR, USA
LightCycler® 480 SW 1.5.1	Roche, Basel, CH
Revelation 4.25	Dynex Technologies, VA, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, WA, USA
MPD Lab	Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, DE
Endnote X7/ X8	Thomson-Reuters, NY, USA

Sonstiges:

Tube-Ständer	
Mikropipetten 20µl	Blau, Wertheim, DE
Albustix®	Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA
96-Well-Platten für Kolorimetrie	Thermo Scientific, Roskilde, DEN
Handschuhe	BI Braun, Melsangen, DE
Gesichtsmaske	Klinion Protection, Oud-Beijerland, NL
Pinzetten, Scheren	Miltex, Rietheim-Weiltheim, DE
Eppendorf- /Falcon-Reaktionsgefäße (0,7ml, 1,5ml, 2ml)	TPP, Trasadingen, CH
Falcon-Reaktionsgefäße 15ml, 50ml	BD, Heidelberg, DE
BD Microlance Injektionsnadeln (20G-30G)	BD, Drogheda, Ireland
BD Spritzen (1ml, 2ml, 5ml)	BD, Madrid, E

Model 100 Isofluran Vaporizer

SurgiVet, Norwell, USA

Maus-Narkosekammer

SurgiVet, Norwell, USA

Luftreinigungsgerät

Bickford, Wales Center, USA

Kapillarröhrchen

3.3 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Zellkultur:

DMEM-Medium

Invitrogen, Karlsruhe, DE

Fetales bovines Serum (FBS)

Summit Biotechnology, Fort Collins, USA

Penicillin/Streptomycin (PS)

PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE

Dulbecco's PBS (1x)

PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE

Trypsine/EDTA

PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE

HyClone Fetal Bovine Serum

Thermo Scientific, Rockford, USA

L-Glutamin

PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE

GFR-Messung:

Isofluran CP

CP-Pharma, Burgdorf, DE

FITC-Sinistrin

Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE

RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR:

Hexanucleotide-Mix

Roche Life Science, Basel, CH

Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

RNase-Free[®] DNase Set

Qiagen, Hilden, DE

β-Mercaptoethanol

Carl Roth, Karlsruhe, DE

100 % Ethanol

Merck, Darmstadt, DE

RNA-later

Qiagen GmbH, Hilden, DE

PureLink[™] RNA Mini Kit

Ambion, Darmstadt, DE

RNasin (40 U/μl)

Promega, Mannheim, DE

RNase Away

Molecular BioProducts Inc., San Diego, USA

Superscript II

Invitrogen, Karlsruhe, DE

Linear Acrylamid

Ambion, Darmstadt, DE

DTT (0,1M)

Invitrogen, Karlsruhe, DE

dNTPs (25nM)	GE Healthcare, München, DE
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, DE
MgCl ₂ (25mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
10x Taq Puffer Without Detergent	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
SYBR Green Dye Detection	Applied Biosystems, Norwalk, USA
BioStab PCR Optimizer	Bitop, Witten, DE
Taq DNA Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
10x PE-Puffer	ThermoFisher, Waltham, USA
1,25mM dNTPs	Metabion GmbH, Planegg, DE
Taq-DNA-Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
Primer	Metabion GmbH, Planegg, DE

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer

Gen	Forward-Sequenz	Reverse-Sequenz
18s	5'-GCA ATT CCC CAT GAA CG-3'	5'-AGG GCC TCA CTA AAC CAT CC-3'
Arg-1	5'-TGA GCT CCA AGC CAA AGT CC-3'	5'-GGT CTC TCA CGT CAT ACT CTG TTT-3'
CCL-5	5'-CCA CTT CTT CTC TGG GTT GG-3'	5'-GTG CCC ACG TCA AGG AGT AT-3'
Csf2R	5'-AAC CTC CTG GAT GAC ATG CCT G-3'	5'-AAA TTG CCC CGT AGA CCC TGC T-3'
FOXP-3	5'-ACT GCT GGC AAA TGG AGT CT-3'	5'-GCA CCA CTT CTC TCT GGA GG-3'
Fizz	5'-TGG GAT GAC TGC TAC TGG GT-3'	5'-AAC GAG TAA GCA CAG GCA GT-3'
IL1AHar1	5'-CGA AGA CTA CAG TTC TGC CAT T-3'	5'-GAC GTT TCA GAG GTT CTC AGA G-3'
IL-1B	5'-TTC CTT GTG CAA GTG TCT GAA G -3'	5'-CAC TGT CAA AAG GTG GCA TTT -3'
IL-2RA	5'-TTG CTG ATG TTG GGG TTT CT-3'	5'-AGG AGA GGG CTT TGA ATG TG-3'
IL-6 1	5'-CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG-3'	5'-GGA AAT TGG GGT AGG AAG GA-3'
IL-6 2	5'-AAC GAT GCA CTT GCA GA-3'	5'-TGG TAC TCC AGA AGACCA GAG G-3'
IL-10-1	5'-TAA GGC TGG CCA CAC TTG AG-3'	5'-GTT TTC AGG GAT GAA GCG GC-3'
IL-10-2	5'-GGC GCT GTC ATC GAT TTC TC-3'	5'-ATG GCC TTG TAG ACA CCT TGG-3'
IL-12a	5'-CTA GAC AAG GGC ATC CTG GT-3'	5'-GCT TCT CCC ACA GGA GGT TT-3'
IL-12b	5'-AGC AGT AGC AGT TCC CCT GA-3'	5'-AGT CCC TTT GGT CCA GTG TG-3'
IL-17RA	5'-CCC AGT AAT CTC AAA TAC CAC AGT TC-3'	5'-CGA TGA GTG TGA GGC CAT A-3'
IL-17A	5'-CAG GGA GAG CTT CAT CTG TGT-3'	5'-GCT GAG CTT TGA GGG ATG AT-3'
IL-17B	5'-CTT GGT GGG ATG GAC TGG-3'	5'-TCT TTT GCC TTT GGT GTT CC-3'
IL-17RB	5'-AGT GTT GCT GAT CTT GGC TG-3'	5'-TGT GTT GGA CCA TCC ACT CT-3'
IL-17C	5'-CTG GAA GCT GAC ACT CAC G-3'	5'-GGT AGC GGT TCT CAT CTG TG-3'

IL-17RC	5'-GAG TCC CTG CCA GCC ACT T-3'	5'-ACT GGA AAT CTT GTG GCT CAT TC-3'
IL-17D	5'-TGA GTG CAT AAT TGT AGT GCT CAG-3'	5'-ACT CAG GGA CAG GGC ACA-3'
IL-17RD	5'-CCA TCA CTG TGCCTC TGG TTG T-3'	5'-GAG AGC CGC AGC GTA TGT GGA-3'
IL-17E	5'-TGG AGC TCT GCA TCT GTG TC-3'	5'-GAT TCA AGT CCC TGT CCA ACT C-3'
IL-17RE	5'-AAT TCC TTC TGC CCT GCA T-3'	5'-ACA CTT TTT GCG CCT CAC AG-3'
IL-17F	5'-CCC AGG ACA TAC TTA GAA GAA A-3'	5'-CAA CAG TAG CAA AGA CTT GAC CA-3'
IL-22	5'-TGG GAT TTG TGT GCA AAA GCA-3'	5'-TAA TTT CCA GTC CTG TCT G-3'
INF- γ	5'-CGG CAC AGT CAT TGA AAG CC-3'	5'-TGT CAC CAT CCT TTT GCC AGT-3
iNOS	5'-GAG ACA GGG AAG TCT GAA GCA C-3'	5'-CCA GCA GTA GTT GCT CCT CTT C-3'
Kim-1	5'-TGG TTG CCT TCC GTG TCT CT-3'	5'-TCA GCT CGG GAA TGC ACA A-3'
MRC-1	5'-CCT CTT AAT TCA GCA TCA CT-3'	5'-TGC ATT GCC CAG TAA GGA GT-3'
Ngal1L	5'-TGA ACT TCT GAA AAC GGC CT-3'	5'-AGC AGT AAG GGC ACA AT-3'
Ngal2L	5'-AAT GTC ACC TCC ATC CTG GC-3'	5'-ATT TCC CAG AGT AA CTG GT-3'
TGFb1	5'-ACT GGA GTT GTA CGG CAG TG-3'	5'-GGG GCT GAT CCC GTT GAT T-3'
TIMP-2	5'-CGT TTT GCA ATG CAG ACG-3'	5'-GAA TCC TCT TGA TGG GGT-3'
TNF- α	5'-CCA CGC TCT GTC TAC-3'	5'-AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT-3'
Ym-1	5'-AGA AGC AAT CCT GAA GAC ACC AT-3'	5'-TCC TAT TGG CCT GTC CTT AGC C-3'

ELISA:

Murines IL6 ELISA-Set	BD, Erembodegem, B
Albumin, IgG, IgM, IL-10, IFN- γ -ELISA-Set	Bethyl Laboratories, Texas, USA
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences, San Diego, USA
di-Hydrogensulfat (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe, DE
Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Durchflusszytometrie:

Counting beads	Thermo Fisher Scientific Inc., Erlangen, DE
----------------	---

Tabelle 2: Die Flourophor-konjugierten Antikörper für die Durchflusszytometrie

Anti-Maus-Antikörper	Flourochrom	Hersteller
Ly6G	PerCP	BD Biosciences
CD11b	PE	BD Biosciences
CD3	FITC	BD Biosciences
CD4	APC	BD Biosciences
CD69	PE	BD Biosciences
CD8a	PerCP	BD Biosciences
GR1	APC	BD Biosciences
CD45	PE/ Cy5	BD Biosciences
CD19	PE	BD Biosciences
CD5	FITC	BD Biosciences
F4/80	APC	BD Biosciences

Histopathologische Methoden

Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylol	Fischer Chemicals, Zürich, CH
Methanol	Merck, Darmstadt, DE
VectaMount Permanent Mounting Medium	Vector Laboratories, CA, USA
Perjodsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Schiff-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hämatoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
WT1 sc-192– Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg, DE
Nephrin BP5030	Acris, Herford, DE
TO-PRO3 T3605	ThermoFisher, Waltham, USA

Tabelle 3: Immunohistologische Antikörper

Anti-Maus-Antikörper	Hersteller
CD3	Serotec, Oxford, UK
CD31	Optistonin, Hamburg, DE
F4/80	Bio-Rad, München, DE
IL-22	Santa Cruz, Heidelberg, DE
IL-22-Rezeptor	Santa Cruz, Heidelberg, DE
LY-6b	Serotec, Oxford, UK
Maus-IgG gesamt	Vector Laboratories, CA, USA
MAC-2	Cedarlane, NC, USA
Schaf-IgG gesamt	Vector Laboratories, CA, USA
Maus-IgM	Vector Laboratories, CA, USA

Sonstiges:

ChromPure Sheep IgG Whole Molecule 11mg/ml	Jackson Immuno Research Laboratories
Complete Freund's Adjuvant	Sigma Aldrich
Sheep Anti-Rat Glomeruli	Probetex, Inc.
EDTA	Biochrom, Berlin, DE
Isofluran Forene	Abbott, Chicago, USA
Formaldehyd	ThermoFisher, Waltham, USA
Formaldehyd 4%	Morphisto, Frankfurt, DE
Purified Anti-Mouse Antibody 252	BioLegend, San Diego, USA
Purified Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody	BioLegend, San Diego, USA

3.4 Tierexperimentelle Methoden

3.4.1 Cre/LoxP-System

Die Mäuse, welche in den Experimenten untersucht wurden, waren gentechnisch modifiziert. Durch den Einsatz des Cre/LoxP-Systems wurde das *Mdm2*-Gen aus *Cd4*-exprimierenden Zellen eliminiert. Dieses System wurde in den 80er Jahren von einem amerikanischen Chemiekonzern patentiert und kann für gezielte Translokationen, Inversionen und Deletionen verwendet werden. Cre steht für „Causes Recombination“ oder „Cyclization Recombination“ und ist ein Protein mit 343 Aminosäuren, welches aus P1-Bakteriophagen isoliert wurde. Es hat die Eigenschaft, an die *LoxP*-Gensequenz zu binden und dort DNA-Stränge zu rekombinieren. Um Gene nur in spezifischen Zellen auszuschalten, kann *Cre* unter die Kontrolle eines weiteren Genes gestellt werden, welches als Promotor die Transskription von *Cre* anstößt. Alternativ kann man in ligandengesteuerten Varianten das Zielgen durch die Gabe von Doxycyclin oder Tamoxifen zu einem gewünschten Zeitpunkt eliminieren, was aber in dem beschriebenen Modell nicht der Fall war.

Cre bindet als Dimer an einen DNA-Doppelstrang an die *LoxP* (Locus Of X Over P1) -Sequenz, einer Gensequenz aus 34 Basenpaaren. Die Sequenz besteht aus zwei jeweils 13bp langen palindromischen Aminosäuresequenzen und einer 8bp langen Core-Sequenz dazwischen. Zwei dieser *LoxP*-Sequenzen flankieren das gewünschte Zielgen, welches transloziert, invertiert oder deletiert werden soll. Cre katalysiert nun die Zerschneidung und neue Verbindung der DNA, wobei entgegengesetzte Core-Sequenzen die Inversion des Zielgens und gleichgerichtete Sequenzen die

Deletion zur Folge haben. Bei der Deletion verbindet sich die exzidierte DNA zu einem Ring, während eine *LoxP*-Sequenz in der DNA verbleibt (s. Abbildung 9).

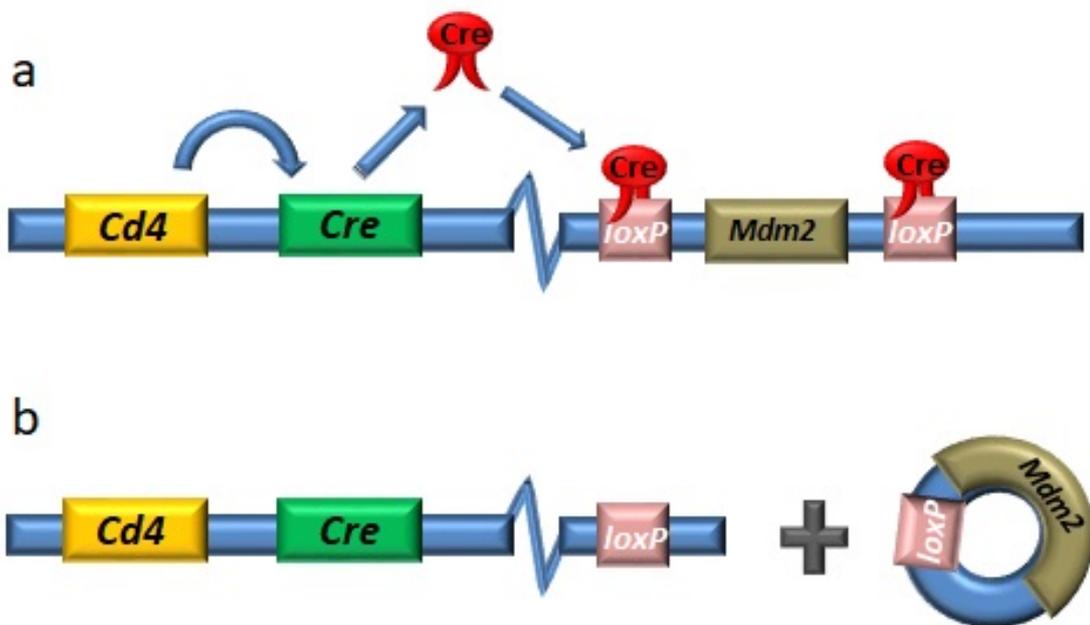


Abbildung 9: Das Cre-Lox-System am Beispiel von *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*. *Cd4* ermöglicht die Expression von *Cre* spezifisch in CD4-Zellen. In der Folge kann durch die Katalyse von Cre die Deletion und Rekombination des DNA-Doppelstranges stattfinden. *Mdm2* wird entfernt und eine *LoxP*-Sequenz verbleibt im Genom.

3.4.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte bei Mäusen im Alter von etwa drei Wochen nach der Geburt. Für die Lyse wurde 150µl DirectPCR® Lysis Reagent Tail mit 1µl Proteinase K-Lösung verwendet. In dieser Lösung wurde ein kleines Schwanzstück der Mäuse für mindestens drei Stunden bei 55°C in einem Heizblock (Thermomixer) schüttelnd inkubiert, bis es komplett lysiert war. Danach wurde das Lysat für 45 Minuten bei 85°C inkubiert, um die Proteinase K vollständig zu denaturieren und damit zu inaktivieren. Im nächsten Schritt wurde das Produkt eine Minute lang bei 12000 U/min zentrifugiert, um das Kondensat vom Deckel des Reaktionsgefäßes und etwaige Festbestandteile von der restlichen Flüssigkeit zu trennen.

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Reaktionszyklus, bei der ein oder mehrere Abschnitte der DNA gezielt vervielfältigt werden können, um im Anschluss die Reaktionsprodukte in Banden mittels Gelelektrophorese aufzutrennen.

Hierbei werden Primer eingesetzt, welche hochspezifische, kurze Gegenstücke von DNA-Sequenzen darstellen, die die gesuchte DNA-Sequenz flankieren. Der DNA-Doppelstrang wird

zunächst bei 96°C denaturiert, also in Einzelstränge aufgetrennt, danach wieder auf 72°C abgekühlt. Die Primer können sich an die nun einzelsträngigen DNA-Stücke komplementär anlagern („Annealing“). Eine hitzestabile DNA-Polymerase kann nun beginnend beim Primer mit zum Reaktionsgemisch hinzugefügten Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP's) einen neuen komplementären Strang synthetisieren. Durch Wiederholung des Denaturierungsvorganges, erneutem Annealing des Primers und der Synthese des neuen Stranges steigt die Anzahl der gesuchten Genabschnitte exponentiell an, bis sie bei der anschließenden Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden können. Die Temperaturen können in einem Heizblock (Thermocycler) automatisch zyklisch verändert werden.

Die in den Experimenten verwendeten Mäuse wurden auf das Vorhandensein von *Cd4CreMdm2^{fl/fl}* und *Flp* untersucht.

Für *Cd4Cre* und *Flp* wurde ein Mastermix von 2,5µl 10x PE Buffer, 4,0µl 1,25mM dNTPs, 1µl 10774-Cre (1:10), 1µl 10775-Cre (1:10), 24200flp-HSK1, 24201flp-HSK1, 0,2µl Taq DNA Polymerase (5,000U/ml), 15,8µl Wasser und 1,0µl DNA zusammengestellt.

Tabelle 4: Die Sequenzen der Primer für die Überprüfung auf *Cd4Cre* und *Flp*

Primernamen	Sequenz
10774-Cre	5'-CTGGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGC-3'
10775-Cre	5'-AATCCATCGCTCGACCAGTTTAGTTACC-3'
24200flp-HSK1	5'-ATGGCTTAGTTTCCCATAGAACAGGATACTAGTC-3'
24201flp-HSK1	5'-ATCTGGTTGTCACCTAAATCCAGGTGACG-3'

Tabelle 5: Anzahl der Basenpaare der jeweiligen PCR-Produkte

PCR-Produkt	Anzahl der Basenpaare
<i>Cd4Cre</i> pos.	553 bp
<i>Flp^{wt/wt}</i>	465 bp
<i>Flp^{fl/fl}</i>	574 bp

Dieser Mix wurde zunächst 5 Minuten bei 94°C inkubiert, danach wird ein Zyklus von 30 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 60°C und 1 Minute bei 72°C 35 Mal wiederholt. Im Anschluss wurde für 7 Minuten bei 72°C inkubiert und das Produkt schließlich bei 4°C gelagert.

Für *Mdm2* wird ein Mastermix von 2,5µl 10x PE Buffer, 4,0µl 1,25 mM dNTPs, 5µl 5x Pcr Optimizer, 1µl FM-A (1:10), 1µl FM-B (1:10), 1µl FM-C (1:10), 24200flp-HSK1, 24201flp-HSK1, 0,2µl Taq DNA Polymerase (5,000U/ml), 9,8µl Wasser und 0,5µl DNA zusammengestellt.

Tabelle 6: Die Sequenzen der verwendeten Primer für die Überprüfung auf *Mdm2*

Primername	Sequenz
FM-A	5'-TGT GGA GAA ACA GTT ACT TC-3'
FM-B	5'-CTG TGC TCC TTC ACA GAG-3'
FM-C	5'-TGA GAT GAG TCA AAG CCT GG-3'

Dieser Mix wurde zunächst 5 Minuten bei 94°C inkubiert, danach wird ein Zyklus von 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 55°C und 2 Minuten bei 72°C 35 Mal wiederholt. In *Mdm2*^{wt/wt}-Mäusen entstehen PCR-Produkte mit 342 Basenpaaren, in *Mdm2*^{fl/fl}-Mäusen haben die Produkte die Länge von 474 bp. Im Anschluss wurde für 5 Minuten bei 72°C inkubiert und das Produkt ebenfalls bei 4°C gelagert.

Um das Ergebnis auszuwerten, wurde die Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt. Dies ist ein Verfahren, in dem die negativen elektrischen Ladungen der DNA-Moleküle ausgenutzt werden, um die Moleküle der Größe nach aufzutrennen. Sie laufen entsprechend ihrer Gegenladung zum positiven Pol, und das umso langsamer, desto größer und länger sie sind.

Dazu wurde zunächst ein Gel aus 2% Agarose und 98% TBE-Puffer hergestellt und abgekühlt, bis ein Festzustand erreicht war. Mit der Gussform wurden Taschen eingebracht, welche später die Proben aufnahmen.

Nach der Aushärtung wurde das Gel mit TBE-Puffer bedeckt und die Proben, in diesem Fall das Lysat der Mäuseschwänze, mit 4µl Ladepuffer vermischt. Zur Quantifizierung wurde ein DNA-Marker mit bekannten Fragmentlängen in eine außenliegende Tasche pipettiert und 8µl die Proben in die restlichen Taschen gefüllt. Für 35 Minuten legte man eine Spannung von 200 Volt an, was die Wanderung der Proben in Richtung des Gegenpols bewirkte. In dem Gel befand sich der Farbstoff Ethidiumbromid, welcher sich zwischen die Basen von RNA und DNA einlagerte und bei dieser Interaktion unter UV-Licht fluoreszierte. So wurden die Banden untersucht und fotografisch dokumentiert, wodurch das Vorhandensein des bestimmten Gens verifiziert oder falsifiziert werden konnte (s. Abbildung 10).

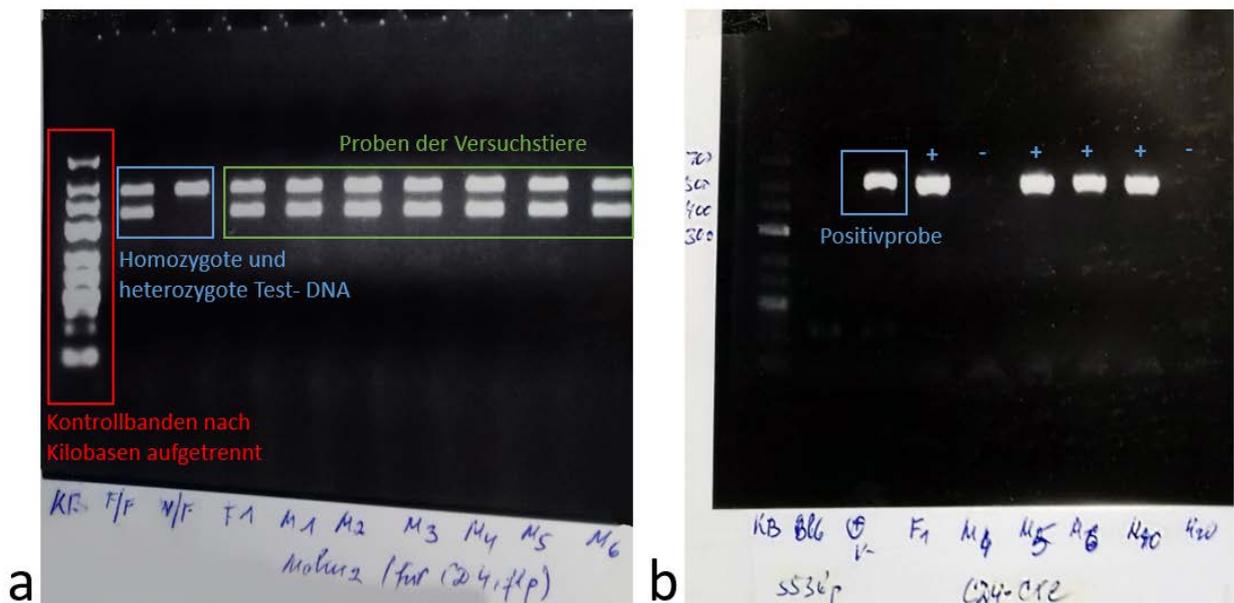


Abbildung 10: Auswertung der Gelelektrophorese für die Gene *Mdm2^{fl/fl}* und *Cd4Cre*. Die Banden am linken Rand zeigen die Laufweiten der verschiedenen DNA-Längen (in Kilobasen; kb). In **a** zeigen sich bei allen Mäusen die zwei *LoxP*-Sequenzen. In **b** sind abgesehen von M4 und M20 die Mäuse *Cd4Cre* positiv.

3.4.3 Tierhaltung

Das Handling der Mäuse erfolgte nur durch geschultes Personal mit den nach der Tierschutzversuchstierverordnung erforderlichen Kenntnissen. Insbesondere wurde auf die Einhaltung des 3R-Prinzips geachtet. Die drei Initialien stehen für Replace, Reduce, Refine.

Replacement (Ersatz) steht dafür, dass, wenn es möglich ist, auf den Tierversuch verzichtet und eine alternative Methode gewählt wird. Reduction (Reduktion) bedeutet, dass die Anzahl der Versuchstiere auf ein Minimum reduziert wird. Die Gruppengröße wird statistisch errechnet und die Methoden optimiert, um unnötiges Tierleid zu vermeiden. Refinement (Verbesserung) findet sich in den möglichst artgerechten Lebensbedingungen der Tiere und in den Methoden, welche schonend gestaltet und stetig verbessert werden.

Alle beteiligten Personen nahmen verpflichtend am Modul „Versuchstierkunde“ teil und schlossen mit einer Prüfung ab. Das Labor des Nephrologischen Zentrums ist für die Haltung von Mäusen für tierexperimentelle Tätigkeiten zugelassen und besitzt einen eigenen Raum zur Haltung der Tiere. Der Raum darf aufgrund von Infektionsschutz und Reduzierung der Keimbelastung nur mit Laborkittel, Einmalhandschuhen, Mundschutz und mit Kopfnetz betreten werden. Die Schuhe werden vor dem Betreten auf eine klebende Matte gestellt und das Einbringen von Schmutz mit Schuhüberziehern verhindert. Auf regelmäßige Händedesinfektion vor dem Anfassen von Käfigen

wird geachtet. Die Desinfektion von Waagen, Behältern und Flächen vor und nach der Benützung ist ebenfalls Hygienestandard.

Die Genehmigung der Versuche wurde von der Bayrischen Landesregierung eingeholt und die Bedingungen entsprachen zu jeder Zeit den von der EU vorgegebenen verbindlichen Richtlinie 2010/63/EU sowie dem deutschen Tierschutzgesetz und der Tierschutzversuchstierverordnung. Die gesetzlichen Vorgaben zur Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit, Beleuchtung, Käfiggröße werden ebenfalls eingehalten. Die Mäuse werden bei 20-23°C und 45-65% Luftfeuchtigkeit gehalten und die Beleuchtung wird in 12-Stundenzyklen ein- und ausgeschaltet.

Die mit den Versuchstieren in Kontakt tretenden Materialien wie Streu, Wasser, Futter, Käfige und Häuschen werden vor dem Einsatz autoklaviert. Die Mäuse werden zweimal pro Woche von einer ausgebildeten Tierpflegerin in frische Käfige umgesetzt und auf augenscheinliche Gesundheit kontrolliert.

In einem Käfig werden maximal fünf gleichgeschlechtliche erwachsene Mäuse gehalten, für die Züchtung von Nachwuchs wurde meist ein Männchen mit zwei Weibchen zusammengesetzt. Die Jungtiere werden nach der Geburt etwa drei Wochen beim Muttertier belassen, bevor die genotypische Bestimmung und die Trennung erfolgen.

Die Fütterung erfolgt *ad libitum* durch ständigen Zugang der Tiere zu Pellets und der Wasserflasche.

3.4.4 Markierung und Probennahme für die Genotypisierung

Nachdem bei den Experimenten der Genotyp $Cd4CreMdm2^{fl/fl}$ erforderlich war, wurde im Alter von etwa drei Wochen die Bestimmung des Genotyps durchgeführt. Um möglichst hygienische Bedingungen zu gewährleisten, wurde diese Arbeit unter einem Abzug geleistet. Die Jungtiere wurden hierzu einzeln aus dem Käfig genommen, das Geschlecht bestimmt, für die Bestimmung des Genotyps ein etwa zwei Millimeter großes Stück der Schwanzspitze mit einer Schere abgeschnitten und in einem Behältnis aufgefangen. Die Markierung erfolgte im gleichen Zuge durch Ohrlochung.

Die Gewebeprobe wurde bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Untersuchung auf das Vorhandensein der gesuchten Genabschnitte erfolgte durch Vervielfältigung dieser Bereiche durch Polymerasekettenreaktion und das Auftrennen der Banden durch Gelelektrophorese.

3.4.5 Anästhesie und Probengewinnung

3.4.5.1 Anästhesie

Eine Betäubung der Maus ist erforderlich, wenn die Schmerzen oder der Stress nicht zumutbar sind oder wenn eine Methode die Ruhigstellung notwendig macht. Dazu gehören beispielsweise die Blutabnahme oder die Rückenrasur vor der GFR-Messung.

Es werden zwei Arten der Anästhesie im Labor eingesetzt: die inhalative, kurzzeitige Anästhesie mit Isofluran und die lang andauernde intraperitoneale Anästhesie.

Für die kurzzeitige Schmerzausschaltung und Ruhigstellung wird die Maus in eine Narkosekammer gesetzt und 5% Isofluran und Sauerstoff in die Kammer geleitet. Je nach Größe und Alter der Maus beziehungsweise der gewünschten Narkosetiefe wird das Tier einige Minuten in der Kammer gelassen. Die Narkose dauert einige Sekunden bis Minuten an. Eine tiefere und länger andauernde Narkose wurde für dieses Projekt nicht benötigt.

3.4.5.2 Blutentnahme

Im Zuge der Arbeit wurden im Verlauf der Experimente Blutentnahmen durchgeführt. Diese erfolgten ausnahmslos an der *V. facialis* unter Anästhesie.

Der Arbeitsplatz wurde desinfiziert, das benötigte Material vorbereitet sowie die Narkosekammer mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran geflutet.

Die Mäuse wurden zunächst kurzzeitig anästhesiert und auf Bewusstlosigkeit kontrolliert. Nun wurde die Vene mit einer Lanzette punktiert und das Blut in EDTA-gefüllte Eppendorfgeläße getropft. Die Entnahmemengen richteten sich nach Größe und Alter der Maus sowie nach dem weiteren Procedere. Die Einstichstelle wurde mit einem Papiertuch von ausgetretenem Blut gesäubert und komprimiert und die Maus bis zur Aufwachphase im Auge behalten.

Im Gefäß musste die ordentliche Vermengung des Blutes mit EDTA durch kurzes Schütteln oder durch Benützung des Vortexmischers sichergestellt werden. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Gefäß bei +4°C gelagert.

Danach mussten die Blutproben 8 Minuten bei 8000 U/min zentrifugiert werden, um den Zellbestand vom Serum zu trennen. Das Serum wurde abpipettiert und in ein weiteres Reaktionsgefäß gefüllt, während die abzentrifugierten Blutkörperchen verworfen wurden.

In den Tagen nach einer Blutabnahme musste mit einer Gewichtsreduktion und Schwäche der Mäuse gerechnet werden.

3.4.5.3 Uringewinnung

Zur Berechnung des Albumin-Kreatinin-Verhältnisses musste die Albuminkonzentration über ELISA und die Kreatininkonzentration mittels einem kolorimetrischen Test ermittelt werden. Zur Gewinnung der Urinproben wurde die Maus in möglichst stressfreier und stiller Umgebung aus dem Käfig genommen und das Auffanggefäß (1,5ml Eppendorf-Tube) direkt an das Genital gehalten. Dabei wurde der Schwanz der Maus in die Höhe gehalten und der Körper am Käfiggitter fixiert. Bei leichtem Druck des Körpers gegen den Käfigrand oder vorsichtigem Massieren der Blase kann dadurch der Urin gewonnen werden. Alternativ konnte die Maus am Kragen hinter den Ohren mit Daumen und Zeigefinger genommen und auf den Rücken gedreht werden. Hier konnte die Blase getastet und mit leichtem Druck zur Entleerung bewogen werden. Die Probenbehälter wurden gekennzeichnet und bei -20°C eingefroren.

3.4.5.4 Tötung und Gewinnung von Organmaterial

Die Tötung der Mäuse erfolgte mittels zervikaler Dislokation. In den meisten Fällen wurden davor Urin- sowie Blutproben abgenommen, weshalb eine Narkose durchgeführt wurde.

Für eine RNA-Proben wurden zur Konservierung der RNA in RNAlater®-Lösung aufbewahrt.

Die histologische Probe wurde in eine beschriftete Einbettkassette gelegt. Die Proben wurden für 24 Stunden in Formaldehyd fixiert und danach für die weitere Verarbeitung in eine 70% Ethanollösung gelegt. Für die Proteinanalyse wurde ein restliches Stück ohne Lösung eingefroren.

3.4.6 Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Die glomeruläre Filtrationsrate gibt Auskunft über den Funktionszustand der Nieren und deren Fähigkeit, harnpflichtige Stoffe aus dem Blutkreislauf zu entfernen. Während im klinischen Alltag im Krankenhaus bei Menschen die GFR mit der Cockcroft-Gault-Formel mit verschiedenen Parametern aus der Serumkreatininkonzentration annähernd ermittelt werden kann, wird bei Mäusen die GFR errechnet, indem die renale Elimination von Sinistrin im Blutkreislauf transkutan optisch gemessen wird.

Dazu wurden die Mäuse unter kurzzeitiger Narkose mit einer Rasierklinge im Bereich der Schulterblätter und hinter den Ohren rasiert. Danach wurde ein Lichtsensor mit einem Tape auf der kahlen Haut fixiert und für etwa 5 Minuten ein Basiswert gemessen. Nun wurden 200µl Sinistrin retrobulbär intravenös injiziert. Sinistrin ist ein pflanzliches Polysaccharid, welches nicht von den Zellen aufgenommen und rein renal ausgeschieden wird. Zusätzlich kann Sinistrin tubulär weder sezerniert noch reabsorbiert werden. Durch den optischen Sensor wurde nun für etwa 90

Minuten das Sinistrin durch die Haut hindurch gemessen und so die Halbwertszeit ($t_{\frac{1}{2}}$) und R^2 der Kurve bestimmt. Die Daten wurden in der Zwischenzeit auf einem Chip gespeichert, und durch eine Software ausgelesen. Durch die Formel

$$\frac{14616,8}{\frac{t}{2} [\text{min}]} * \frac{\text{Körpergewicht [g]}}{100} = \text{GFR}[\mu\text{l}/\text{min}]$$

konnte nun die GFR berechnet werden.

3.4.7 Anti-GBM-Nierenschädigungsmodell

Um die Effekte des *Mdm2*-Knockouts in CD4-Zellen zu untersuchen, wurde das Anti-GBM-Nierenschädigungsmodell eingesetzt. Es ist ein nephrotoxisches, antikörpervermitteltes Modell, welches vom japanischen Pathologen Masugi 1933 entwickelt wurde [136]. Dabei können Nierenerkrankungen nachgestellt werden, welche in verschiedenen Phasen des Modells auftreten [137]. Zunächst werden Tiere, im Falle der beschriebenen Experimente handelte es sich um Schafe, gegen die Bestandteile der glomerulären Basalmembran von Mäusen immunisiert. Aufgrund der adaptiven Immunreaktion bilden die Schafe Antikörper gegen das Fremdprotein. Das Serum wird danach entnommen und Mäusen intravenös injiziert.

Die Experimente werden mit oder ohne Präimmunisierung der Mäuse durchgeführt. Bei der Präimmunisierung werden die Mäuse mit 100 μ l eines Gemisches aus Schaf-Immunglobulin G (IgG) und Freund-Adjuvans drei Tage vor der Injektion des Anti-GBM-Serums intrakutan in beide Flanken beimpft. Dafür bereitet man das Schaf-IgG in einer Konzentration von 0,2mg/ml in PBS vor und mischt es im Verhältnis 1:1 mit Complete Freund-Adjuvans. Freund-Adjuvans besteht aus Paraffinöl und einem Emulgator und beinhaltet hitzeinaktivierte Mykobakterien, welche die zellvermittelte Immunreaktion verstärken [138]. Am Tag der Injektion des Anti-GBM-Serums wurden noch einmal 50 μ l des Gemisches injiziert, um im Zuge einer sekundären Immunantwort die Zellantwort nochmals zu steigern („Booster“).

Die Wirkung des Anti-GBM-Serums wird in zwei Phasen aufgeteilt. In der heterologen, akut auftretenden Phase binden die Antikörper an die Basalmembran der Niere und lösen eine lokale Entzündung mit Aktivierung des Komplementsystems und Infiltration von Neutrophilen aus, was am ehesten einer RPGN Typ 1 entspricht [139]. Die gegen die glomeruläre Basalmembran gerichteten Antikörper im Anti-GBM-Serum wirken in unterschiedlichen Dosen in verschiedener Weise. In geringen, subnephrotoxischen Dosen kann die primäre Nierenschädigung nicht gemessen werden, während bei hohen Dosen die heterologe Phase fulminant mit hoher

Proteinurie und Absinken der GFR vorstättengeht. Die sekundäre, autologe Phase, wird ab dem dritten bis siebenten Tag beschrieben und beruht auf der Bildung von eigenen Antikörpern gegen die Fremdproteine, was in einer Immunkomplexbildung in den Kapillaren der Nieren resultiert, wie es bei der RPGN Typ 2 beschrieben ist [140, 141]. Die autologe Phase wird bei Menschen mit einer Immunkomplexnephritis wie bei IgA-Nephritis oder Post-Streptokokken-Glomerulonephritis verglichen und durch die Bildung der Immunglobulin-Antigen-Komplexe kommt es zu einer allmählich steigenden Proteinurie und Absinken der GFR [142].

Nachdem die Anti-GBM-Antikörper gegen die α 3-Kette des Kollagen IV gerichtet sind und dieses auch in anderen Geweben vorkommt, war uns die Schädigung des Lungengewebes bekannt, wurde jedoch nicht untersucht. Pulmonale Symptome sind jedoch bei keinen Versuchstieren aufgefallen.

In den beschriebenen Experimenten wurden Dosen des Anti-GBM-Serums von 50-200 μ l verwendet.

3.4.8 CD4-Zelldepletion durch monoklonalen Antikörper

Die durchgeführten Experimente brachten Ergebnisse, welche einen bedeutsamen Unterschied zwischen den *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen und der Kontrollgruppe zeigten. Um der Möglichkeit nachzugehen, dass etwa die Verringerung der CD4-Zellen dafür verantwortlich war, wurden die *Mdm2^{fl/fl}*-Mäuse einem Experiment unterzogen, wobei bei einer Gruppe die CD4-Zellen durch Antikörper depletiert wurden und bei der anderen nicht.

Hierfür wurde das Protokoll des Nierenschädigungsmodells mit Präimmunisierung durchgeführt, jedoch wurden am Tag vor der Präimmunisierung einer Gruppe 100 μ g eines CD4-Antikörpers subkutan injiziert, während der anderen Gruppe zur Vergleichbarkeit der Intervention ebenfalls 100 μ g eines Isotyp-Antikörper injiziert wurde. Der Isotyp-Antikörper stammt von der gleichen Tierart wie der CD4-Antikörper und besteht aus derselben Immunglobulinklasse, jedoch hat es keine spezifischen Bindungsstellen im Organismus.

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Analyse von Expressionsschemata der Gewebe

Um zu erkennen in welchem Ausmaß Zellen und Gewebe bestimmte Gene und in Folge ein Protein exprimieren, wurde aus den Zellen die Ribonukleinsäure (RNA) gewonnen.

Es gibt verschiedene RNA-Moleküle, welche allesamt wichtige, unterschiedliche Aufgaben in der Zelle wahrnehmen. Darunter finden sich beispielsweise die heterogene nukleäre RNA (hnRNA), welche das direkte RNA-Transskript der DNA darstellt bevor sie unter anderem durch Small Nucleolar RNA (snRNA) gespliced, am 5'-Ende gecappt und am 3'-Ende polyadenyliert wird und zur Messenger-RNA (mRNA) wird. mRNA wird zur Translation in ein Proteinmolekül verwendet und repräsentiert die Proteinausstattung einer Zelle, wobei zu beachten ist, dass vor der endgültigen Translation noch regulierende Moleküle wie Small Interfering RNA (siRNA) eingreifen und mRNA-Moleküle abbauen. Den größten Anteil an der Gesamt-RNA hat mit 90% die ribosomale RNA (rRNA), welche am Translationsvorgang am Ribosom wesentliche Rollen übernimmt, während die Transfer-RNA (tRNA) die Aminosäuren zur Proteinsynthese herbeiholt.

Die mRNA hat zwar nur einen Anteil von 1-5% an der Gesamt-RNA, diese reicht jedoch aus um die Expression von Proteinen abzuschätzen. Zunächst muss die mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, und diese wiederum durch quantitative PCR vervielfältigt und vermessen werden.

3.5.1.1 RNA-Isolation

Die RNA kann aus verschiedenen Organen und Geweben gewonnen werden, wobei im Zuge dieser Arbeit RNA ausschließlich aus der Niere und Milz isoliert wurde. Zur Isolation wurde der PureLink™ RNA Mini Kit der Firma Ambion® verwendet. Der gesamte Arbeitsvorgang muss unter strengen hygienischen Bedingungen und an einer Sicherheitswerkbank mit Abzug geschehen, da RNA sehr instabil ist und durch ubiquitär vorkommende Ribonukleasen abgebaut wird. Zur Desinfektion wurde regelmäßig 70% Ethanol und ein RNase Spray verwendet. Das Organstück wurde mit einer sterilen Einwegpinzette aus der RNAlater®-Lösung geholt und davon ein etwa 2x2mm großes Stück mit einem Skalpell abgeschnitten. Das Stück wurde in eine Lösung aus lysierendem Puffer und 1% β -Mercaptoethanol gelegt, welche die Zellwände löst und so das Innere analysiert werden konnte. β -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken an Proteinen und inaktiviert damit RNasen. Das Organstück wurde mit einem Homogenisator zerkleinert, welcher mit einem Messer die Zertrennung des Gewebes und den Zellaufschluss unterstützte. Die resultierende Flüssigkeit

wurde im Verhältnis 1:1 mit 70% Analyse-Ethanol aufgefüllt und mit einem Vortexmischer eine Minute lang vermischt. 700µl dieser Lösung wurden nun durch eine Filtermembran bei 12000 U/min 30 Sekunden lang zentrifugiert und die abgefilterte Flüssigkeit abgekippt. Mit 700µl Waschpuffer I und danach zweimal mit 500µl Waschpuffer II wurde die Filtermembran gewaschen und das Auffangbehältnis gewechselt. Die Filtermembran wurde 2 Minuten lang bei 12000 U/min getrocknet, danach 35µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und 2 Minuten inkubiert. Nun wurde die sich im Filter befindende RNA gelöst und in zwei Minuten bei erneut 12000 U/min in ein neues 1,5ml-Eppendorf-Gefäß zentrifugiert.

Die Probe wurde unverzüglich auf Eis gelagert und der Erfolg der Extraktion geprüft. Dazu wurde 1µl der Probe mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280nm durchleuchtet und die Konzentration beziehungsweise die Reinheit bestimmt.

Der Quotient aus den Ergebnissen der 260 und 280nm-Messungen sollte etwa 2,0 betragen und ist bei Abweichungen ein Indikator für Verunreinigungen mit DNA oder Proteinen. Die Konzentration der RNA im RNase-freiem Wasser wird bei 260nm über den Absorptionswert bestimmt und ergibt ein Ergebnis mit der Einheit ng/µl.

3.5.1.2 Umschreibung der RNA in cDNA

Der Schlüssel zur Umschreibung des RNA-Materials in cDNA ist die reverse Transkriptase. Sie ist ein Enzym, welches in Retroviren entdeckt wurde und die RNA in DNA umschreibt.

Für die Umschreibung wurden 2050ng RNA verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge der isolierten RNA abpipettiert und mit Wasser auf 13,2µl aufgefüllt. Dann wurde der Mastermix aus 4µl First strand-Puffer 5x, 0,4µl Dideoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) 25mM, 1µl DTT, 0,25µl linear-Acrylamid (15µg/mL), 0,215µl Hexanukleotid-Mix und jeweils 0,5µl der beiden Enzyme RNAsin (Ribonukleaseinhibitor) und Superscript II (Reverse Transkriptase) pro Probe erstellt, was ein Volumen von 6,8µl ergab. Der Mastermix wurde in die RNA-Wasser-Lösung pipettiert. Für die Negativkontrollen wurde der Mastermix ohne die Enzyme zu den Proben gegeben und das fehlende Volumen mit Wasser aufgefüllt. Die Proben wurden nun für 90 Minuten im Heizblock bei 42°C bei konstanter Bewegung inkubiert und zum Stopp der Reaktion für 5 Minuten auf 85°C erhitzt. Sollten die RNA-Proben mit DNA verunreinigt worden sein, hätten sich bei den Negativkontrollen in der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion im Anschluss positive Ergebnisse gezeigt.

3.5.1.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion wurde bereits oben beschrieben. Bei der quantitativen Echtzeit-PCR, auf Englisch Quantitative Realtime Polymerase Chainreaction (rt-qPCR) genannt, erfolgt der Vorgang in einer vollautomatischen Maschine, die die Menge der amplifizierten cDNA quantifizieren kann. Somit ist eine Aussage über die Expression bestimmter Gene möglich. Beispielsweise können Schädigungsmarker der Niere wie Kidney Injury Molecule-1 (*Kim-1*) oder Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin (*Ngal*) gemessen werden und Rückschlüsse auf das Ausmaß der Schädigung gezogen werden. Dafür wird zunächst der DNA-Doppelstrang bei 96°C denaturiert, damit sich bei einer Temperatur von 60°C die Primer an die komplementären Einzelstränge anlagern können, und bei 72°C ist die optimale Temperatur für die DNA-Polymerase erreicht, um mit den hinzugefügten Nukleotiden einen neuen Strang zu synthetisieren.

Im ersten Schritt musste der Mastermix vorbereitet werden. Für jedes Gen musste ein eigener Mastermix angefertigt werden, der aus 0,16µl Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*-Polymerase, hitzestabil), 6,64µl DEPC-Wasser, 0,6µl Forward Primer (1:10), 0,6µl Reverse Primer (1:10) und 10µl des fluoreszierenden Farbstoffes Sybr Green bestand, der doppelsträngige DNA bindet, dann blaues Licht absorbiert und grünes Licht emittiert. Zu dem Mastermix wurde 2µl der cDNA-Probe hinzugefügt. Für die Pipettierung von qPCR-Proben wurden eigene qPCR-96-Loch-Mikrotiterplatten verwendet. Damit sichergestellt war, dass die Lösungen nicht an der Wand der Löcher haften, wurde die Platte für etwa 20 Sekunden zentrifugiert. Danach konnte die Platte für etwa 90 Minuten in die rt-qPCR Maschine gelegt werden, die selbstständig die Temperaturzyklen sowie die Analysen durchführte.

Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz des Farbstoffes gemessen, wobei der Anstieg der Werte erst nach einer gewissen Anzahl an Zyklen messbar war (sog. Ct-Wert, Cycle Threshold). Der Cp-Wert (Crossing Point) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Somit konnte bei früh ansteigenden Werten davon ausgegangen werden, dass mehr mRNA des gesuchten Proteins in der ursprünglichen Probe vorhanden war als bei später ansteigenden Werten. Als Referenz wurden standardmäßig 18s-Primer verwendet, da 18s in allen Zellen exprimiert wird. Es wurden zwei Negativkontrollen durchgeführt. Für jeden Primer wurde ein Nöpfchen verwendet, in dem der Mastermix hinzukam, statt cDNA jedoch Wasser hinzugefügt wurde. Bei den RT-Proben (Negativproben der cDNA) sollte bestätigt werden, dass es während der RNA-Extraktion zu keiner Verunreinigung mit DNA gekommen ist.

3.5.2 Kreatininmessung

Kreatinin ist ein Stoffwechselprodukt des Körpers und wird aus Kreatin erzeugt. Als harnpflichtige Substanz muss es über die Niere ausgeschieden werden, wobei es größtenteils glomerulär filtriert und zu einem kleinen Teil auch tubulär aktiv sezerniert wird. Kreatininwerte unterscheiden sich individuell, hauptsächlich abhängig von Alter, Geschlecht und Muskelmasse. Die Bestimmung des Kreatininspiegels wird labormedizinisch verwendet, um die Nierenfunktion abzuschätzen, wobei hohe Serumkreatininspiegel auf eine verminderte Ausscheidung und damit auf eine verminderte Funktion der Nieren hinweisen. Im klinischen Alltag wird zusätzlich die GFR mittels der Cockcroft-Gault-Formel errechnet und in der Zusammenschau aus Urin- und Serumwerten die Creatinin-Clearance bestimmt. Des Weiteren wird Kreatinin im Urin bestimmt, um das Albumin-Kreatinin-Verhältnis auszurechnen. Dies ist notwendig, da sich mit erhöhter Harnproduktion die Stoffe verdünnen und umgekehrt. Da sich beide Stoffe in gleichem Maße verdünnen, hat sich dieser Wert als verlässlicher Parameter der Albuminurie etabliert.

Für die Messungen im Zuge der Experimente wurde ein Analysekit verwendet, mit der nach der Jaffé-Methode die Konzentration photometrisch bestimmt werden konnte. Hierbei bildet Pikrinsäure in alkalischer Lösung mit Kreatinin einen Komplex, was zu einer orange-gelblichen Färbung führt.

Es wurden 10µl Serum oder 10µl 1: 10 mit Wasser verdünnter Urin als Proben verwendet und in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte in Duplikaten pipettiert. Zusätzlich wurden bekannte Konzentrationen Kreatinin von 0-5mg/dL aus einer Standardlösung des Kits als Referenzwerte in die Nüpfchen gefüllt. Reagenz 1 und Reagenz 2 wurden im Verhältnis 4: 1 gemischt und mit einer Mehrkanalpipette möglichst rasch 200µl des Reagenzgemisches zu den Proben hinzugefügt.

Die Messung erfolgte an einem Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge von 492nm.

Bei einer Serumkreatininmessung erfolgten zwei Messungen, die erste nach dem Hinzufügen des Reagenzgemisches und die zweite nach 180 Sekunden. Zur Analyse wurden die Extinktionsswerte der ersten Messung von denen der zweiten Messung subtrahiert, und mit den bekannten Referenzkonzentrationen errechnet.

Bei einer Urinkreatininmessung wurde nach Hinzufügen des Reagenzgemisches 20 Minuten gewartet und dann die Messung durchgeführt. Die Errechnung erfolgte ebenfalls über die Referenzkonzentrationen und Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor.

3.5.3 Messung der Serumkonzentration von Harnstoff-Stickstoff

Die Blut-Harnstoff-Stickstoff-Messung, auf Englisch Blood Urea Nitrogen (BUN), ist die Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Blutserum. Harnstoff ist ein Stoffwechselprodukt und entsteht im Harnstoffzyklus aus dem Abbau von stickstoffhaltigen Verbindungen. Es wird als ungiftiger Stoff gebildet um einer schädlichen Erhöhung der Ammoniakkonzentration vorzubeugen. Als harnpflichtige Substanz wird Harnstoff renal eliminiert und wird bei eingeschränkter Nierenfunktion als Laborparameter eingesetzt.

Aus den gewonnenen Serumproben wird ein enzymatischer Test mit einem Analysekit durchgeführt. Dabei werden die beiden Enzyme Urease und Glutamatdehydrogenase benutzt, um am Ende die zu Harnstoff äquivalente Menge an NAD⁺ mit dem Mikroplattenleser zu detektieren. Zunächst wurden Reagenz 1 und Reagenz 2 des Messungskonvoluts im Verhältnis von 4:1 zusammengemischt und während des Pipettierens auf Zimmertemperatur gebracht. 2µl des Serums wurden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und 200µl des Reagenzgemisches hinzugefügt. Nach 60 Sekunden wurde die erste Messung bei 360nm Wellenlänge durchgeführt, gefolgt von einer zweiten Messung nach 60 Sekunden. Die Analyse erfolgte in der gleichen Art und Weise wie bei der Bestimmung der Kreatininkonzentration mittels Referenzkonzentrationen und der Differenz der Extinktionswerte. Das Ergebnis ergab die Harnstoffkonzentration, wobei Harnstoff eine molare Masse von 60,06g besitzt. Um nun auf die Stickstoffkonzentration zu kommen, wird die Harnstoffkonzentration mit 0,467 multipliziert, da Harnstoff zwei Stickstoffatome mit der molaren Masse von 28,01g in seiner Struktur aufweist.

3.5.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein immunologischer Test zur quantitativen Bestimmung von vielen möglichen Verbindungen. Darunter fallen Proteine, Hormone, aber auch niedermolekulare Teilchen, die von Antikörpern gebunden werden können. In der Laborpraxis werden verschiedene Arten des ELISA-Tests durchgeführt. Dazu gehörten direkte, indirekte, kompetitive ELISA und der Sandwich ELISA. Im Zuge der Experimente wurden beispielsweise die Konzentrationen von Albumin im Urin und von IFN- γ in Serum und Zellkulturmedien nach der Sandwich-Methode bestimmt.

Beim Sandwich-ELISA werden 96-Loch-Mikrotiterplatten mit einer speziellen Bodenbeschichtung in den Löchern verwendet. Auf dieser Beschichtung kann ein Antikörper binden, der wiederum ein Epitop des gesuchten Moleküls binden kann. Nun wird ein weiterer Antikörper hinzugefügt, welcher an das gesuchte Protein anknüpft und mit Horseradish-Peroxidase (HRP) konjugiert ist, einem Enzym, welches Tetramethylbenzidin (TMB) oxidiert. TMB ist ein lichtempfindlicher Stoff,

welcher bei Oxidation blau erscheint und damit abhängig von der Menge an HRP einen mehr oder weniger intensiven Farbumschlag ergibt. Um die Reaktion zu stoppen wird Schwefelsäure eingesetzt, welche die Lösung schlagartig gelb färbt (s. Abbildung 11). Die Platte wird im Mikroplattenleser durch Messung der Extinktionswerte analysiert.

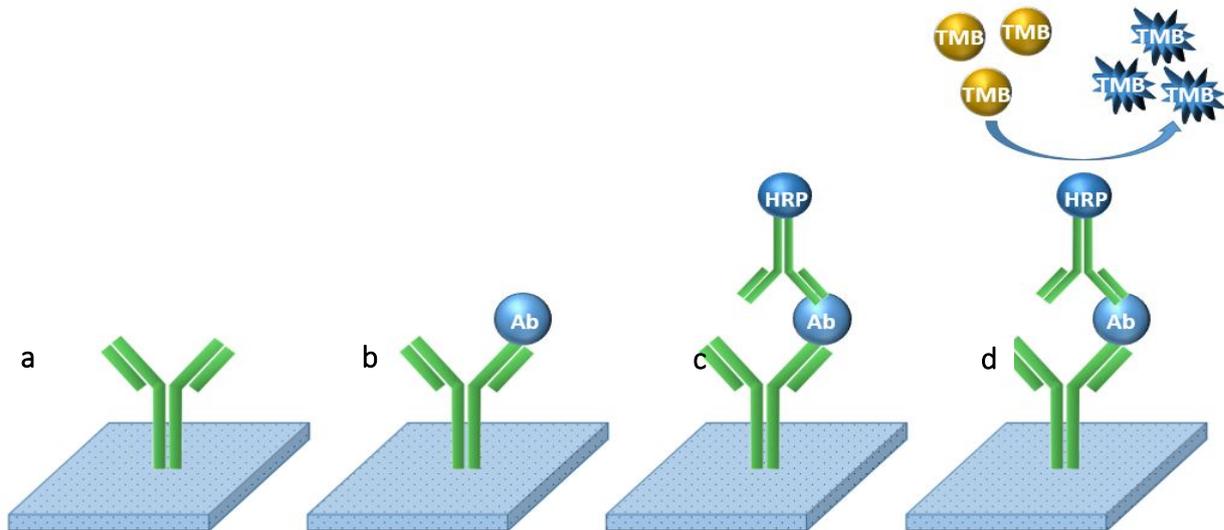


Abbildung 11: Das Prinzip des Sandwich-ELISA. Zunächst wird die Platte mit einem Antikörper beschichtet (a). Nun folgt das Hinzufügen der Proben, in diesem Fall Albumin (Ab) (b). Ein weiterer Antikörper, an den HRP konjugiert ist, bindet an Ab und kann die Farbreaktion von TMB katalysieren (c und d). Schwefelsäure stoppt die Reaktion und färbt TMB in eine gelbe Farbe um.

3.5.4.1 Albumin ELISA

Albumin ist ein von der Leber gebildetes Protein, welches in der gesunden Niere kaum in den Primärharn gelangt. Bei einer Schädigung der Glomeruli kann die Filtrationsbarriere das Protein nicht zurückhalten und es gelangt vermehrt in den Urin, wo es quantifiziert werden kann.

Im ersten Schritt musste man die Platte mit dem Antikörper beschichten. Hierzu wurde ein Beschichtungspuffer (Coating Buffer) mit einem pH-Wert von 9,6 verwendet und mit dem Beschichtungsantikörper im Verhältnis 1:100.000 vermischt. Davon kamen 100µl in jedes Nöpfchen. Nun inkubierte man die Platte eine Stunde bei Raumtemperatur und wusch die Nöpfchen aus. Dazu wurde jedes Loch 5 Mal mit einem Waschpuffer (Washing Buffer) gespült, um den Boden von nicht gebundenen Antikörpern zu reinigen. Im Anschluss wurden 200µl eines Blockierpuffers in die Vertiefungen pipettiert, damit sich weitere Antikörper nicht an unbesetzte Stellen des Bodens binden können und unspezifisch bindende Antikörper ebenfalls abgebunden werden. In dieser Pufferlösung befand sich Rinderalbumin, welches nicht von den für Maus-

Albumin spezifischen Beschichtungsantikörpern gebunden werden konnte. Nach einer Inkubation von 30 Minuten wurde die Platte erneut gewaschen und in Duplikaten mit 100µl der Proben gefüllt. Die Proben kamen in verdünnter Weise in die Platte, da sonst die hohen Konzentrationen wegen des Lambert-Beer-Gesetzes sowie aufgrund von enzymkinetischen Grundlagen nicht mehr verlässlich analysiert werden können. Urinproben mussten deswegen je nach Konzentration des Albumins 1:10.000 bis 1:1.000.000 verdünnt werden. Zusätzlich wurde eine Referenzlösung mit bekannten Albuminkonzentrationen als Standard in einem Bereich von 0 bis 500mg/dl in die Löcher gegeben, um später die Extinktionswerte exakt berechnen zu können. Es wurde wieder bei Raumtemperatur 60 Minuten gewartet und die Platte abermals gewaschen. Nun wurden 100µl des Anti-Mausalbumin-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:30.000 pipettiert, der mit dem HRP verbunden war. Nach einer erneuten Wartezeit von 60 Minuten wurde wieder gewaschen und 100µl der Farbstoffreagenzien in die Vertiefungen gefüllt, was die Farbstoffreaktion in Gang brachte. Schließlich wurde mit 100µl der Schwefelsäure die Reaktion gestoppt, wenn die gewünschte Farbintensität erreicht war. Die Analyse der Farbintensität erfolgte mit dem Mikroplattenleser. Die Messungen von Serum IgG und IgM wurden mit demselben ELISA-Protokoll durchgeführt.

3.5.4.2 IFN- γ -ELISA

IFN- γ ist ein Zytokin, welches im Zuge der adaptiven Immunantwort von CD4- und CD8-positiven T-Zellen sowie NK-Zellen gebildet wird. Im Zuge der Experimente wurde die Aktivierung von T-Zellen in Splenozytenzellkulturen durch die Ermittlung der Konzentration im Zellkulturmedium und Blutserum gemessen.

Zunächst füllte man 100µl einer Lösung mit Capture Antibody in jedes Loch der 96-Well Maxisorp-Platte. Der Antikörper befand sich im Verhältnis von 1: 250 im Coating-Puffer, welcher aus 7,13g NaHCO₃ und 1,59g Na₂CO₃ pro Liter Wasser bestand. Die Platte wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur oder 10 Stunden bei 4°C inkubiert, bevor die Platte mit Washing Solution dreimal im ELISA-Washer gespült wurde. Die Washing Solution bestand aus PBS mit 0,05% Tween 20. Danach wurden 200µl der Blocking Solution in jedes Well pipettiert, um die nicht besetzten Stellen am Boden der Platte zu binden. Erneut wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal gespült. Dann wurden 100µl der Proben in die vorgesehenen Löcher gefüllt und der Standard, welcher bei -80°C gelagert wird, pipettiert. Diesmal wurde zwei Stunden gewartet, gefolgt von dreimaligem Waschen. Nun wurden der Detection Antibody und das HRP im Verhältnis 1:250 mit Diluting Solution (= Blocking Solution) gemischt und 100µl in jedes Loch pipettiert und

im Anschluss eine Stunde gewartet und dreimal gewaschen. Dann ist man beim Schritt angekommen, den TMB-Farbstoff zum Einsatz zu bringen und 100µl pro Loch zu pipettieren. Es mussten etwa 30 Minuten im Dunklen abgewartet werden, bis die Reaktion gleichermaßen wie beim Albumin-ELISA mit Schwefelsäure gestoppt wurde und die Platte im Reader analysiert werden konnte. Die ELISA für IL-6 und IL-10 wurden mit derselben Methode durchgeführt.

3.5.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem Zellen nach Phänotyp, Größe, Granularität und Zellzahl charakterisiert werden. Zunächst werden die Zellen durch einen engen Mikrokanal gesaugt, sodass die Zellen vereinzelt werden. Die Zellen werden von Laserstrahlen verschiedener Wellenlängen angestrahlt und die Emissionswerte mittels eines Detektors beurteilt. Die Beurteilung des Vorwärtsstreulichts (Forward Scatter) ergibt die Größe der Zelle, wobei ein größerer Durchmesser des Streulichts gleichzeitig eine größere Zelle bedeutet. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter) ermöglicht die Beurteilung der Granula und Oberflächen der Zellen und somit die Art der Zellen. Je mehr Licht seitwärts reflektiert wird, desto rauer ist die Oberfläche und desto mehr Granula befinden sich in der Zelle. Zusätzlich kann man durch Fluoreszenzmessungen verschiedene Oberflächenmarker oder intrazelluläre Proteine detektieren. Dazu werden die Zellen zuvor mit Antikörpern gefärbt, welche an fluoreszierende Farbstoffe konjugiert sind [143]. Dabei können je nach Art des Zytometrierätes mehr als 20 verschiedene Farben und damit Proteine detektiert werden (s. Abbildung 12).

Das Ergebnis kann man als Histogramm (Einzelparameterdarstellung) oder als Dot Plot (Zweiparameterdarstellung) analysieren. Beim Histogramm sieht man die Anzahl der Zellen auf der y-Achse gegen die Intensität der Messungen auf der x-Achse aufgetragen. Beim Dot Plot findet man jede Zelle als Punkt auf der Grafik, wobei beide Achsen die Intensitäten von zwei unterschiedlichen Farbstoffen wiedergeben (s. Abbildung 13).

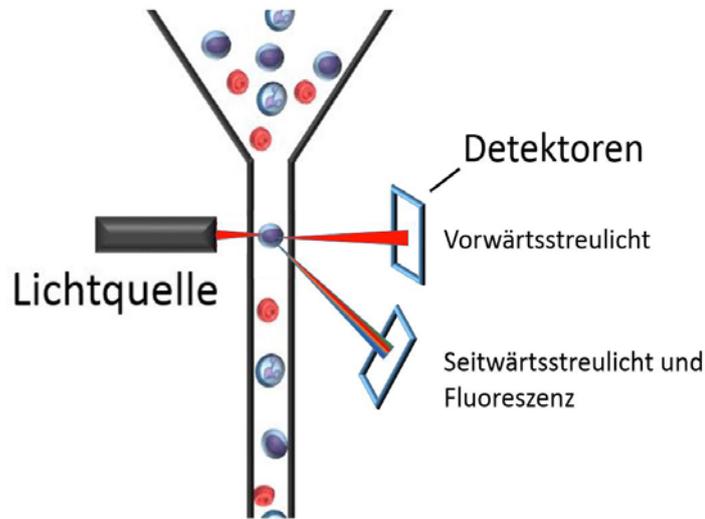


Abbildung 12: Die Funktionsweise der Durchflusszytometrie. Die Zellsuspension wird eingesaugt und in den Mikrokanal geleitet, um die Zellen zu vereinzeln. Der Laserstrahl wird durch die Form und das Volumen beeinflusst, wodurch Informationen über Größe und Granularität der Zelle gewonnen werden. Durch die fluoreszierenden Farbstoffe, welche an Proteine konjugiert sind, kann man Zelltypen und -eigenschaften genau quantifizieren.

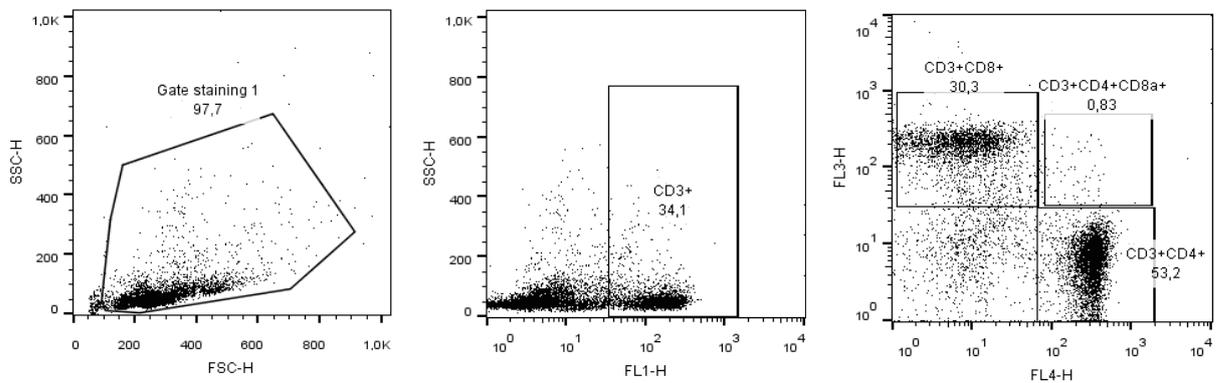


Abbildung 13: Die Gating-Strategie für Zytometrieanalysen in der Zweiparameterdarstellung. Zunächst wurden im Forward- und Side Scatter-Modus die erfassten Zellen sortiert und von den toten Zellen und von denen mit extremen Abweichungen getrennt. Aus diesen Zellen wurden FL1-negative Zellen exkludiert und aus der Population der FL1-positiven die Subpopulationen gerahmt. So wurden die Zellzahlen für die jeweiligen Populationen bestimmt.

Im Zuge der Experimente wurde die Durchflusszytometrie genutzt, um Zellkulturen von Splenozyten nach ihren Eigenschaften zu analysieren. Hierzu wurden verschiedenste Antikörper zur Identifikation von Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, T-Zellen, B-Zellen, Stammzellen und weiteren Zellen genutzt (s. Tabelle 2: Die Fluorophor-konjugierten Antikörper für die Durchflusszytometrie; S. 36).

Für jede Probe füllte man jeweils drei FACS-Röhrchen mit $1-2 \times 10^6$ Zellen an, ein Röhrchen für die mit Antikörper konjugierten Zellen, ein Röhrchen für die Counting Beads und ein Röhrchen für unmarkierte Zellen.

Im ersten Schritt mussten die Zellen mit den farbstoffkonjugierten Antikörpern beschichtet werden. 90µl der Zellsuspension wurden zu 110µl FACS-Puffer (Puffer aus PBS, 2% FBS, 0,05% Natriumazid und 2mM EDTA) addiert, 1µl Fc-Blocker hinzugefügt und 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurde ein Mastermix aus 1,4µl eines jeden Antikörpers pro Probe vorbereitet und zu den Zellen pipettiert. Nach 25 Minuten bei 4°C addierte man 500µl FACS-Puffer, zentrifugierte 5 Minuten bei 1200U/min, der Überstand wurde dekantiert und in 200µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden bei 4°C bis zur Durchführung der FACS in den FACS-Röhrchen gelagert.

Für die Zählung wurden die Zellen des zweiten Röhrchens auf 100µl mit FACS-Puffer aufgefüllt und vor der Messung weitere 100µl Counting Beads hinzugefügt. Das dritte Röhrchen wurde auf 200µl mit FACS-Puffer aufgefüllt und unbehandelt gelassen.

Zur Kalibrierung des FACS-Gerätes musste man noch Einzelfärbungen der Zellen machen, wobei verschiedene Proben gemixt wurden um ein großes Spektrum der Zellen zu erhalten.

3.6 Methoden der Zellkultur

3.6.1 Isolation von Splenozyten

Um Informationen über immunologische Zellaktivitäten und Zellverteilungen zu erhalten und Experimente *in vitro* mit peripheren Zellen des Immunsystems durchführen zu können, wurden Zellen aus der Milz isoliert. Die Milz beherbergt als sekundäres lymphatisches Organ alle verschiedenen weißen Blutkörperchen, welche man Splenozyten nennt.

Die tote Maus wurde auf einer Unterlage fixiert und der Bauchbereich desinfiziert. Nach der medianen Laparotomie wurde mit einem sterilen Besteck die Milz entnommen und durch einen 70µm Filter in ein 50ml Falcongefäß gepresst und währenddessen mit etwa 15ml MACS-Puffer gespült. MACS-Puffer bestand aus PBS mit 2mM EDTA, 0,5% BSA (Rinderalbumin) bei einem pH-Wert von 7,2. Im Anschluss wurde bei 1500U/min für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Im nächsten Schritt mussten die Erythrozyten aus dem entstandenen Zellpellet lysiert werden. Die Flüssigkeit im Falcongefäß wurde abgekippt und mit 5ml Trisammoniumchlorid resuspendiert und bei 37°C für exakt 5 Minuten inkubiert. Trisammoniumchlorid nutzt die Eigenschaften der Erythrozyten aus um diese osmotisch zur Hämolyse zu bringen, während die restlichen Zellen

davon weder aktiviert noch zerstört werden. Die Lyse wurde durch Zugabe von 20ml MACS-Puffer unterbrochen und die zellreiche Flüssigkeit erneut durch einen 70µm Filter in ein weiteres Gefäß gebracht. Nun musste man für 10 Minuten bei 1500U/min zentrifugieren, die Flüssigkeit abkippen und mit 500µl DMEM resuspendieren. Dem DMEM-Nährmedium wurde 5% FCS, L-Glutamin und 5% der Antibiotikumkombination Penicillin/ Streptomycin hinzugefügt.

3.6.2 T-Zell-Aktivierung

Im Zuge der Experimente wurde eine Aktivierung von T-Zellen (T-Cell Activation Assay) durchgeführt, um die Eigenschaften von immunoreaktiven aktivierten Zellen zu analysieren. Dazu wurden die isolierten Splenozyten ausgezählt und 3×10^6 Zellen pro Loch einer 24-Loch Zellkulturplatte oder 1×10^6 Zellen pro Loch einer 96-Loch Zellkulturplatte in der vorher genannten DMEM-Nährlösung angelegt. Nun wurden 20µg/ml Schaf-IgG zu den Zellen hinzugefügt, wobei für die Negativkontrollen steriles PBS verwendet wurde. Die Zellen wurden für 72 Stunden inkubiert und für die FACS-Untersuchung vorbereitet. Ob die Aktivierung der T-Zellen erfolgreich war, wurde durch IFN-γ-ELISA im Vergleich mit einer Negativprobe überprüft.

3.6.3 Trypsinisierung von Zellen

Sobald sich die isolierten Zellen dermaßen vermehrt haben, dass die Zellkulturplatte keine Fläche zur weiteren Ausbreitung mehr bietet, spricht man von Konfluenz. Dabei hören die Zellen aufgrund von Kontakthemmung auf, sich weiter zu teilen und gehen in einen inaktiven Zustand über. Um das zu verhindern, mussten die Zellen kurz davor umgesetzt („gesplittet“) werden. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium mit einer Vakuumpumpe oder einer Pipette abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit einer Mischung aus Trypsin und EDTA von der Oberfläche gelöst. Trypsin ist eine Endopeptidase, welche die Proteine abbaut die die Zellen an der Platte anheften, während EDTA Calcium als Trypsininhibitor bindet. Für eine 10cm Zellkulturplatte wurden 2ml Trypsin, für eine 15cm Zellkulturplatte 5ml Trypsin verwendet. Nun wurde die Platte für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ablösung der Zellen von der Platte wurde im Mikroskop verifiziert und die Suspension mit 8ml beziehungsweise 20ml Zellkulturmedium aufgefüllt. Nun wurde die Anzahl der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen neu inkubiert oder bei -80°C eingefroren.

3.7 Histologische Methoden

Zur Beurteilung des Parenchyms wurden Organproben zur histologischen Beurteilung unter dem Mikroskop genommen. Dadurch konnte das Ausmaß einer Schädigung, Entzündung oder sonstigen Veränderung des Gewebes durch Einsatz von verschiedenen Färbungen analysiert und quantifiziert werden.

Bei Nieren- und Milzproben wurden jeweils die Mittelstücke ausgeschnitten, in beschriftete Histologiekassetten gelegt und zunächst 24 Stunden in 4% Formalinlösung eingelegt. Das Formalin denaturiert Proteine und verhindert somit die enzymatische Autolyse der Gewebe. Danach wurde die Probe zur Entwässerung in 70% Ethanol aufbewahrt und in Paraffin eingebettet. Aus den entstehenden Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom etwa 4µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger gelegt. Die Deparaffinisierung erfolgte mit Xylol und anschließendem Auswaschen des Schnittes mit zunächst 95% Ethanol, danach mit 79% Ethanol und schließlich in destilliertem Wasser.

3.7.1 Perjodsäure Schiff Färbung

Die Perjodsäure Schiff Färbung ist eine Standardfärbung zur Beurteilung des Nierengewebes hinsichtlich struktureller Veränderungen. Im Anschluss an die Deparaffinisierung wurde der Schnitt für 5 Minuten in eine Lösung aus 200ml destilliertem Wasser und 4g Perjodsäure, danach für 5 Minuten in destilliertes Wasser gelegt. Daraufhin wurde der Objektträger für 20 Minuten in Schiff-Lösung eingelegt, gefolgt von Auswaschen für 7 Minuten in warmem Leitungswasser. Danach wurde für 2 Minuten in Hämatoxylinlösung eingewirkt und für 5 Minuten in Leitungswasser und einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung ausgewaschen.

3.7.2 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen machen die spezifische farbliche Hervorhebung von Proteinen und anderen Molekülen in einem histologischen Schnitt möglich. Dazu wurde nach der Deparaffinisierung der Objektträger in PBS geschwenkt und mit einer Lösung aus 20ml H₂O₂ (30%) und 180ml Methanol für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Das diente der Blockierung von endogenen Peroxidasen welche noch im Gewebe vorhanden sind. Danach wurde wieder kurz in PBS geschwenkt und das gesuchte Antigen demaskiert, was in einer kochenden Lösung von 300ml destilliertem Wasser und 3ml Antigen Unmasking Solution geschah. Die Siedetemperatur wurde entweder im Autoklaven oder in der Mikrowelle erreicht, wonach abgekühlt und in PBS gelegt wurde. Im Anschluss wurde ein Tropfen Avidin für 15 Minuten eingewirkt, die Probe kurz in PBS

gewaschen und ein Tropfen Biotin auf den Schnitt aufgetragen. Durch diesen Vorgang wurde das endogene Biotin blockiert. Für die Vermeidung von nichtspezifischen Bindungen wurde die Gewebeprobe entweder in Superblock oder Ziegen Serum für 10 Minuten eingelegt. Danach wurden die primären Antikörper, welche an das gesuchte Molekül binden, eingesetzt und in der jeweiligen Lösung für 1 Stunde inkubiert, danach in PBS geschwenkt. Im Zuge der Experimente wurden Anti-Schaf-IgG sowie Anti-Maus-IgG verwendet. Danach wurde ein biotinisierter sekundärer Antikörper im Verhältnis 1:300 mit PBS vermengt und der Objektträger für 30 Minuten eingetaucht. Es wurde erneut in PBS geschwenkt, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation in ABC-Lösung aus 15µl Reagenz A, 15µl Reagenz B und 1ml PBS. In PBS und TRIS-Hydrochlorid wurde der Schnitt für jeweils 5 Minuten gewaschen. Danach wurde die Probe für 10 Minuten in DAB-Lösung und Nickelchlorid getaucht, wobei die Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Nun wurde mit Methylgrün gegengefärbt, durch eine aufsteigende Alkoholreihe entfärbt und in Xylol eingelegt. Zuletzt wurde zur Preservation ein Tropfen VectaMount auf den Gewebeschnitt aufgetragen und das Präparat mit einem Deckgläschen bedeckt.

3.7.3 Immunfluoreszenz

Für die Zählung von einzelnen Zellen in Glomeruli wurden Schnitte der Niere mit Antikörpern und fluoreszierenden Substanzen versehen, die unter UV-Licht in verschiedenen Farben sichtbar gemacht werden können.

Dafür wurden die histologischen Schnitte wie oben beschrieben entparaffiniert, rehydriert und zweimal für 7 Minuten mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte in eine Mischung aus 3ml Antigen-Unmasking-Solution und 300ml Wasser gegeben, um die Zugänglichkeit der Antigene zu verbessern. Dies wurde in der Mikrowelle 4-mal für 2,5 Minuten erhitzt und zweimal für 7 Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurde für 15 Minuten Avidin aufgetragen, danach erneut gewaschen und 15 Minuten mit Biotin inkubiert. Die Schnitte mussten wieder zweimal 7 Minuten mit PBS gespült werden.

Nun folgte das Auftragen der 1:25 bis 1:200 in PBS verdünnten Antikörper. Auf jede Gewebeprobe wurden jeweils 50- 100µl der Antikörper-PBS-Lösung aufgebracht, jeweils etwa 60 Minuten inkubiert und danach wieder 7 Minuten mit PBS gespült. Die verwendeten Antikörper waren Wt-1, welches Zellkerne von Podozyten markiert, To-Pro 3, welches alle Zellkerne markiert sowie Nephritin-Antikörper, welche Nephritin in den Füßchenfortsätzen der Podozyten in der glomerulären Filtrationsbarriere anfärben.

Zur Preservation wurde ein Tropfen VectaMount verwendet und ein Deckglas aufgebracht.

3.8 Statistische Methoden

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (Standard Error of the Mean, SEM) angegeben, wobei die Standardfehler als Balken auf den Graphen erkennbar sind. Die Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test berechnet, da normalverteilte Daten mit gleichen Varianzen angenommen wurden. p-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet und wurden in den Graphen mit einem * versehen. Zwei Sterne repräsentieren einen p-Wert unter 0,01, drei Sterne unter 0,001. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit ns beschriftet. Die Gruppengröße wurde aufgrund von Vorergebnissen berechnet. Es wurde bei einem angenommenen Unterschied von 1,5 Standardabweichungen zum Mittelwert des primären Endpunktes der Albuminurie die Gruppengröße von 8-10 Versuchstieren bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Genmodifikation resultiert in partieller CD4-Zelldepletion

Die *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse haben genotypisch einen spezifischen Knockout von *Mdm2* in CD4-Zellen mit ausreichender *Cre*-Expression. Um die Auswirkungen dieses Knockouts im Hinblick auf die zelluläre Ausstattung zu ermitteln, wurden mehrere Durchflusszytometrien mit Splenozyten durchgeführt, die aus naiven experimentellen Mäusen (*Cd4CreMdm2^{fl/fl}*) isoliert wurden und mit denen aus Kontrollmäusen (*Mdm2^{fl/fl}*) verglichen wurden.

CD3+CD4+-Zellen waren bei den Knockoutmäusen auf 8,3% bis 12% der Vergleichswerte vermindert. Nachdem die Entwicklung von T-Zellen im Thymus über den Zustand von doppelt positiven CD4+CD8+-Zellen verläuft, konnte man auch eine signifikante Verringerung der CD8+-Zellen um 57,3% beobachten. Überraschenderweise konnte man eine Vermehrung von CD5+CD19+-B-Zellen um 49,5% im Vergleich mit der Anzahl in Kontrollmäusen feststellen. CD11b+- und CD11c+-Zellen waren um etwa 37,1% bzw. 33,9% mehr vorhanden. Ly6Ghigh+CD11b+-Zellen sind mehrheitlich neutrophile Granulozyten, welche nicht signifikant um 27,1% erhöht festgestellt wurden. Ly6G+F4/80+-Makrophagen waren um 78,3% des Vergleichswerts ebenfalls oberhalb des Niveaus der Kontrollgruppe. Ein Auszug der Ergebnisse kann in Abbildung 14 (S. 62) betrachtet werden.

Wie erwartet kam es durch den *Mdm2*-Knockout zu einer Depletion der Population der CD4-Zellen. Es ist erstaunlich, wie stark diese Depletion erfolgte und welchen Einfluss diese Modifikation auf andere Zellpopulationen wie die B-Zellen hat. Aus diesen Resultaten wurde geschlossen, dass mit der Zellzahlverminderung und mit der *Mdm2*-Defizienz einhergehenden Verringerung von NF-κB eine verminderte Immunantwort erfolgt.

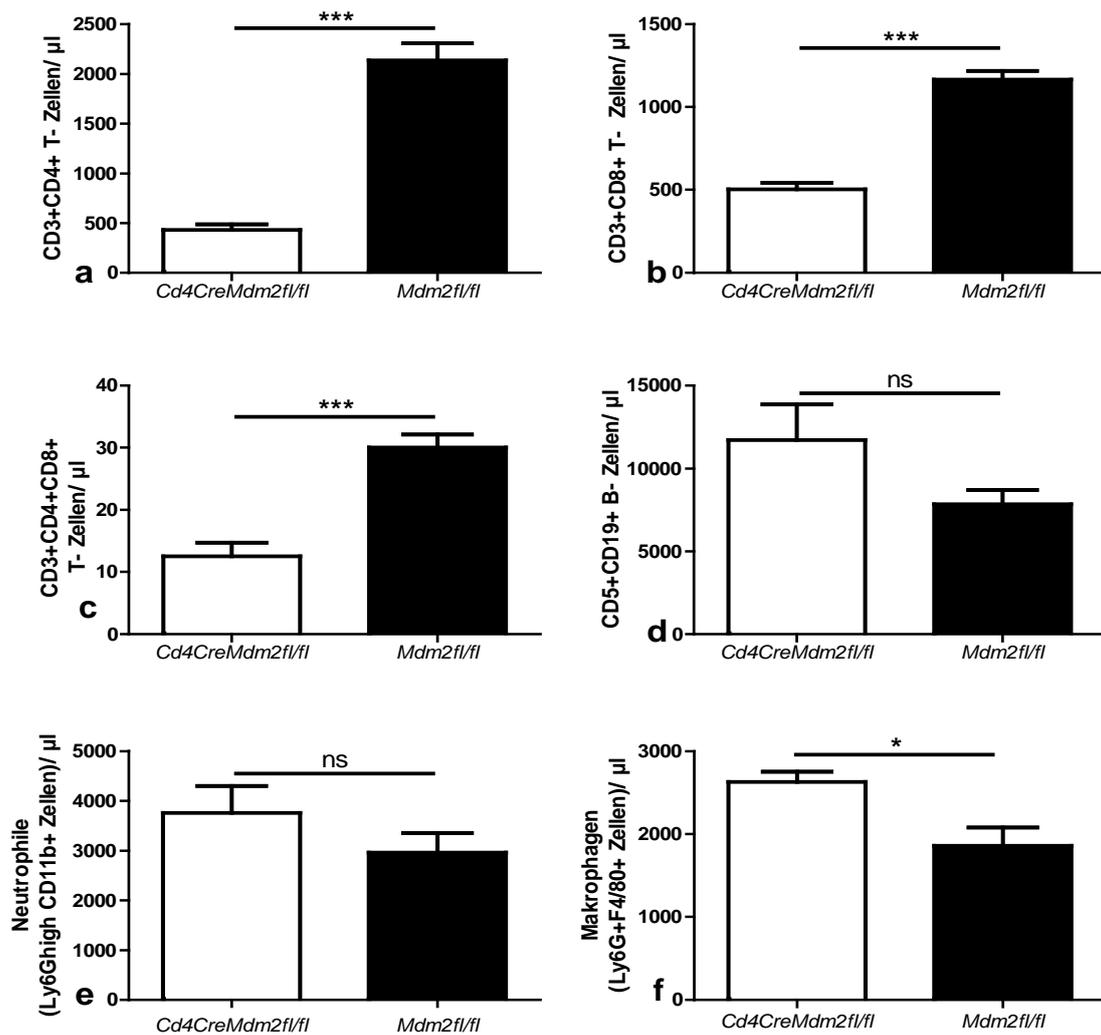


Abbildung 14: Ergebnisse der Durchflusszytometrie von naiven Splenozyten. Die Analyse der Zellverteilungen der experimentellen Mäuse im Vergleich mit den *Mdm2^{fl/fl}*-Mäusen wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Einen signifikanten Unterschied stellte man bei der Allgemeinpopulation an T-Lymphozyten (CD3+), bei CD3+CD4+-Zellen, CD4+CD8+-doppelpositiven Zellen und bei Makrophagen fest. ns=nicht signifikant. Daten dargestellt als Mittelwert der Zellanzahl pro µl und ml ± SEM; *p<0.05; ***p<0,001; p-Wert errechnet durch t-Test, n=15 pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 3.

4.2 Die Anti-GBM-Immunglobuline binden spezifisch an der Basalmembran

Das Anti-GBM-Serum, welches zur Induktion der glomerulären Schädigung eingesetzt wurde, wurde in immunisierten Schafen hergestellt. Um die Affinität der enthaltenen Anti-Basalmembran-Antikörper zu testen, wurden immunhistologische Färbungen von Schaf-IgG angefertigt. Den Mäusen wurde 150µl Anti-GBM Serum retroorbital *i.v.* injiziert und die Gewebeprobe 28 Stunden nach der Injektion entnommen. Sowohl in den experimentellen Mäusen als auch in der Kontrollgruppe wurde eine gleichwertige Bindung an die Basalmembran festgestellt. Neben der Färbung der Glomeruli konnte eine Färbung des interstitiellen

Bindegewebes erkannt werden. Zusätzlich sieht man eine Färbung des apikalen Zytosols von Tubulusepithelzellen, was jedoch wahrscheinlich auf die tubuläre Reabsorption nach erhöhter Durchlässigkeit der Filtrationsbarriere durch schwere glomeruläre Schädigung zurückzuführen ist (s. Abbildung 15).

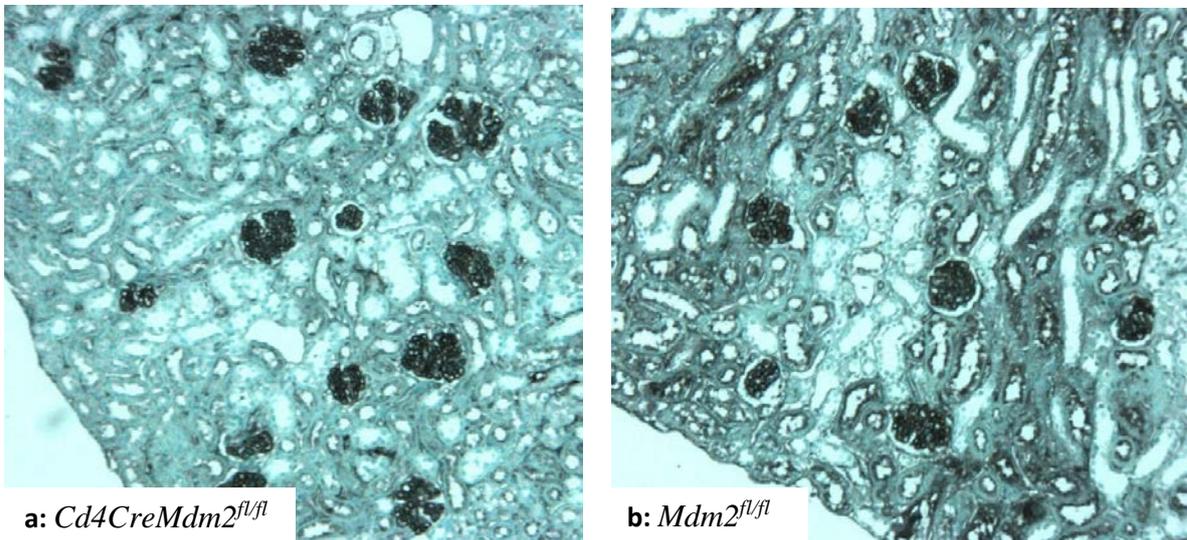


Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von Schaf-IgG 28 Stunden nach Injektion von 150µl Anti-GBM-Serum. Man erkennt die spezifisch gefärbten Glomeruli und interstitielle Färbung des Nierengewebes in beiden Gewebeschnitten. Vergrößerung: 10x.

Die Farbbeschaffenheit der immunhistologischen Schaf-IgG-Färbungen ändert sich jedoch maßgeblich, wenn man die Färbung nach längerer Zeit durchführt. So wurden Nieren nach 31 Tagen *post injectionem* gefärbt und man erkannte in keiner Gruppe mehr eine tubuläre Anfärbung. Spannend ist auch die Tatsache, dass die Glomeruli der Cd4CreMdm2^{fl/fl}-Mäuse eine signifikant stärkere Färbung aufwiesen als die Mdm2^{fl/fl}-Mäuse. Allgemein deutet diese Färbung nach 31 Tagen auf eine sehr andauernde Bindung der Anti-GBM-Immunglobuline hin (s. Abbildung 16). Eine Mitbeteiligung der Lunge wie beim Goodpasture Syndrom wurde bei den durchgeführten Experimenten nicht überprüft. Die nachgewiesenen Schaf-Immunglobuline zeigen, dass die verwendeten Antikörper im Modell ihren Zweck erfüllen, die Basalmembran binden und somit die nephrotoxische Serumnephritis induzieren.

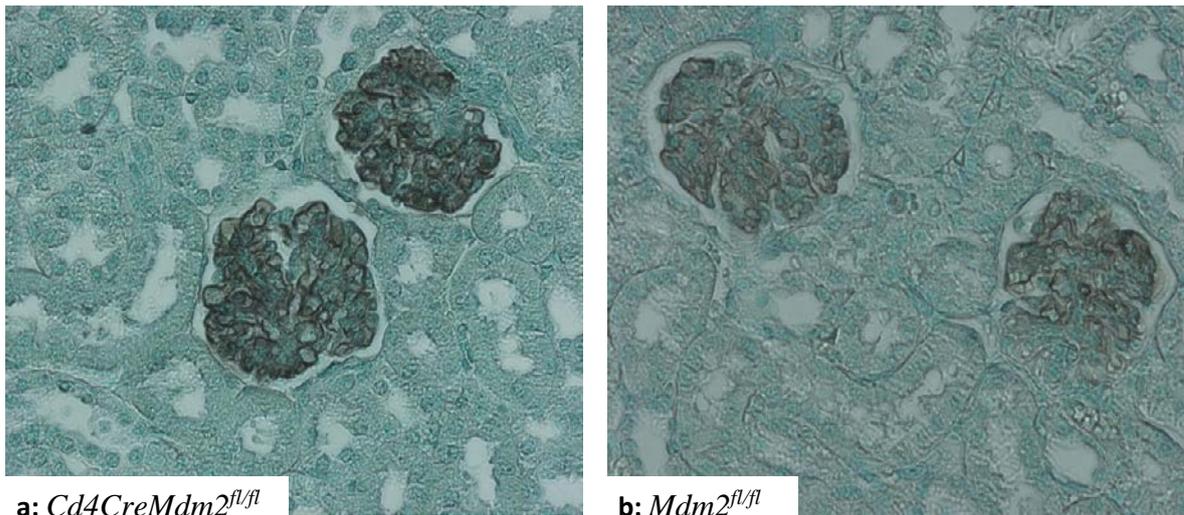


Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von Schaf- IgG 31 Tage nach Injektion von 150µl Anti- GBM-Serum. Die Tubuli sind nicht mehr gefärbt und es besteht eine stärkere Färbung der Nieren der Knockoutmäuse, was aufgrund der folgenden Ergebnisse überraschend ist. Vergrößerung: 20x.

4.3 *Mdm2*-Defizienz in CD4-Zellen hat im Anti-GBM-Modell mit Präimmunisierung einen protektiven Effekt

Um den Einfluss des *Mdm2*-Knockouts in CD4-Zellen im Anti-GBM-Modell zu analysieren, wurden verschiedene Parameter herangezogen, die einen Hinweis auf das Ausmaß der Nierenschädigung geben. Die Mäuse wurden 3 Tage vor der Anti-GBM-Injektion mit Schaf-IgG präimmunisiert. Die Ergebnisse der Versuche zeigten nicht den erwarteten Anstieg der Albuminurie in der sekundären Phase durch die Bildung von Immunkomplexen, weshalb durch Variation der Dosis versucht wurde, die erwarteten Daten zu erzeugen.

Die Analyse des Urins durch Albumin-ELISA stellte eine Herausforderung dar, da man zunächst die richtige Verdünnung des Urins ermitteln musste um auswertbare Daten zu erhalten. Bei Urin, welcher höher konzentriert ist als der Albuminstandard, kann keine genaue Quantifizierung erfolgen, da dies der hyperbole Kurvenverlauf der Absorptionswerte nicht zulässt. So mussten die Urinproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedlich hoch verdünnt werden, wobei Verdünnungen von 1:1000 bis zu 1:1.000.000 notwendig waren.

Die Dosis Anti-GBM-Serum wurde nicht gewichtsadaptiert appliziert, da Mäuse gleichen Geschlechts ähnliches Gewicht hatten und die Injektion aus praktischen Gründen nicht so genau erfolgen konnte. Zunächst wurden jeder Maus der beiden Gruppen 50µl Anti-GBM-Serum retroorbital *i.v.* injiziert. Die Injektion sollte zu einer autologen Reaktion mit einem Anstieg der Proteinurie nach etwa sieben Tagen führen. In den Analysen fand man jedoch bis zum 21. Tag weder einen Anstieg der Albuminausscheidung, noch führte diese Dosis zu einer histologisch

beurteilbaren Nierenschädigung, was bedeutet, dass diese Dosis subnephrotoxisch ist und auch langfristig zu keiner Immunkomplexnephritis führt.

4.3.1 150µl-Dosis Anti-GBM-Serum

Es zeigte sich, dass sich bei der ursprünglich geplanten protokollkonformen Dosis von 50µl Anti-GBM-Serum *i.v.* keine Proteinurie entwickelte. Daraufhin wurde die Dosis auf 150µl gesteigert, was sich in einer massiven Proteinurie in der Akutphase äußerte.

Die Albuminkonzentration hat in beiden Gruppen am ersten Tag ihren Höhepunkt und fällt dann rasant ab. Am Tag 4 ist die Konzentration schon sehr viel niedriger und fällt bis zum 22. Tag langsam ab, verbleibt dann jedoch auf einem konstanten Level (s. Abbildung 17a). Die Kreatininkonzentration im Urin fällt zunächst in beiden Gruppen kontinuierlich bis zum 12. Tag, was auf einen zusätzlichen tubulären Schaden hindeutet. Die Kontrollgruppe scheint sich nicht mehr zu erholen und bleibt bis zum letzten Tag auf einem konstant niedrigen Niveau. Die Experimentengruppe zeigt ab Tag 12 wieder eine Regenerationstendenz der Konzentrationsfähigkeit des Harns (s. Abbildung 17b).

Das Albumin/ Kreatininverhältnis ist bei den *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen am ersten Tag am höchsten und sinkt wie die Albuminkonzentration ab, bis es in den Tagen 22 bis 31 auf durchschnittlich 1,5 verbleibt. Bei der Kontrollgruppe ist das Verhältnis am Tag 7 auf seinem Höhepunkt und sinkt

dann bis zum 22. Tag zu einem Durchschnittswert von 20,4 in den letzten drei Urinproben ab.

Das zeigt, dass sich auch bei dieser Dosis keine Immunkomplexnephritis entwickelt. Stattdessen konnte man unerwarteter Weise eine starke Reaktion auf die nephrotoxische Dosis in der Akutphase beobachten (s. Abbildung 17c).

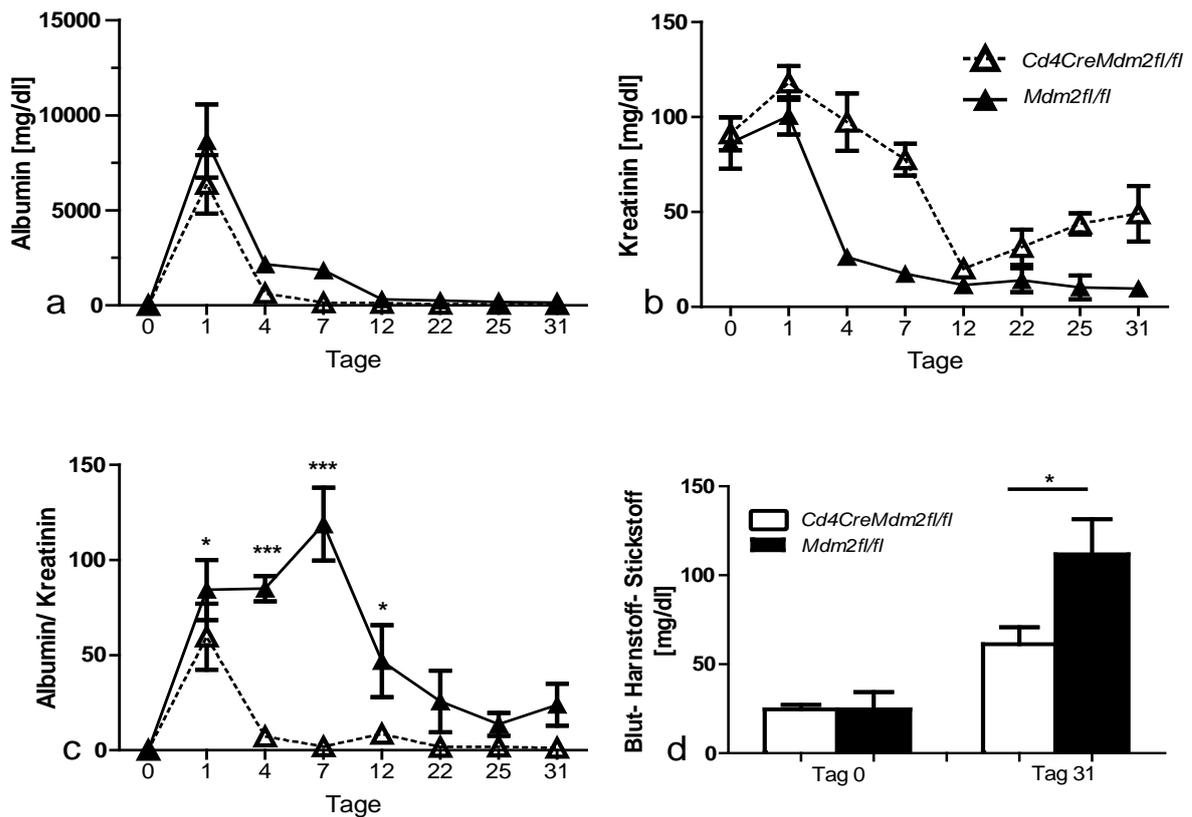


Abbildung 17: Verlauf der Albumin- und Kreatinin-Werte im Urin sowie der Blut-Harnstoff-Stickstoffwerte bei der 150µl-Dosis mit Präimmunisierung. Das Albumin/ Kreatininverhältnis zeigt von Tag 1 bis Tag 12 einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchstiergruppen. In der Kontrollgruppe erkennt man, dass die Serumkonzentration von Harnstoff-Stickstoff der Kontrollgruppe im Gegensatz zu den Knockout-Mäusen ebenfalls signifikant erhöht ist.

Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, p-Wert errechnet durch t-Test, $n = 5$ pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

Die *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse haben einen wesentlichen Vorteil in diesem Modell. Die Knockout-Mäuse haben zu allen Zeitpunkten nach der Injektion weniger Albuminurie und regenerieren sich schneller als die Mäuse der Kontrollgruppe. Das Albumin/ Kreatininverhältnis der Experimentengruppe beträgt am 1. Tag 50,3% des Wertes der Kontrollgruppe. Der größte Unterschied besteht am 7. Tag, wo das Verhältnis bei der Kontrolle 118,9 und bei den Knockout-Mäusen 1,7 beträgt. Langfristig bleibt das Verhältnis der Cre-negativen Mäuse ab Tag 22 14-fach höher als das der Knockout-Mäuse. Überraschenderweise zeigt sich in diesem Experiment, dass nicht nur ein langfristiger Vorteil auf Seiten der *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse besteht, sondern auch in der Akutphase der Nierenschaden begrenzt wird. Die BUN bestätigt einen tubulären Schaden in beiden Gruppen, da sich die Werte vom Tag 0 bis zum Tag 31 um ein Vielfaches erhöhen. Die Werte der Kontrollgruppe unterscheiden sich jedoch signifikant von denen der Knockout-Mäuse

und zeigen einen vermehrten tubulären Schaden (s. Abbildung 17d). Das Serumkreatinin ist in keiner der beiden Gruppen angestiegen, hierbei konnte keine Differenz festgestellt werden.

Abbildung 18 zeigt die Nierengewebschnitte 31 Tage nach der Injektion. Die Glomeruli der Kontrollgruppe sind größtenteils sklerosiert und die Tubuli dilatiert mit abgeflachten Tubulusepithelzellen, während bei der experimentellen Gruppe keine bis nur wenig Sklerose auftrat.

Somit konnte mit der Dosis von 150µl Anti-GBM-Serum nachgewiesen werden, dass die Mäuse mit dem *Mdm2*-Knockout durch eine verminderte Entzündungsreaktion weniger Nierenschaden davontragen als die Mäuse ohne Knockout. Der Unterschied im Albumin/ Kreatinin-Verhältnis und auch in der histologischen Begutachtung sind beeindruckend, jedoch konnte im Verlauf keine Immunkomplexnephritis beobachtet werden.

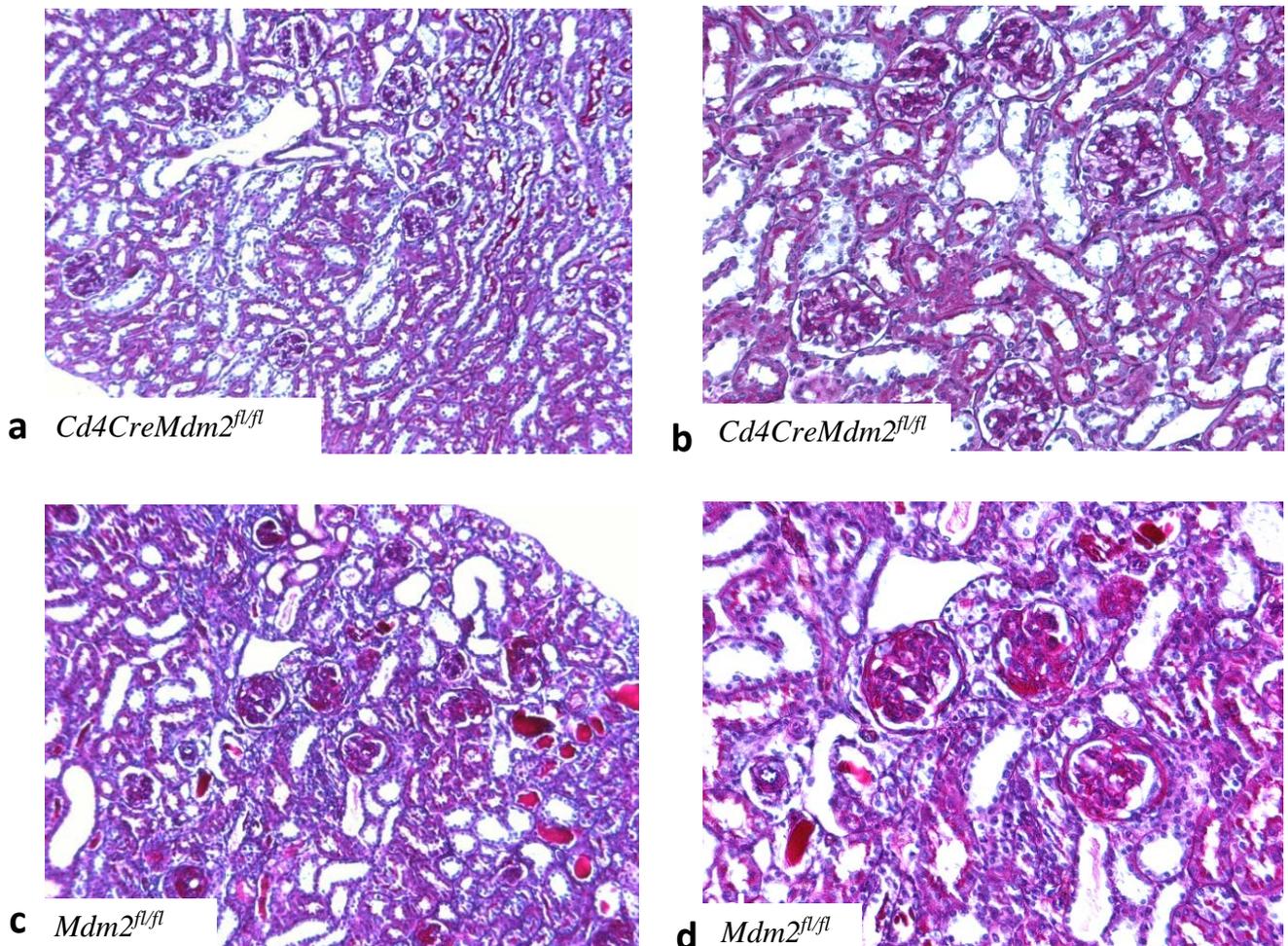


Abbildung 18: Gewebsschnitte der Nieren, 31 Tage nach Injektion von 150µl Anti-GBM-Serum. a und b repräsentieren die *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse. Das Gewebe ist zum größten Teil gesund und die Kapillaren in den Glomeruli sind gut erkennbar. **c und d** ist ein Gewebsschnitt einer Kontrollmaus. Man erkennt dilatierete Tubuli und starke glomeruläre Sklerosierungen, Halbmondbildung und intratubuläre Proteinablagerungen. PAS-Färbung; **a, c:** Vergr. 10x; **b, d:** Vergr. 20x.

Um die Schädigung der Nierenkörperchen zu quantifizieren wurde die Halbmondformation der sklerosierten Glomeruli ausgezählt und mit einer Grafiksoftware die Glomerulosklerosefläche bestimmt (s. Abbildung 19).

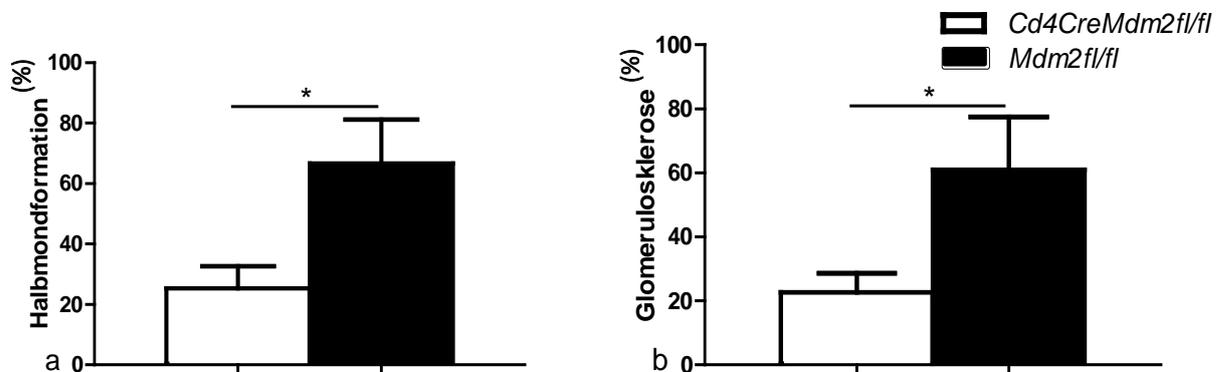


Abbildung 19: Auftreten von Halbmondformationen und Glomerulosklerose im Vergleich. **a:** Prozentuelle Angabe, wie viele Glomeruli durchschnittlich von Halbmondbildung betroffen sind. **b:** Prozentuelle Angabe, wieviel Fläche eines Glomerulus durchschnittlich von Glomerulosklerose betroffen ist. Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0.05$, p-Wert errechnet durch t-Test, $n = 5$ pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

Durch die Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Wt1 konnten die Kerne von Podozyten violett angefärbt werden. Nephrin wurde grün gefärbt, und TO-PRO3 markierte zur Übersicht alle Zellkerne blau, wodurch man den Verlust von Podozyten zusätzlich quantifizieren und den Strukturverlust der Glomeruli verdeutlichen konnte (s. Abbildung 20).

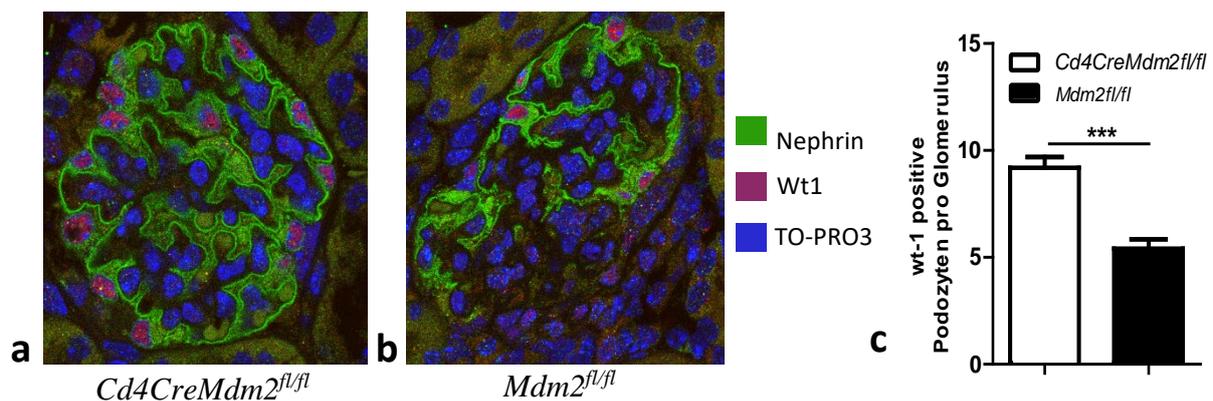


Abbildung 20: Podozytenverlust in den Glomeruli. **a** und **b** zeigen den Zustand der Nierenkörperchen der Mäuse. Violett gefärbt sieht man die unterschiedliche Anzahl der vitalen Podozyten. Vergrößerung: 400x. Es wurden jeweils 10 Glomeruli pro Gruppe ($n = 5$) ausgezählt. **c** zeigt graphisch die durchschnittliche Podozytenzahl, wobei deutlich mehr Zellen in den Knockoutmäusen gefunden wurden.

4.3.2 100µl-Dosis Anti-GBM-Serum

Nachdem der Fokus auf die autologe Phase mit Immunkomplexnephritis gelegt werden sollte, wurde beim folgenden Experiment die Dosis auf 100µl Anti-GBM-Serum gesenkt, damit die subnephrotoxische Dosis nicht zu stark überschritten wird und die sekundäre, autologe Phase eintreten kann, welche sich weder bei der niedrigen 50µl Dosis noch der 150µl-Dosis zeigte.

Wiederum trat am ersten Tag eine starke Albuminurie auf, welche jedoch in absoluten Werten mehr als zehnmal geringer als bei der 150µl-Dosis ausfiel. Wieder gipfelt die Kurve in beiden Gruppen nach einem schnellen Anstieg am ersten Tag. Nach dem raschen Absinken bis zum Tag 4 bleibt die Albuminurie auf einem konstant niedrigen Niveau und ist ab Tag 15 in keiner Gruppe mehr nachweisbar. Die Albuminkonzentration ist am Tag 1 in der Kontrollgruppe 2,8 mal so hoch wie in den *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen. Ab dem vierten Tag ist kein Unterschied mehr feststellbar und beide Verläufe entwickeln sich gleich (s. Abbildung 21a).

Die Konzentration von Kreatinin im Urin fiel auch bei dieser Dosis erkennbar bis zum 15. Tag, jedoch stieg sie in beiden Gruppen wieder bis zu ihrem Ausgangswert am 21. Tag an, was auf eine tubuläre Regeneration hindeutet (s. Abbildung 21b).

Das Albumin/ Kreatininverhältnis ist wie die Albuminkonzentration bei beiden Gruppen am ersten Tag nach der Injektion am höchsten und beträgt 11,4 in den *Mdm2^{wt/wt}*-Mäusen und 4,7 in der Experimentengruppe. Ab Tag 4 bleiben beide Gruppen bis zum Tag 15 auf einem konstant niedrigen Niveau, wobei danach das Verhältnis wegen nicht mehr nachweisbarer Albuminurie nicht errechnet werden kann (s. Abbildung 21c).

In der Grafik erkennt man den Unterschied des Albumin-Kreatinin-Quotienten zwischen den beiden Gruppen am ersten Tag, welcher 243% beträgt. Jedoch sieht man, dass wiederum keine autologe Phase erfolgte und das Albumin/ Kreatininverhältnis im Zeitraum nicht mehr anstieg.

In der histologischen Begutachtung beider Genotypen waren weder Sklerosierungen noch andere pathologischen Morphologien erkennbar, was bedeutet, dass die gewählte Dosis zu gering war, um einen bleibenden morphologischen Schaden zu hinterlassen.

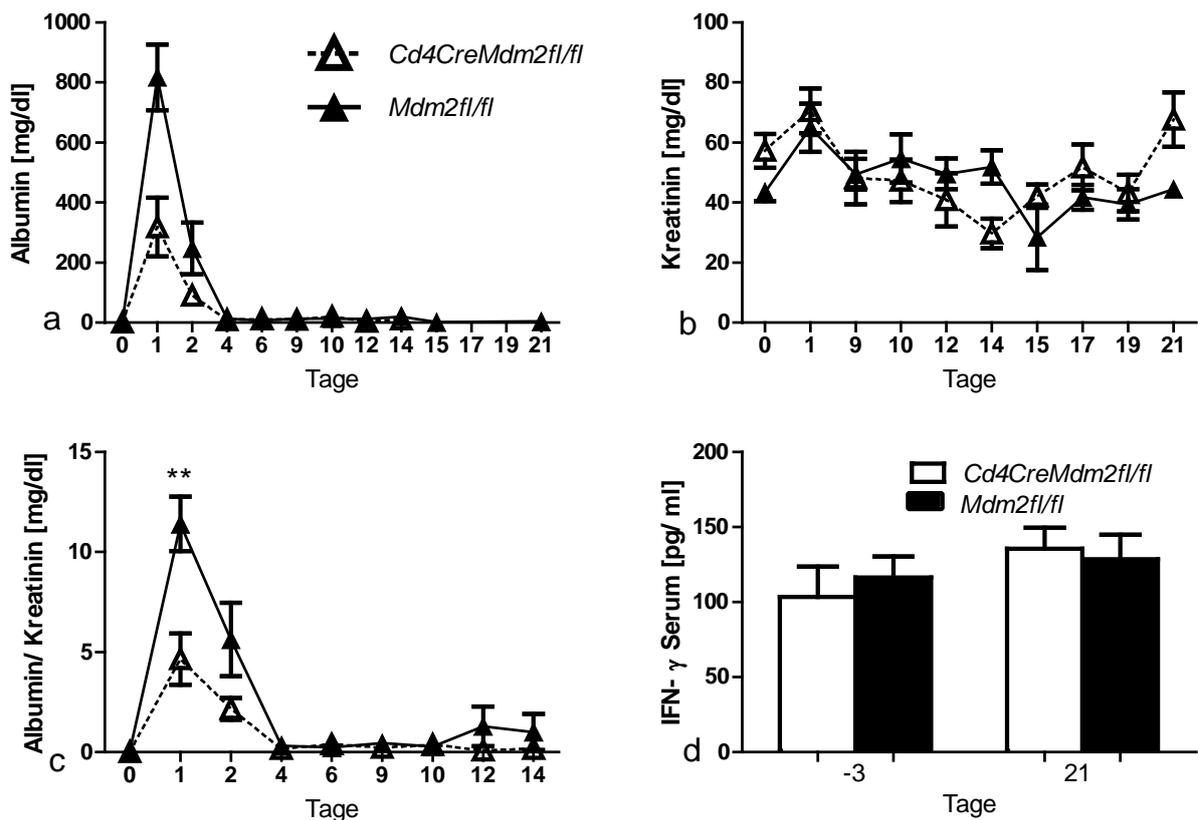


Abbildung 21: Verlauf der Albumin- und Kreatinin-Werte im Urin sowie der $\text{INF-}\gamma$ -Serumkonzentrationen bei 100 μl Anti-GBM-Serum mit Präimmunisierung.

Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0.01$, p-Wert errechnet durch t-Test, $n = 6$ pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

Um genauere Informationen über die zellulären Zusammensetzungen zu erhalten, wurden von beiden Gruppen derselben Mäuse Splenozyten isoliert und die T-Zellen durch Zugabe von Schaf-IgG aktiviert. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Aktivierung der Zellen wurde bestätigt, indem $\text{INF-}\gamma$ mittels ELISA aus dem Zellmediumüberstand der abzentrifugierten Zellen gemessen und ein höherer Spiegel festgestellt wurde (s. Abbildung 22f).

Es wurde durch die Analyse von CD3, CD4 und CD8 erneut bestätigt, dass in $\text{Cd4CreMdm2}^{\text{fl/fl}}$ -Mäusen weniger T-Zellen vorhanden sind (s. Abbildung 22a-c).

Ein interessantes Ergebnis ist, dass Neutrophile der experimentellen Gruppe signifikant weniger CD11b exprimieren. Die MFI (Mean Fluorescence Intensity) von CD11b an Neutrophilen war in $\text{Cd4CreMdm2}^{\text{fl/fl}}$ -Mäusen nur 56,1% von denen der Kontrollgruppe (s. Abbildung 22e).

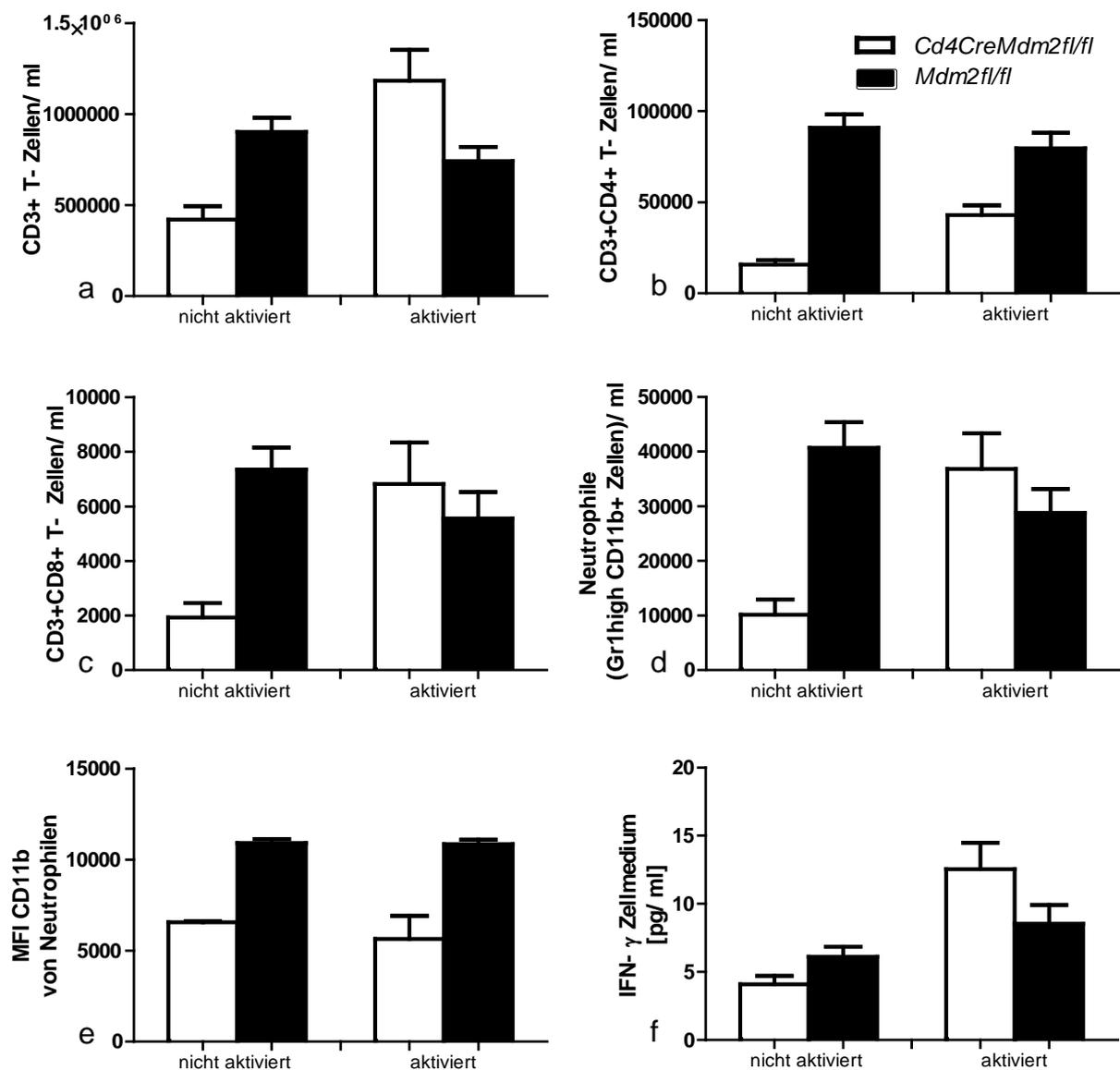


Abbildung 22: Zellanalyse von aktivierten und nicht aktivierten Splenozyten nach der Injektion von 100µl Anti-GBM Serum. Die Immunzellen wurden durch Zugabe von Schaf- IgG aktiviert und mit nicht aktivierten Zellen verglichen. In **e** sieht man, dass CD11b auf Neutrophilen weniger Leuchtsignal hat, was auf eine verringerte Expression hindeutet. Mit dem Anstieg von IFN- γ im Zellkulturmedium kann man auf eine funktionierende T-Zellaktivierung schließen (**f**). Die Unterschiede sind nicht signifikant.

Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=3 pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

4.3.3 200µl-Dosis Anti-GBM-Serum

Da bei der 100µl-Dosis ebenfalls keine Immunkomplexnephritis entstand und der Fokus des Experimentes nach wie vor auf dieser Phase gelegen hat, entschied man sich für die Testung von 200µl Anti-GBM-Serum. Die Gründe dafür waren, dass histologisch bei 100µl bei keiner der Gruppen Nierenschädigungen erkennbar waren und bei 150µl zwar schon, dafür keine autologe Immunreaktion. Die Möglichkeit bestand, dass durch eine höhere Dosis diese Immunkomplexe

vermehrt provoziert werden. Das Prozedere der Präimmunisierung drei Tage vor der Injektion des Serums wurde ident beibehalten.

Wie durch die Erfahrungen der letzten Experimente erwartet, stieg die Albuminurie am ersten Tag massiv an. Die Kontrollmäuse hatten mehr als doppelt so hohe Albuminkonzentration im Urin als die Experimentengruppe. Am zweiten Tag fielen die Werte schnell ab. Bei den Kontrollmäusen entwickelte sich ein erneuter Anstieg bis Tag 4, bis die Werte ab Tag 9 auf einem stabilen Niveau blieben. Bei der Experimentengruppe gab es ab Tag 2 einen mäßigen Abfall bis Tag 9, wo dann das Level bis Tag 21 weiter sank (s. Abbildung 23a).

Die Kreatininkonzentration im Urin stieg in der Kontrollgruppe am ersten Tag massiv an und fiel wieder bis Tag 7 ab, wo es dann auf einem konstant niedrigen Niveau blieb. Die *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse zeigten einen kleinen Anstieg der Kreatininkonzentration am ersten Tag, das Level blieb sonst jedoch durchwegs stabil. Es zeigt sich wieder, dass vor allem die Nieren der Kontrollgruppe an Konzentrationsfähigkeit einbüßen und sich nicht wieder auf Normalniveau regenerieren (s. Abbildung 23b).

Durch den Unterschied der Kreatininkonzentration ergibt sich im Albumin/ Kreatininverhältnis ein ähnlicher Kurvenverlauf der beiden Gruppen. Die Werte steigen am ersten Tag sehr stark an, sinken am zweiten Tag etwas ab und steigen am Tag 3 und Tag 4 erneut an, ohne das Niveau von Tag 1 wieder zu erreichen. Die Werte fallen dann konstant bis Tag 9 ab. Trotz ähnlichen Kurvenverlaufs hat die Kontrollgruppe immer höhere Werte, wobei der große Unterschied der Vorexperimente am Tag 1 nicht mehr zu sehen ist. Im weiteren regenerativen Verlauf zeigen sich dann doch wieder die Vorteile der Knockout-Mäuse, da sie am Tag 9 sehr niedrige Quotientenwerte haben und sich bis zum Ende des Experimentes auf Normalwerte bessern. Die Kontrollmäuse bleiben ab Tag 9 auf einem etwa konstanten Niveau von etwa 35, die Nierenfunktion erholt sich jedoch nicht mehr gänzlich (s. Abbildung 23c).

Die Blut-Harnstoff-Stickstoff-Konzentration stieg in beiden Gruppen bis zum letzten Tag an. Die Werte betragen bei den *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen einen Anstieg um 79,5% und bei der Kontrollgruppe um 88,5%, was in beiden Gruppen auf eine ausgeprägte tubuläre Schädigung hindeutet (s. Abbildung 23d). Die sekundäre Schädigung der Niere mit Anstieg des Albumin/ Kreatininverhältnisses nach einigen Tagen blieb bei dieser Dosis ebenfalls aus.

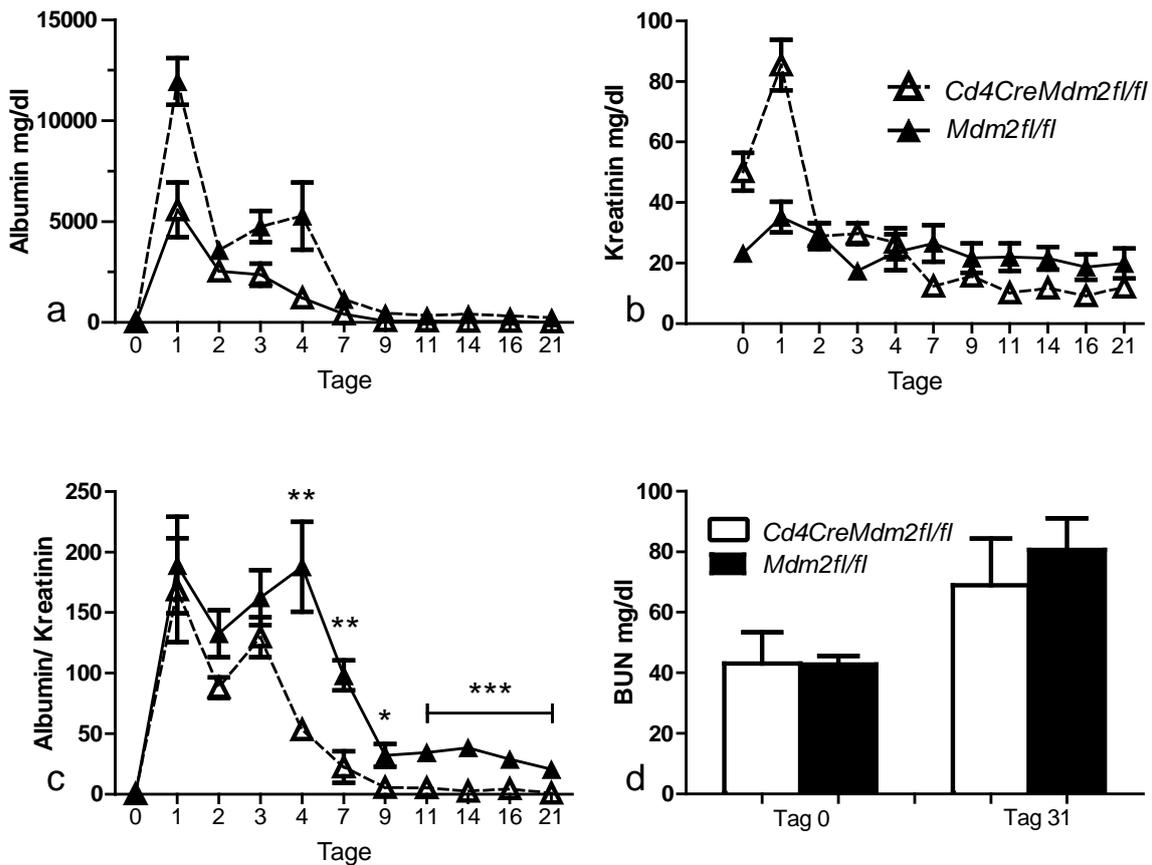


Abbildung 23: Verlauf der Albumin- und Kreatinin-Werte im Urin sowie der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Werte bei der 200µl-Dosis mit Präimmunisierung.

Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, p-Wert errechnet durch t-Test, $n = 5$ pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

Bei diesem Experiment wurden zusätzlich Messungen der GFR zu vier Zeitpunkten vor Beginn des Experiments, am Tag 2, Tag 10 und am Tag 17 durchgeführt. Vor der Präimmunisierung gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Am Tag 2 nach der Injektion des Anti-GBM-Serums fielen beide Gruppen mit der GFR ab, wobei die experimentelle Gruppe etwas bessere Nierenfunktion zeigte, hier betrug der Abfall der GFR 64,2% im Vergleich zu 77,0%. Bis zum Tag 10 erfolgte in beiden Gruppen eine Erholung, wobei die Regeneration der *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse erheblich besser war und bereits 91,9% des Ausgangswertes wieder erreicht waren. In der Kontrollgruppe ist trotz einer Verbesserung die Filtration erst bei 35,3% des Ausgangswertes und bleibt auf diesem Niveau bis zur letzten Messung am Tag 17. Im Gegensatz dazu hat sich die GFR der CD4-Knockout-Mäuse beinahe auf den Ausgangswert regeneriert, und zwar auf 99,2% (s. Abbildung 24).

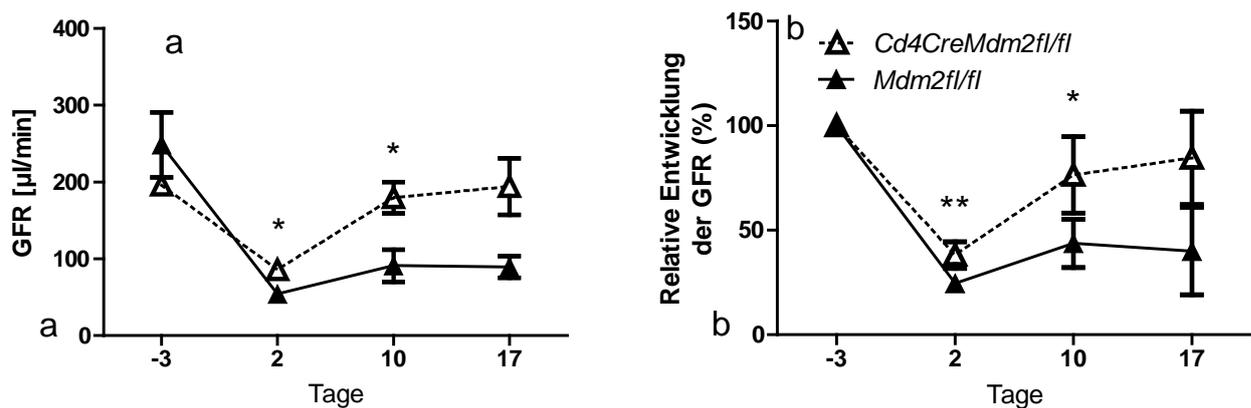


Abbildung 24: Absolute und relative Werte der GFR-Messungen im Verlauf nach Injektion von 200µl Anti-GBM-Serum mit Präimmunisierung.

Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, p-Wert errechnet durch t-Test, $n = 5$ pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

Die histologische Begutachtung der Gewebeproben der Niere in PAS-Färbung zeigt einen großen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die experimentellen Mäuse haben morphologisch großteils normale Glomeruli mit nur vereinzelt partiellen Sklerosierungen und vergrößerten Bowman'schen Räumen. Die Kapillarschlingen sind gut erkennbar, die Tubuluszellen sind normal groß und in normaler Zahl vorhanden. Die Tubuli sind nicht dilatiert und ebenfalls ohne pathologischen Befund. Im Gegensatz dazu findet man bei den Mäusen ohne Knockout eine schwere Nierenschädigung vor. Die Glomeruli sind zum Großteil sklerosiert und fibrotisch umgebaut. Die Tubuli sind dilatiert, teilweise mit Proteinablagerungen im Lumen versehen und die Tubulusepithelzellen sind abgeflacht (s. Abbildung 25).

Aufgrund der ausbleibenden autologen Immunkomplexnephritis in sämtlichen Versuchen wurde beschlossen, den Fokus des Experimentes, nämlich die Hypothese, dass CD4+-Zelldepletion zu einer verringerten Ausprägung der autologen Phase führt, auf die bisherigen Phänomene der Experimente zu verlegen. Was jedoch eindeutig gezeigt wurde, ist, dass *Mdm2*-Defizienz in CD4-Zellen nach Anti-GBM-Seruminjektion mit Präimmunisierung einen protektiven Effekt auf die Niere hat.

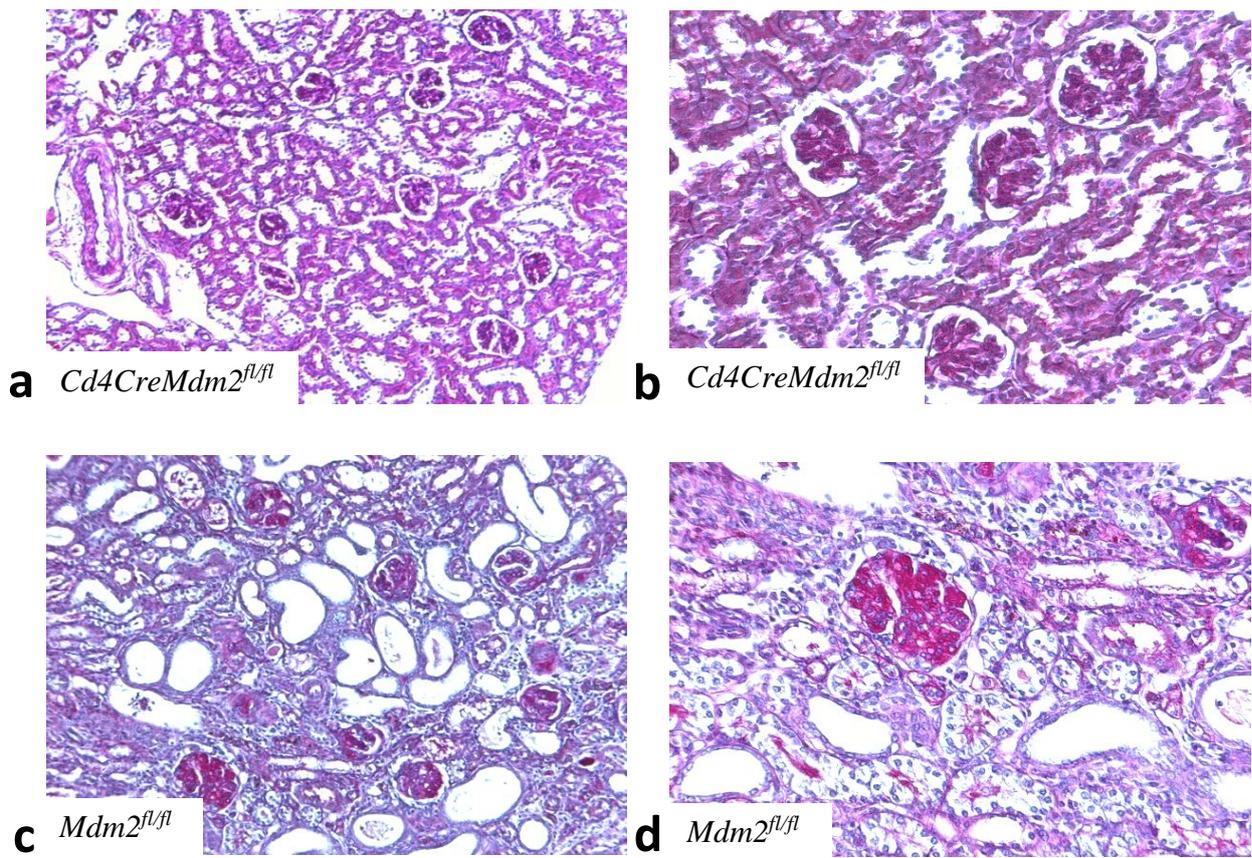


Abbildung 25: Gewebsschnitte der Nieren, 21 Tage nach Injektion von 200µl Anti-GBM-Serum. a und b zeigen die Niere einer *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Maus. Die hohe Dosis an Serum hat eine leichte Sklerose der Glomeruli bewirkt. c und d sind Bilder einer *Mdm2^{fl/fl}*-Maus, bei der man zusätzlich zur Glomerulosklerose eine starke Dilatation von Tubuli mit Abflachung des Epithels und Substanzeinlagerungen in den Lumina erkennt. PAS-Färbung; a, c: Vergr. 10x; b, d: Vergr. 20x.

4.4 Anti-GBM-Modell ohne Präimmunisierung resultiert in geringerer Proteinurie

Die Präimmunisierung der Versuchstiere mit Schaf-Immunglobulin und Freund-Adjuvans bewirkt beim Anti-GBM-Nierenschädigungsmodell eine Bildung von Antikörpern gegen das schädigende Serum und führt daher zu einer Beschleunigung der Bildung von Immunkomplexen und zu einer schnelleren sekundären Schädigung. Im folgenden Modell wird auf diese Präimmunisierung verzichtet und die Immunkomplexe sollten, wenn überhaupt, erst nach längerer Zeit auftreten als beim Modell mit Präimmunisierung. Der Einfluss der partiellen CD4+-Zelldepletion auf den Krankheitsverlauf war bei diesem Modell noch nicht erforscht, weswegen man Experimente unternahm um zu sehen, ob ein Unterschied zur Kontrollgruppe besteht.

Die Versuche wurden ebenfalls mit verschiedenen Dosen Anti-GBM-Serum durchgeführt, wobei nicht abschließend geklärt werden konnte, ob ein Unterschied besteht oder nicht.

4.4.1 100µl Dosis Anti-GBM-Serum

Bei der Dosis von 100µl Anti-GBM-Serum *i.v.* verhielt es sich ähnlich wie beim Modell mit Präimmunisierung, wo am ersten Tag nach den Injektionen die Albuminkonzentrationen im Harn auf hohe Werte schnellten. Dabei entstand ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen, und die Kontrollgruppe entwickelte wie im Modell mit Präimmunisierung erheblich höhere Werte. Die Albuminkonzentration sank jedoch bis zum dritten Tag rasch ab, wobei die Kontrollgruppe bis zum Ende des Experiments am siebenten Tag auf einem stabilen Niveau verharrte. Die *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse hatten bis zum Schluss ein wenig höhere Werte (s. Abbildung 26a).

Die Kreatininkonzentration im Urin stieg im Durchschnitt bis zum dritten Tag an und sank dann wieder etwas ab, wobei es hier keine extremen Schwankungen und Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gab (s. Abbildung 26b).

Das Albumin/ Kreatininverhältnis zeigte lediglich am ersten Tag in beiden Gruppen eine relevante Erhöhung auf den Wert von 6,0 im Durchschnitt der Kontrollgruppe und 3,5 bei den experimentellen Mäusen. Der Unterschied war mit einem p-Wert von 0,006 signifikant, wobei sich in der Folge die Kontrollmäuse schneller erholten und am dritten Tag keine Proteinurie mehr aufwiesen. Die Knockoutmäuse hatten am dritten Tag noch einen niedrigen Wert von 1,63 und erholten sich ebenfalls konstitutiv bis zum Schluss weiter (s. Abbildung 26c).

Beim BUN-Wert gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. In der experimentellen Gruppe stieg der Wert etwas an, während er bei der Kontrollgruppe im Durchschnitt sogar etwas abfiel.

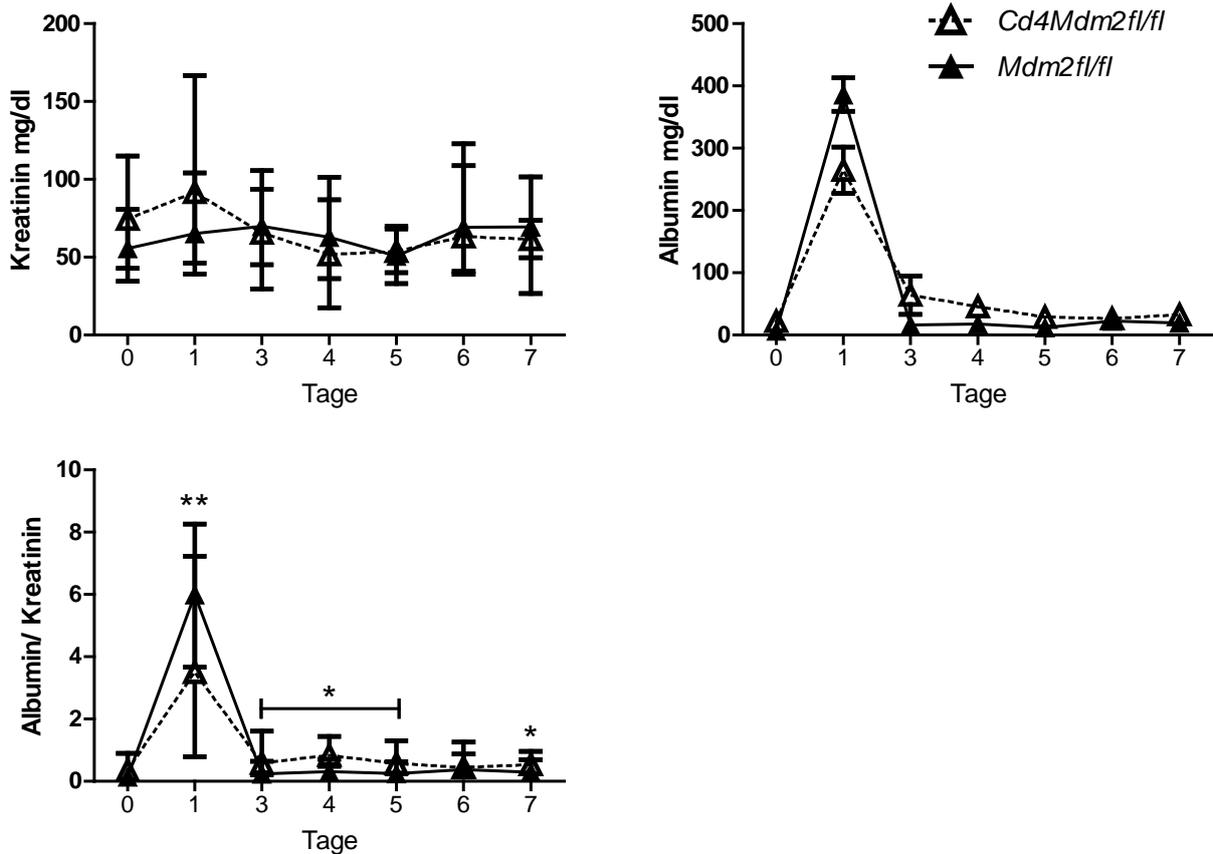


Abbildung 26: Verlauf der Albumin- und Kreatinin-Werte im Urin bei der 100 μ l- Dosis ohne Präimmunisierung. Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, p-Wert errechnet durch t-Test, n=10 pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

4.4.2 200 μ l Dosis Anti-GBM-Serum

Am ersten Tag nach der Injektion von 200 μ l Anti-GBM-Serum entstand bei beiden Gruppen eine massive Albuminurie mit etwa gleich hohen Gipfeln von etwa 12000ng/ml, welche am zweiten Tag stark auf unter 4000ng/ml abgefallen waren. Bis zum Tag 9 des Experimentes verbesserten sich beide Gruppen im Durchschnitt mit gleicher Tendenz bis zu einem Wert von unter 320ng/ml (s. Abbildung 27a).

Die Kreatinin-Konzentrationen im Urin sanken nach dem auch in vorangehenden Experimenten beobachteten Anstieg am ersten Tag bis zum Tag 4 ab, wobei sie danach bis zum neunten Tag wieder leicht zunahm (s. Abbildung 27b).

Die Albumin/ Kreatinin-Verhältnisse beider Gruppen gipfelten auf etwa gleichem Niveau von etwa 200 am Tag 1 und fielen dann gleichmäßig bis zum Tag 9 ab, wobei die Kurven beinahe deckungsgleich verliefen (s. Abbildung 27c).

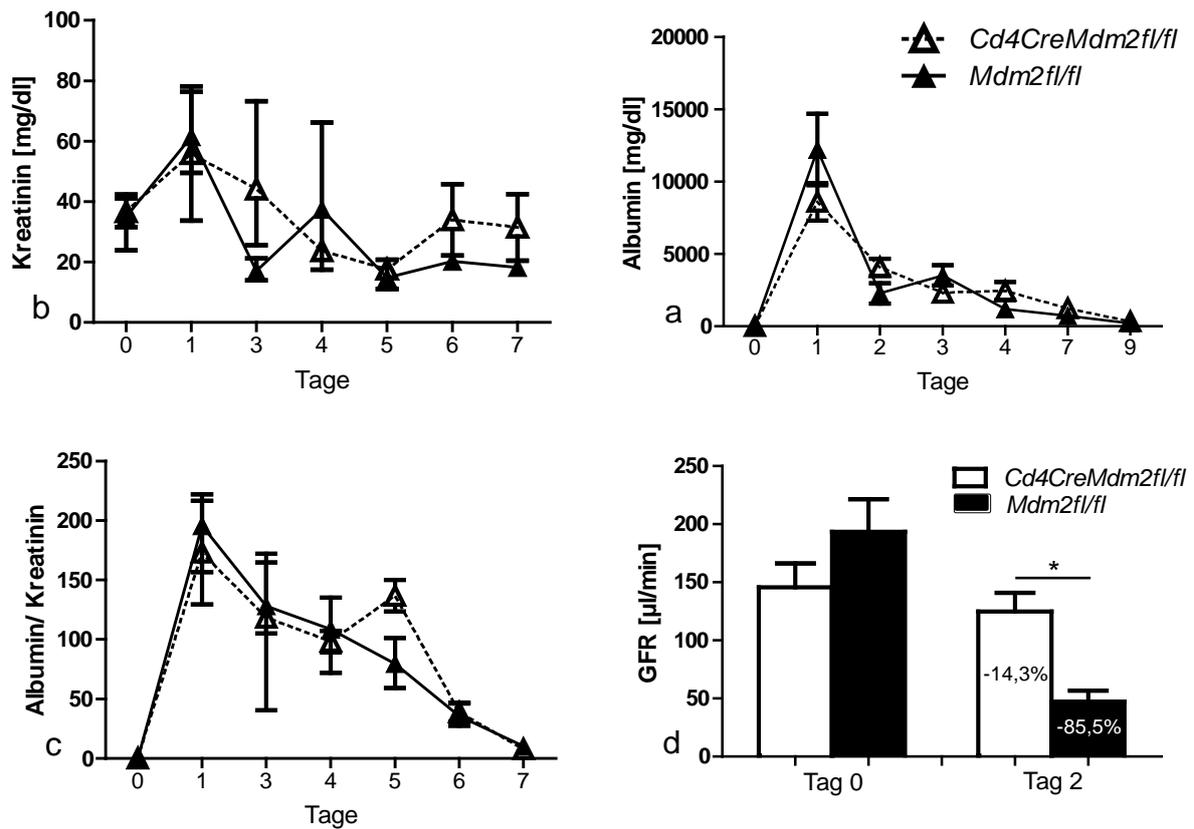


Abbildung 27: Verlauf der Albumin- und Kreatinin- Werte im Urin sowie der GFR bei der 200µl- Dosis ohne Präimmunisierung.

Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0.05$, p-Wert errechnet durch t-Test, $n = 5$ pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

Der BUN-Wert erhöhte sich im Vergleich zum Tag 0 in der experimentellen Gruppe um 7,6% während er bei der Kontrollgruppe um 19% anstieg.

Sehr interessant sind die Ergebnisse der Messungen der GFR. In den eben beschriebenen Daten konnte man im Verlauf keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen, jedoch wurde offenbar die GFR bei den Mäusen der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Knockoutmäusen schwer beeinträchtigt. Die Messungen fanden vor der Intervention und am Tag 2 danach statt. Die GFR der Knockoutmäuse fiel um 14,3%, während die der Kontrollgruppe um ganze 85,5% sank (s. Abbildung 27d).

Es lässt sich insgesamt feststellen, dass eine unterlassene Präimmunisierung in beiden Genotypen zu weniger Proteinurie führt und dass der protektive Effekt der *Mdm2*-Defizienz in CD4-Zellen wie in den Experimenten mit Präimmunisierung bestehen bleibt. Zusätzlich konnte die geringere Nierenschädigung in den Daten der GFR nachgewiesen werden.

4.5 Mit Präimmunisierung hat *Mdm2*-Defizienz in CD4-Zellen in der frühen Phase einen protektiven Effekt

Nachdem die Versuche, die autologe Phase und eigenschädigende Immunreaktion durch Immunkomplexe zu induzieren fehlschlugen, wurde der Fokus auf die Phase der ersten 24 Stunden nach der Injektion von Anti-GBM-Serum verlegt. Am ersten Tag nach der Injektion gab es bei allen versuchten Dosen das höchste Albumin/ Kreatininverhältnis, welches dann in den darauffolgenden Tagen wieder absank. Hier zeigte sich ein großer Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Dosis Anti-GBM-Serum wurde aufgrund von folgenden Überlegungen auf 150µl festgesetzt: Bei 100µl ist zwar ein großer Unterschied im Albumin/ Kreatininverhältnis, jedoch keine histologisch erkennbare, morphologische Schädigung aufgetreten. 200µl Anti-GBM-Serum hatten den Effekt, dass in der Akutphase kein Unterschied auftrat. Die besten Ergebnisse brachte das Experiment mit 150µl Dosis, da hierbei sowohl eine große Differenz in der Akutphase erkennbar war, als auch eine strukturelle Schädigung in der Niere mikroskopisch beurteilt werden konnte.

Das Prozedere wurde wie beim Modell mit Präimmunisierung gewählt, da ohne Präimmunisierung in diesem Zeitraum kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen gesehen werden konnte. Die Mäuse wurden mit dem Gemisch aus Freund's Adjuvans, PBS und Schaf-Immunglobulin präimmunisiert und dann drei Tage darauf mit 150µl Schaf Anti-GBM-Serum injiziert. Diesmal wurden jedoch die Mäuse bereits nach 27 Stunden getötet um die Geschehnisse in dieser Zeit genauer zu analysieren. Hierzu wurde Proben nach 1h, 5h, 9h, 24h, und 27h genommen, um einen detaillierteren Verlauf zu bekommen.

Nach einer Stunde *post injectionem* war noch keine Albuminurie nachweisbar, nach 5h jedoch war sie bereits vorhanden und stieg bis zur 9. Stunde weiter an. Während danach bei den *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen der Proteingehalt bis zur 27. Stunde wieder sank, stieg sie bei den *Mdm2^{fl/fl}*-Mäusen weiter (s. Abbildung 28a).

Die Kreatininkonzentration im Urin war bereits nach 5 Stunden nach der Injektion angestiegen und stieg weiter bis zum Ende des Experiments an. Interessanterweise sank die Konzentration in den Nachtstunden von 9-23 Stunden nach der Injektion in beiden Gruppen etwas ab, um daraufhin bei Stunde 27 wieder anzusteigen (s. Abbildung 28b).

Im Albumin/ Kreatininverhältnis konnte man nach einer Stunde noch keine Steigerung der Werte beobachten. Danach schossen sie jedoch in die Höhe und entwickelten sich unterschiedlich: In der Kontrollgruppe sah man einen beinahe linearen Anstieg bis zur 27. Stunde. Die experimentellen

Mäuse zeigten nach 9 Stunden ihre höchsten Werte, danach sanken sie bis zum Ende des Experimentes konstant ab. Nach 27 Stunden hatten die *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse nur mehr ein Drittel des Albumin/ Kreatininverhältnisses im Vergleich zu den *Cre*-negativen Mäusen (s. Abbildung 28c).

Bei der Analyse des Serumkreatinins fand man wie in den Vorexperimenten in beiden Gruppen keinen Anstieg. Im Gegensatz dazu stieg die Serumkonzentration von Harnstoff-Stickstoff bei der Kontrollgruppe massiv an. Vor der Injektion waren die Werte der beiden Gruppen auf gleichem Niveau. Nach 27 Stunden stiegen die Werte der *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse um durchschnittlich 19,5% an, während es bei der Kontrollgruppe um 316% des Ausgangswertes anstieg (s. Abbildung 28d).

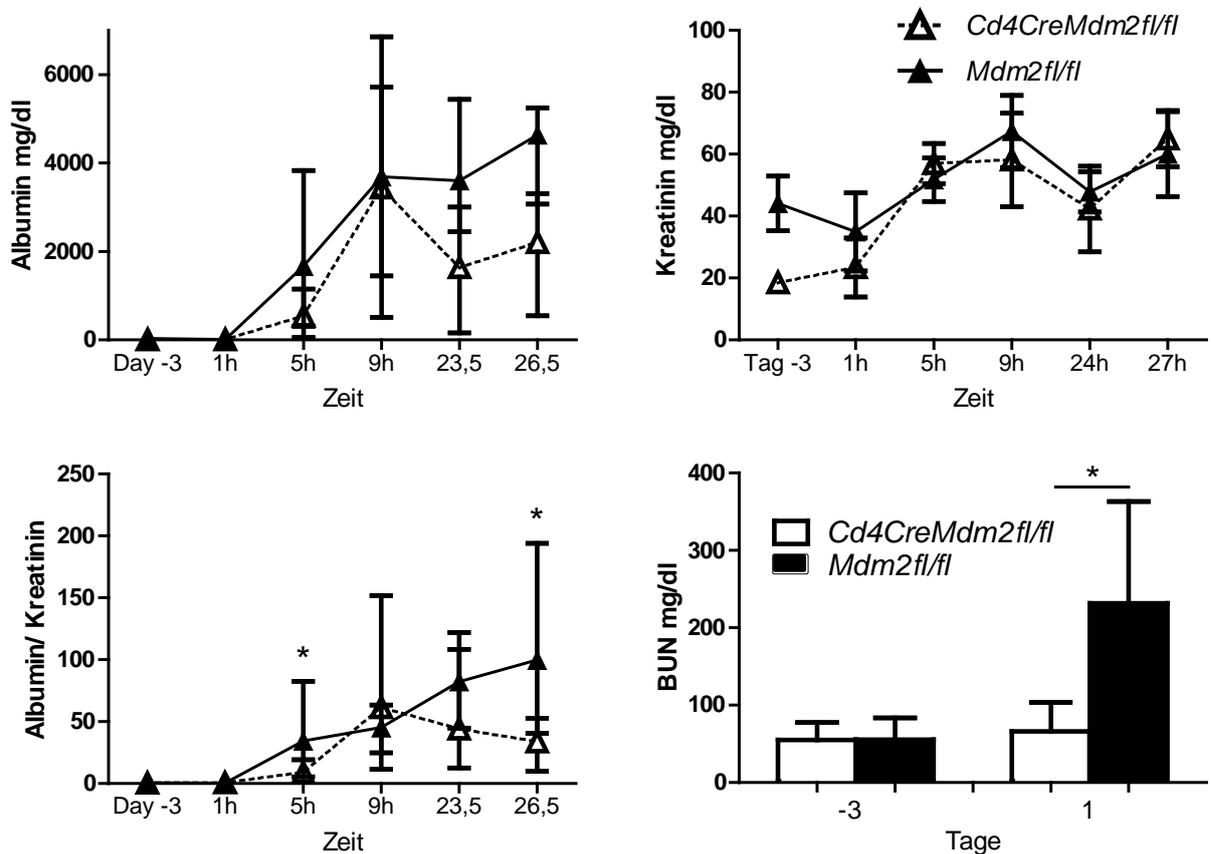


Abbildung 28: Verlauf der Albumin- und Kreatinin-Werte im Urin sowie der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Werte bei der 150µl-Dosis mit Präimmunisierung.

Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0.05$, p-Wert errechnet durch t-Test, $n = 6$ pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

Unerwarteter Weise wurde in der qPCR-Untersuchung der RNA der Mäusenieren eine höhere Konzentration von IFN- γ bei der experimentellen Gruppe als bei der Kontrollgruppe entdeckt, was sich in der Serum-Analyse durch ELISA bestätigte (s. Abbildung 29a und Abbildung 30a).

In der qPCR verschiedener Marker des Nierengewebes zeigte sich kein Unterschied bei dem Entzündungsparameter TNF- α , jedoch dafür bei IL-6 (s. Abbildung 29b und c). Die Marker Ngal-1, Ngal-2 oder Kim-1, welche eine Schädigung von Tubulusepithelzellen anzeigen, waren bei der Kontrollgruppe ebenfalls erhöht (s. Abbildung 29e-f). Die vermehrte Schädigung der Tubulusepithelzellen, welche in der BUN und in den Vorexperimenten bereits detektiert wurde, konnte somit durch die qPCR zusätzlich bestätigt werden.

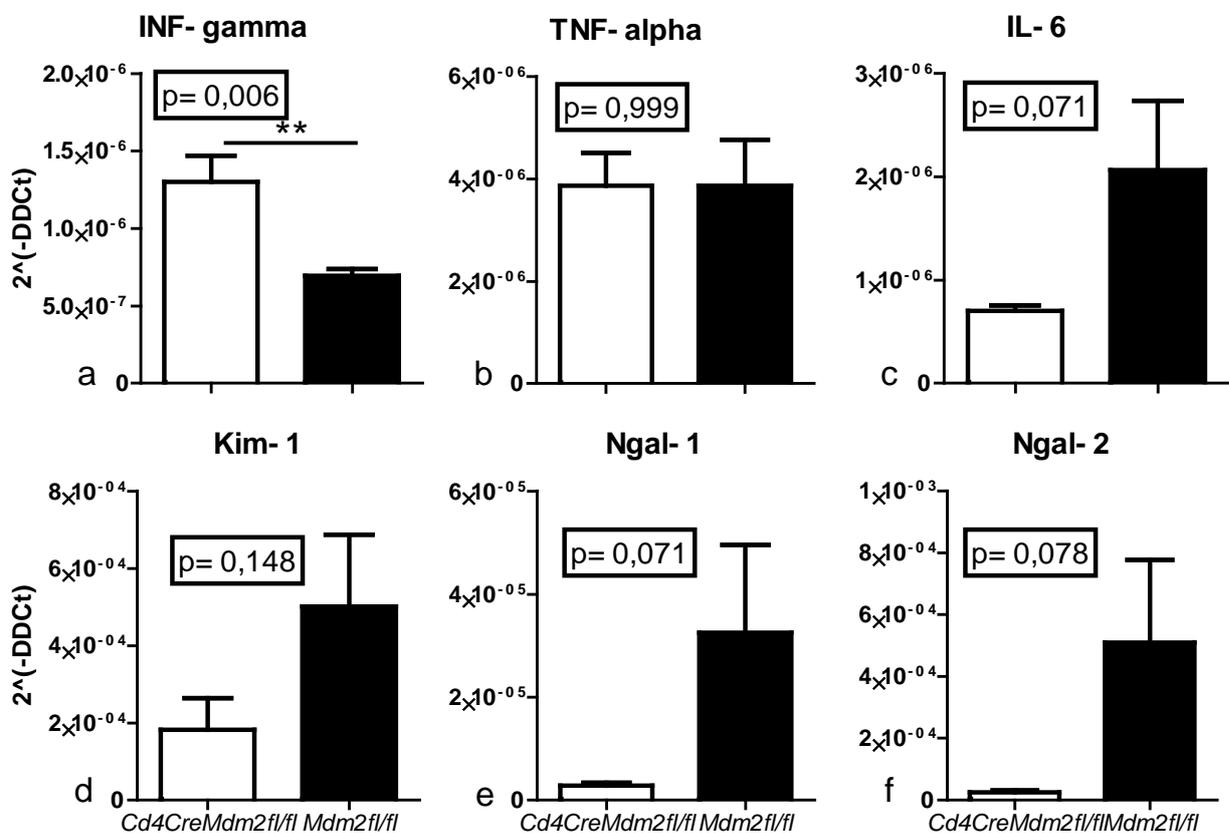


Abbildung 29: Die Ergebnisse der quantitativen PCR, 27h nach Injektion. DDCt=Delta-Delta Cycle Threshold (s. Methoden).

Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; **p<0.01, p-Wert errechnet durch t-Test, n=6 pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

Der Urin der Mäuse wurde nach 6h und 24h unter dem Mikroskop auf Hämaturie untersucht, jedoch konnten hier keine pathologischen Befunde erhoben werden.

Bei der quantitativen Analyse der Blutseren auf Immunglobuline Typ IgG und IgM durch ELISA stellte man fest, dass sich die Konzentrationen der Immunglobuline voneinander unterschieden. Die IgM-Spiegel vor der Intervention waren bei den *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen um 56% signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Dann jedoch überstieg die IgM-Konzentration der Kontrollgruppe nach 27 Stunden denjenigen der Knockoutmäuse erheblich. Bei der Kontrollgruppe stieg der IgM-Spiegel auf 174% des Ausgangswertes, während er bei den Knockoutmäusen lediglich um 41% anwuchs, was sich mit einem p-Wert von 0,00009 als signifikant herausstellte (s. Abbildung 30b). Die gemessenen IgG-Konzentrationen unterschieden sich vor der Präimmunisierung nicht, am

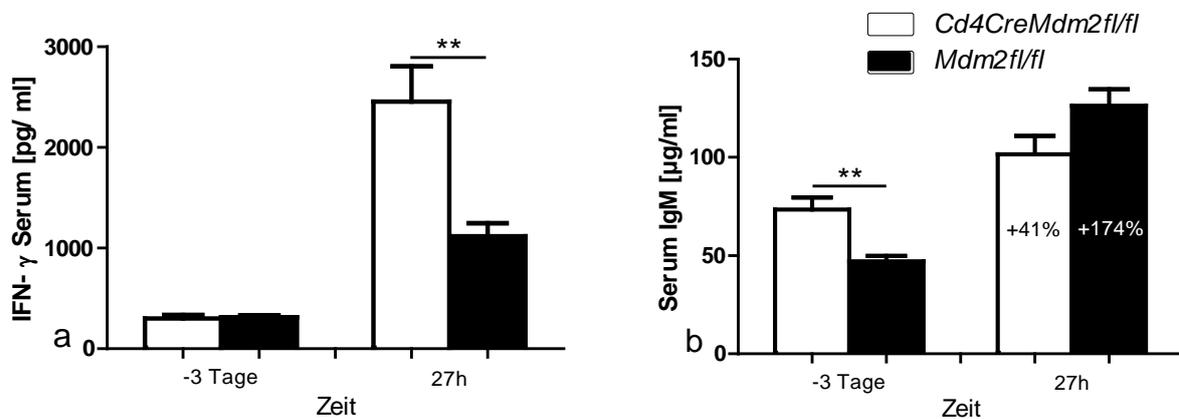


Abbildung 30: IFN- γ und IgM-Konzentrationen im Maus-Serum vor und nach dem Experiment.

Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; **p<0.01, p-Wert errechnet durch t-Test, n=6 pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

Ende des Experimentes hatten die Kontrollmäuse jedoch auch nicht signifikant höhere Konzentrationen im Serum.

Damit der Vorgang besser verstanden werden konnte, wurde das entzündungshemmende Interleukin 10 im Serum gemessen. In der Gruppe der *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse erfolgte ein Anstieg des Zytokins, während die *Mdm2^{fl/fl}*-Mäuse nur einen minimalen Anstieg aufwiesen. Obwohl der Unterschied nicht signifikant war (p=0,11), zeigte es eine Tendenz und eine eventuelle Erklärung für das bessere gesundheitliche Abschneiden der Knockoutmäuse (s. Abbildung 31).

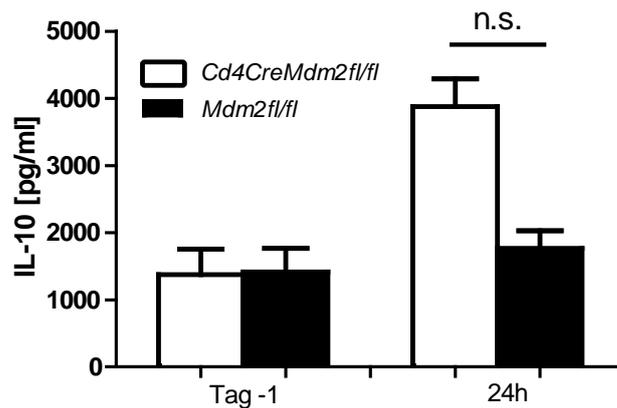


Abbildung 31: Interleukin- 10 im Serum, vor und 27h nach 150µl Anti- GBM- Serum mit Präimmunisierung.
 Daten dargestellt als Mittelwerte ± SEM; n=6 pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

Zuletzt wurde immunhistologisch versucht, inflammatorische Zellen wie Neutrophile, Makrophagen und T-Zellen für die vermehrte Nierenschädigung der *Cre*-negativen Mäuse auszumachen. Leider war jedoch umgekehrt die Anzahl der Neutrophile pro Glomerulus in den *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die restlichen Färbungen ergaben keinen Unterschied.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der Proteinurie in einer sehr frühen Phase beginnt und eine weitreichende Entzündungsreaktion nach sich zieht. Paradoxerweise ist IFN- γ in der experimentellen Gruppe vermehrt nachgewiesen worden, IL-6 und die tubulären Schädigungsmarker konnten jedoch wie erwartet in erhöhter Konzentration in den Mäusen ohne Knockout festgestellt werden. Somit wurde erneut gezeigt, dass *Mdm2*-Defizienz in CD4-Zellen einen protektiven Effekt hat, welcher sich bereits nach einem Tag deutlich zeigt.

4.6 Ohne Präimmunisierung gibt es in der frühen Phase keinen Unterschied in der Proteinurie

Die genaue Beobachtung der ersten Stunden nach Injektion wurde mit identem Setting, jedoch ohne Präimmunisierung, wiederholt. Sollten nämlich die unterschiedlichen IgM-Spiegel für die Differenz verantwortlich sein, welche sich in der Präimmunisierungsphase gebildet haben, so dürfte nun kein Unterschied im Albumin/ Kreatininverhältnis auftreten und sich die IgM-Spiegel nicht voneinander unterscheiden. Die Urinproben wurden zu gleichen Zeitpunkten abgenommen und die Gewebeproben ebenfalls nach 27h entnommen.

Wie beim Experiment mit Präimmunisierung war eine Erhöhung der Albuminurie nach 5h nachzuweisen. Bis zur 24. Stunde stieg in der Kontrollgruppe die Albuminkonzentration stetig an,

während sich bei den *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen wie im Vergleichsexperiment nach der 9. Stunde absank (s. Abbildung 32a).

Das Kreatinin im Urin stieg in beiden Gruppen konstant an (s. Abbildung 32b). Das Albumin/Kreatininverhältnis wuchs in beiden Gruppen an und zeigte keinen wesentlichen Unterschied. Interessant ist die Betrachtung der absoluten Zahlen im Vergleich zu dem Experiment mit Präimmunisierung: Sie betragen etwa ein Zehntel der Werte des Vergleichsexperiments, was auf eine weit schwächere Schädigung hindeutet (s. Abbildung 32c).

Der BUN-Wert zeigt einen signifikant größeren tubulären Schaden bei der Kontrollgruppe. Auch hier sieht man eine weniger starke Nierenläsion im Vergleich zum Experiment mit Präimmunisierung, da die Absolutwerte der Kontrollgruppe im Durchschnitt um etwa 100mg/dl niedriger waren (s. Abbildung 32d).

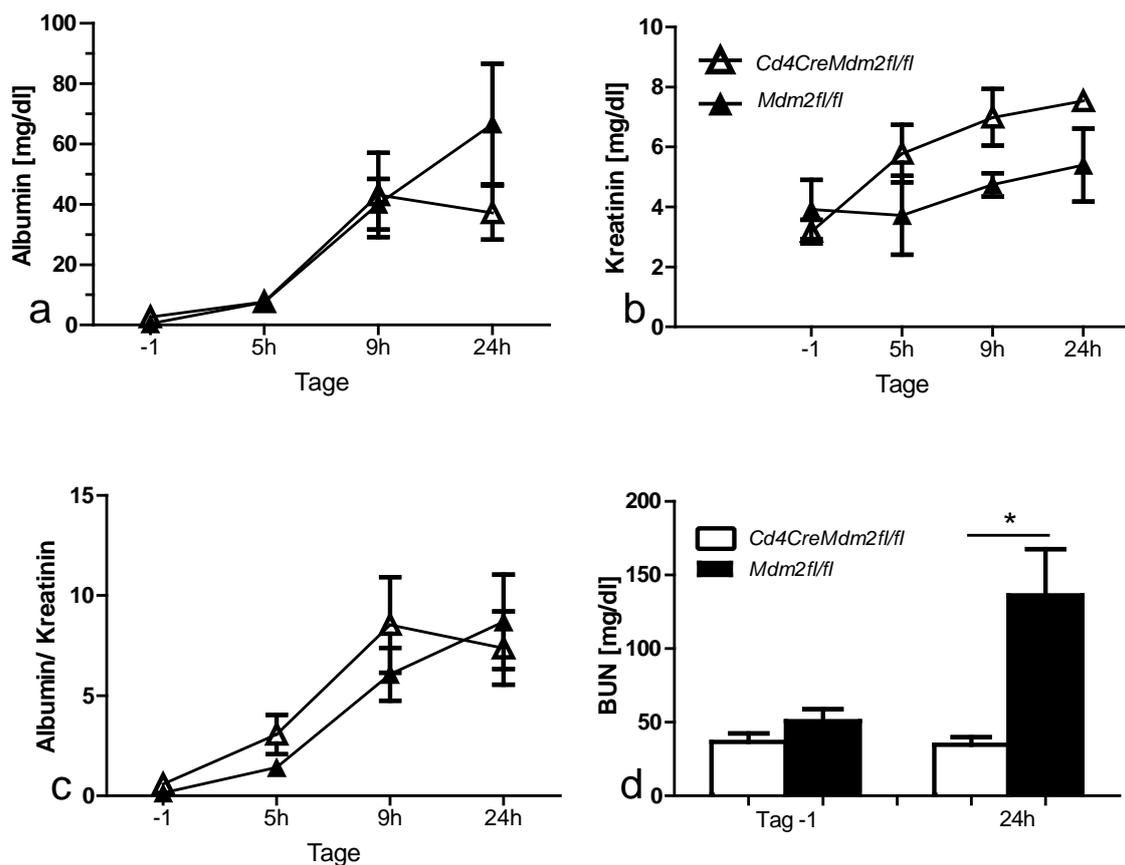


Abbildung 32: Verlauf der Albumin- und Kreatinin- Werte im Urin sowie der Serumkonzentration von Harnstoff-Stickstoff bei der 150µl- Dosis ohne Präimmunisierung.

Daten dargestellt als Mittelwerte ± SEM; *p<0.05, p-Wert errechnet durch t-Test, n=6 pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

Zum Vergleich wurde auch bei diesem Experiment ohne Präimmunisierung der Verlauf der IgM- und Interleukin-Konzentrationen im Blutserum gemessen, wobei hier keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Auch der Unterschied in der Serumkonzentration von IL-10 war nicht mehr vorhanden (s. Abbildung 33).

Nach unterlassener Immunisierung vor der Injektion des Anti-GBM-Serums konnte nun kein Unterschied in der Proteinurie nachgewiesen werden. Nur die BUN zeigte eine größere Schädigung der Mäuse mit physiologischer Zellverteilung an. Sehr markant ist zudem, dass die Werte des Albumin/ Kreatininverhältnisses etwa um den Faktor 10 geringer sind als beim Experiment mit Präimmunisierung.

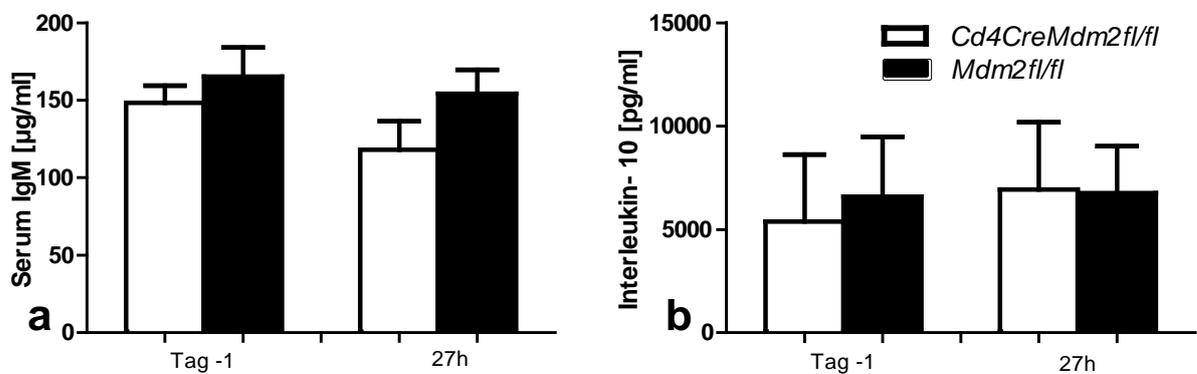


Abbildung 33: IgM- und Interleukin- 10 Konzentration im Serum, nach 150µl Anti-GBM-Serum ohne Präimmunisierung.

Daten dargestellt als Mittelwerte ± SEM; n=5 pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

4.7 CD4-Zell-Depletion durch Antikörper hat keinen Vorteil im Anti-GBM-Modell mit Präimmunisierung

Es hatte sich durch die vorangegangenen Experimente ein klares Bild ergeben: Die Knockoutmäuse haben nach einer Präimmunisierung im Anti-GBM-Modell weniger Albuminurie, bessere BUN-Werte, bessere GFR und bessere histopathologische Ergebnisse als die Vergleichsgruppe ohne Knockout. Auf der Suche nach dem Mechanismus, der die Nierenprotektion hervorruft, depletierten wir durch spezifische CD4-Antikörper die CD4-Zellen in den Cre-negativen *Mdm2^{fl/fl}*-Mäusen. Wir erhofften, durch die Depletion denselben Unterschied zu sehen, wie wir ihn zwischen den *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen und der *Mdm2^{fl/fl}*-Mäusen beobachten konnten. Die Kontrollgruppe in diesem Experiment wurde mit Isotyp-Antikörpern behandelt (s. Kapitel „Methoden“). Der Beobachtungszeitraum betrug wieder 24 Stunden. Der Erfolg der Depletion wurde durch eine Durchflusszytometrie der Splenozyten und der Blutzellen überprüft, in der die Anzahl der CD4-Zellen in der Experimentengruppe tatsächlich auf ein kaum messbares Maß von maximal 5 CD4-Zellen/ μ l gesunken war (s. Abbildung Abbildung 34).

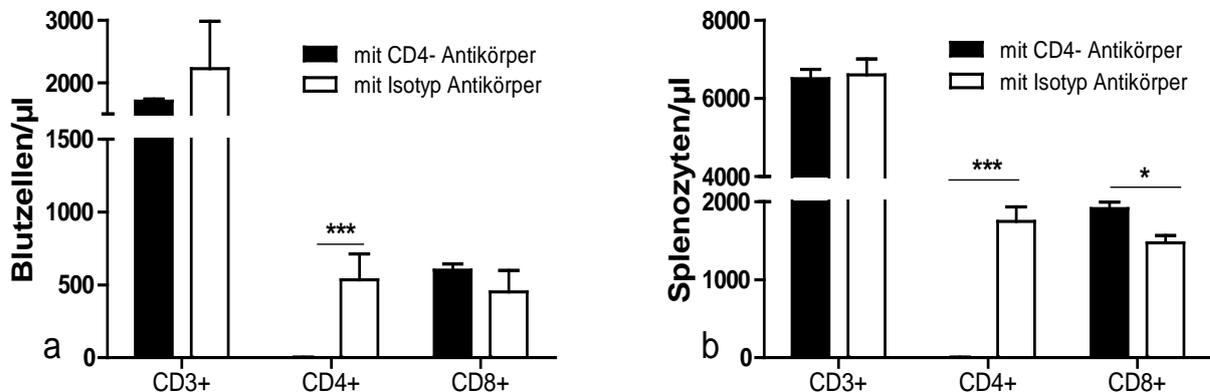


Abbildung 34: Nachweis der erfolgreichen Depletion von CD4-Zellen im Blut und in der Milz. Wesentlich in den Abbildungen ist die Depletion der *Cd4*-Zellen in der Gruppe, welche mit *Cd4*-Antikörpern behandelt wurde. In **a** erkennt man, dass im Blut die Anzahl der CD8+-Zellen sich nicht signifikant unterschieden, während in Abbildung **b** die Mäuse mit *Cd4*-Antikörper signifikant mehr CD8+-Zellen vorwies. Die Gesamtzahl der CD3+-Zellen blieb konstant. Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, p-Wert errechnet durch t-Test, $n = 6$ pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

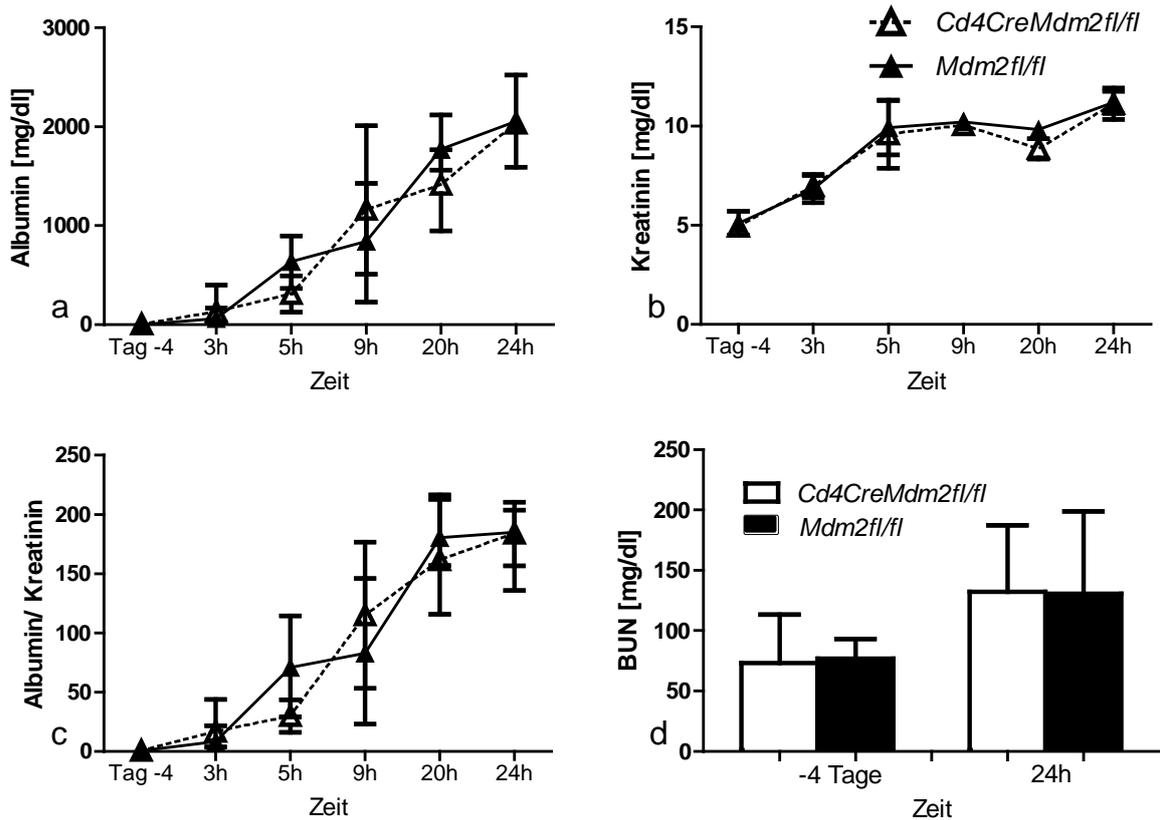


Abbildung 35: Verlauf der Albumin- und Kreatinin-Werte im Urin sowie der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Werte im CD4--Zelldepletionsmodell bei 150 μ l-Dosis Anti-GBM-Serum mit Präimmunisierung.

Daten dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=5 pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.

In der Untersuchung der Konzentrationen von Albumin sowie Kreatinin im Urin, dem Albumin/ Kreatininverhältnis und der BUN konnten leider keine Unterschiede festgestellt werden (s. Abbildung 35). Die Werte verhielten sich beinahe ident, was bedeutet, dass die Depletion von CD4-Zellen nicht denselben Effekt hat wie die lebenslange *Mdm2*-Defizienz in CD4-Zellen. Daraus schließen wir, dass die antikörperbasierte CD4-Zelldepletion keinen Vorteil im Anti-GBM-Modell bringt.

5 Diskussion

In den beschriebenen Experimenten wurden interessante Themen der Nephrologie und Immunologie untersucht. In der Hypothese gingen wir davon aus, dass *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse weniger CD4-Zellen als die *Mdm2^{fl/fl}*-Kontrollmäuse besitzen, was im Zuge der Durchflusszytometrien bestätigt wurde. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass im Anti-GBM-Modell bei den Mäusen mit *Mdm2*-Knockout in CD4-Zellen das Ausmaß der Nierenschädigung geringer ausfällt als bei der Kontrollgruppe. Die autologe Phase des Anti-GBM-Modells konnte nicht beobachtet werden. Die Hypothese, dass im Modell ohne Präimmunisierung und in der Akutphase kein Unterschied auftritt, konnte nicht belegt werden. Stattdessen wurde beispielsweise gezeigt, dass im Modell ohne Präimmunisierung eine geringere Proteinurie auftritt. Auch in der Akutphase des ersten Tages nach Seruminjektion konnte in den Experimenten ein großer Unterschied nachgewiesen werden, indem die *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse in verschiedenen Dosen von Anti-GBM-Serum eine initial geringere Proteinurie hatten, was bei genauerer Betrachtung der ersten Stunden bestätigt werden konnte. Bei der Untersuchung des detaillierten Mechanismus, welcher zu dem sichtbaren Unterschied des Krankheitsverlaufes führt, konnte durch antikörperbasierte CD4-Zelldepletion keine Differenz zwischen den Gruppen gezeigt werden. Das bedeutet, dass nicht die reine Abwesenheit der CD4-Zellen für den begünstigten Krankheitsverlauf der *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse verantwortlich ist.

Im Folgenden sollen die wichtigsten Aspekte der Ergebnisse im Detail betrachtet und mit dem aktuellen Stand der Wissenschaft diskutiert werden.

5.1 *Mdm2*-Defizienz in CD4-Zellen führt zu partieller Depletion von CD4+-T-Lymphozyten

Die Genmodifikation der verwendeten experimentellen Mäuse hat einen spannenden Phänotyp mit komplexen Modifikationen des Immunsystems und der Immunreaktion hervorgebracht. Wie sich die genaue Konstellation der Immunzellen ergeben würde, konnte aufgrund der weit verbreiteten und unterschiedlichen Expression von *Cd4* in vielen Immunzellen nicht vorhergesagt werden. Der Knockout von *Mdm2* in diesen Zellen hatte wie erwartet den Zelltod zur Folge, nachdem der „Podoptose“ genannte Zelluntergang durch Überhang von *p53* zu einer Depletion der größten *Cd4*-exprimierenden Gruppe, der CD3+CD4+-T-Lymphozyten, auf etwa ein Zehntel im Vergleich zur Kontrollgruppe geführt hat. Man kann sich durch die Funktion von *Mdm2* als Transkriptionsfaktor für NF- κ B auch einen weiteren Grund für die Depletion herleiten, da NF- κ B

auch antiapoptotisch wirkt und nun weniger davon in der Zelle vorhanden ist [144]. Des Weiteren erkennt man auch, dass der *Mdm2*-Knockout nicht zwingend zum Zelltod geführt hat. Das ist einerseits nachvollziehbar, da es nicht in allen Zellen zu einer ausreichenden Expression von *Cre* kommt. Andererseits sind es spannende Fragen, ob die verbliebenen Zellen einer bestimmten Subpopulation angehören, oder auch ob sie eine verminderte inflammatorische Aktivität zeigen, da auch NF- κ B mit MDM2 vermindert wurde.

An den gewonnenen Daten der Durchflusszytometrie sieht man, dass es eine signifikante Reduktion der CD8+-T-Lymphozyten gibt, welche vormals im CD4-CD8-doppelpositiven Stadium ebenfalls eine MDM2-Reduktion erfahren haben müssen. Bei diesem Aspekt stellt man fest, dass durch eine geringere Expression von *Cd4* das *Cre* nicht in allen Zellen in ausreichender Menge vorhanden war, um zur Apoptose zu führen, sonst hätte man eine gleichwertige Reduktion von CD8-Zellen auf ebenfalls etwa 10% des Vergleichswertes beobachtet.

CD4+-T-Helferzellen sind ein wesentlicher Bestandteil der adaptiven Immunreaktion und induzieren eine effektive Antikörperproduktion durch Plasmazellen. Auffällig in diesem Zusammenhang ist der signifikante Unterschied der IgM-Konzentrationen in den Seren zwischen den *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen und den *Mdm2^{fl/fl}*-Mäusen vor und nach den Interventionen. Es ist erwiesen, dass CD40 auf der Oberfläche von T-Zellen den Klassenwechsel von Immunglobulinen in B-Zellen durch Bindung an den CD40-Rezeptor anstoßen kann [145]. Die Konzentrationen von IgM ohne Intervention waren in den Knockout-Mäusen um 56% höher, was man auf einen gestörten Immunglobulin-Klassenwechsel zurückführen kann. In Kombination mit den geringeren IgG-Spiegeln im Blut nach Präimmunisierung und Anti-GBM-Seruminjektion kann man das Phänomen mit dem „Hyper-IgM-Syndrom“ (HIGMS) vergleichen, was eine pädiatrische Erkrankung mit erhöhten IgM- und verringerten IgG-Level darstellt, ausgelöst durch einen Gendefekt im CD40-Gen in CD4-Zellen, welches den Klassenwechsel zwischen den Antikörpern ermöglicht [146]. Durch die Exposition des Organismus mit Antigenen wird das Immunsystem auf die Probe gestellt und kann keine gute adaptive Abwehr leisten, was die Infektionsanfälligkeit der Patienten mit dem HIGMS erklärt. Eine erhöhte Infektionsanfälligkeit wurde bei den Versuchstieren jedoch aufgrund der hygienischen Haltungsbedingungen nicht beobachtet.

Bei den Experimenten konnte man feststellen, dass die Produktion von Immunglobulinen durch die Präimmunisierung der Mäuse mit Schaf-IgG und Freund-Adjuvans bei den Kontrollmäusen schneller und effektiver funktioniert als bei den partiell CD4-depletierten Tieren. Das kann man durch den verringerten stimulierenden Effekt der CD4-Helferzellen auf die Antikörperproduktion

erklären. Dadurch, dass die Depletion der T-Helferzellen nicht komplett erfolgte, war dann jedoch trotzdem eine Fähigkeit zur Produktion von Antikörpern vorhanden, wie man in den Anstiegen von IgM und IgG nach den Injektionen sieht. Die absoluten Werte waren bei den Kontrollmäusen jedoch stets immer höher.

Die Depletion der CD4-Zellen in dem Modell war ein großer Erfolg des Experiments, da es zeigte, dass der Genotyp die erwartete Konstellation der T-Zellpopulation hervorbrachte. Die damit einhergehende veränderte Verteilung der verschiedenen Antikörper konnte nicht vorhergesagt werden, war für die Interpretation der Ergebnisse jedoch ein wichtiger Bestandteil.

5.2 *Mdm2*-Defizienz in CD4-Zellen vermindert das akute Entzündungsgeschehen im Anti-GBM-Modell

Es ist bekannt, dass die allgemeine Inhibierung von MDM2 durch Nutlin-3a eine protektive Wirkung bei RPGN hat [133]. Dies kann anhand der Funktionen von MDM2 hergeleitet werden, da einerseits die p53-abhängigen Aufgaben im Zellzyklus zu einer Hyperproliferation von Nierenepithelzellen führt und eine Bildung von Halbmondformationen begünstigt. Zusätzlich hat MDM2 in Immunzellen einen antiapoptotischen Effekt, was zu einer verstärkten Immunreaktion führt. Andererseits induziert MDM2 den Entzündungsmediator NF- κ B, welcher zu Zellproliferation, Rekrutierung von Leukozyten und Verstärkung der Immunreaktion führt [116].

Ein noch unerforschtes Gebiet ist jedoch die Ausschaltung von *Mdm2* in spezifischen Zellen, um Mechanismen des Immunsystems und der RPGN besser verstehen zu können. Insgesamt passen die gefundenen Ergebnisse zu den aktuellen Konzepten von *Mdm2*-Knockout in der RPGN, da auch bei uns wie in den Experimenten von Mulay et al. eine protektive Wirkung festgestellt werden konnte. Wir folgern daraus, dass *Mdm2*-Defizienz in CD4-Zellen sowohl durch die Reduktion von CD4-Zellen als auch durch den NF- κ B-Signalweg Nierenschädigung erheblich vermindert.

In den beschriebenen Experimenten, bei denen in CD4-Zellen *Mdm2* ausgeschaltet wurde, waren sowohl akute als auch langfristige Unterschiede zwischen den *Mdm2*-Knockoutgruppe und der Kontrollgruppe in der Nierenschädigung augenscheinlich erkennbar. In der Initialphase äußerte sich der Vorteil der *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse in geringerer Proteinurie und einer schnelleren Regeneration, während sich langfristig die Kontrollmäuse sowohl in der BUN als auch histologisch schlechter verhielten.

Auch aus anderen Quellen gibt es Hinweise, dass CD4-Zellen einen großen Einfluss auf das akute Entzündungsgeschehen haben. So wurde in Nierenischämie-Modellen die Rolle von CD4-Zellen in

CD4+zelldefizienten Mäusen untersucht und gefunden, dass diese signifikant vor akutem Nierenversagen geschützt waren [147]. Um den Einfluss von CD4-Zellen zu beweisen, wurden diesen Mäusen CD4+-Zellpopulationen injiziert, wodurch der protektive Mechanismus verloren ging. Der genaue Vorgang, wie CD4-Zellen das akute Geschehen beeinflussen, konnte nicht gefunden werden, auch wenn ein Zusammenhang mit IFN- γ vermutet wird [147]. In Leberischämie-Modellen wurden CD4+-T-Lymphozyten sogar bereits 1 Stunde nach der Ischämie im Entzündungsareal nachgewiesen, wobei auch hier die genauen Mechanismen noch nicht geklärt wurden [69].

In den hier behandelten Experimenten konnte man jedenfalls durch immunhistochemische Analysen nach 27 Stunden keinen Unterschied in der Anzahl der Neutrophile, Makrophagen oder CD3+-T-Lymphozyten im Nierengewebe nachweisen. In einem Ureterobstruktionsmodell konnte nachgewiesen werden, dass durch CD4-Depletion die Fibrosierung des Tubulointerstitiums signifikant weniger ausgeprägt ist als in Kontrollgruppen. Hierbei konnte die vermehrte Expression des Kollagen-I-Gens als wahrscheinlicher Faktor für die Nierenfibrose nachgewiesen werden [148]. Wie in den Ergebnissen der durchgeführten Experimente beschrieben, konnte der langfristige Einfluss vor allem bei der Dosis von 150 μ l Anti-GBM-Serum nach 31 Tagen in der histologischen Untersuchung und in den tubulären Schädigungszeichen gezeigt werden. Die Folgen der Akutreaktion scheinen auch bei diesen Mäusen einen massiven Einfluss auf die Fibrosierung und Sklerosierung des Nierenparenchyms und der Halbmondbildung gehabt zu haben.

Eine Studie, welche besonders unsere *Conclusio* unterstreicht, dass die Inhibierung von T-Zellen Nierenschaden in autoimmunologischen Nierenerkrankungen vermindert, wurde von Reynolds et al. durchgeführt. Er und sein Team blockierten mit monoklonalen Antikörpern CD154, was von aktivierten T-Zellen exprimiert wird und als Ligand von CD40 die Immunantwort in vieler Hinsicht stimuliert. Somit wurde ein wichtiges immunostimulatorisches Signal der T-Zellen ausgeschaltet. Auch diese Mäuse wurden der nephrotoxischen Serumnephritis ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigten eine Abnahme von Antikörperproduktion und Albuminurie und eine Reduktion sowohl von glomerulärem Nierenschaden als auch von infiltrierten Immunzellen [149]. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch das Experiment von derselben Forschergruppe, in welchem das CD28-B7-Aktivierungssignal inhibiert wurde. B7 wird von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und bindet an CD28 auf T-Zellen, was die Aktivierung der T-Zellen zur Folge hat. Eine Inhibierung dieses Signales reduziert in Folge die T-Zellaktivierung, was im Anti-GBM-Modell ebenfalls zu einer

Reduktion von Nierenschaden geführt hat [150]. Leider wurden in diesen Experimenten die Urinproben nur wöchentlich abgenommen, was die frühe heterologe Phase ausblendet.

Andererseits gibt es auch eine Studie, in der CD4-Zellen eine protektive Rolle zugesprochen wird. In dieser wird eine Adriamycin-Nephropathie induziert und durch monoklonale Antikörper eine Depletion von CD4-Zellen erreicht. Hier war das Ergebnis, dass Mäuse, welche von CD4-Zellen depletiert wurden, mehr mesangialen und glomerulären Schaden davontrugen als die Kontrollgruppe, welche nicht mit dem Antikörper behandelt wurde [151]. Wie in der Einleitung beschrieben wurde, haben CD4⁺-T-Zellen nicht nur einen schädigenden, sondern durch die regulatorischen T-Zellen auch einen protektiven Effekt. Die Elimination dieser regulatorischen T-Zellen könnte in diesen Experimenten zu einer verstärkten Nierenschädigung geführt haben.

Neutrophile Granulozyten sind als Zellen des angeborenen Immunsystems bei der schnellen Immunreaktion beteiligt. Im Zuge der Experimente fiel auf, dass die MFI von CD11b auf Neutrophilen bei der Kontrollgruppe erheblich erhöht war (s. Abbildung 22e, Seite 71). CD11b, auch genannt Integrin α M, ist ein Bestandteil des Mac-1 –Zelladhäsionsproteins, welches dafür verantwortlich ist, dass sich die Zellen während der Extravasation nach dem Rolling festsetzen können [152]. CD11b kommt auf verschiedenen Zellen des angeborenen Immunsystems vor, wie Neutrophilen, Makrophagen und auch NK-Zellen. Entsprechend wichtig ist das Protein bei der Entzündungsreaktion und wird durch den Einfluss von Zytokinen, Interleukinen, TNF- α oder INF γ hochreguliert [64, 65]. Der Rezeptor für Mac-1 ist ICAM-1 auf Endothelzellen. Zelladhäsionsproteine wie Selektine und Integrine werden nach Aktivierung vermehrt exprimiert und sind wesentlicher Bestandteil der Chemotaxis. Zur positiven Regulation von CD11b sind Zytokine wie Interleukine, TNF- α oder IFN- γ notwendig, wobei einige davon von CD4-Zellen ausgeschüttet werden [153]. Dementsprechend ist eine Verringerung von CD11b bei CD4-Zelldepletion plausibel, was eine verminderte Extravasation von Neutrophilen zur Folge hätte. In den histologischen Präparaten der Niere konnten wir jedoch keine Unterschiede in der Zellzahl der Neutrophilen erkennen oder unterschiedliche Konzentrationen der verantwortlichen Zytokine messen.

In den Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass *Mdm2*-Defizienz in CD4-Zellen die erste akute Reaktion des Abwehrsystems vermindert und damit den Nierenschaden reduziert. Somit bestätigen die Ergebnisse weitgehend die pathogenetischen Theorien der RPGN und nephrotoxischen Serumnephritis. Sowohl MDM2 als auch CD4-Zellen haben einen großen Einfluss in der Zellproliferation, Halbmondbildung, sowie adaptiven Entzündungsreaktion. Als neue

Erkenntnis zählen wir die Verminderung von Nierenschaden in der Phase der angeborenen Immunreaktion durch *Mdm2*-Knockout in CD4-Zellen. Diese Entdeckung sollte durch weitere Experimente näher untersucht werden und könnte die CD4-Zellen in ein anderes, neues Licht rücken.

5.3 *Mdm2*-Defizienz in CD4-Zellen wirkt im Anti-GBM-Modell protektiv gegen tubuläre Schädigung

Die in allen Zellen exprimierte E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 hat großen Einfluss auf den Zellzyklus und Zellhomöostase, so auch in Tubulusepithelzellen, wie von Thomasova et al. gezeigt wurde. Hier wurde *in vivo* und *in vitro* *Mdm2* selektiv in Tubulusepithelzellen durch induzierbares *Cre* ausgeschaltet, was deren Podoptose und schwere Nierenfunktionseinschränkungen zur Folge hatte [131]. In den Experimenten wurde *Mdm2* nicht in den Tubulusepithelzellen, sondern in CD4-Zellen ausgeschaltet, was einen gegenteiligen, protektiven Effekt in den Tubuli hatte.

Es gab in den Ergebnissen mehrere Anzeichen für eine tubuläre Schädigung sowohl in der akuten Phase nach Injektion des Anti-GBM-Serums, als auch nachhaltig nach mehreren Wochen. In der Akutphase stieg in der Kontrollgruppe der BUN-Wert um mehr als das Dreifache an. Auch die in der qPCR gemessenen Werte der Tubulusschädigungsmarkern Kim-1 und Ngal waren im Gegensatz zur experimentellen Gruppe stark erhöht. Einen Anstieg der Kreatininkonzentration im Urin der Mäuse konnte man stets in beiden Gruppen beobachten, was akut auf eine höhere Harnkonzentrierung schließen lässt. Langfristig jedoch ging die Konzentrationsfähigkeit stetig weiter verloren und der Kreatininwert sank nach 31 Tagen auf Werte von etwa 11% der Ausgangskonzentrationen. Histologisch war ab einer Dosis von 150µl Anti-GBM-Serum nach vier Wochen eine starke tubuläre Schädigung erkennbar, geäußert durch dilatierte Tubuli und abgeflachten Tubulusepithelzellen.

Es ist bekannt, dass es durch Nephrotoxine zu einer akuten Tubulusnekrose (ATN) kommen kann [154]. Diese tritt durch hämodynamische Veränderungen und fibrosierende Vorgänge auf und führt zu einer verminderten Konzentrationsfähigkeit der Niere. Hämaturie, welche durch den glomerulären Schaden initiiert wird, führt durch eine Reihe von Vorgängen zu einer primären Schädigung von Tubulusepithelzellen. So kommt es intratubulär zu einer Freisetzung von Hämoglobin, Eisen und anderen Molekülen, welche die Zellen direkt durch oxidative Vorgänge zerstören und zusätzlich als Chemokine wirken und die Entzündungsreaktion verstärken [155]. Um die Möglichkeit der Pathogenese zu überprüfen, wurde der Urin der Mäuse zu mehreren

Zeitpunkten unter dem Mikroskop auf Hämaturie untersucht, jedoch konnte diese nicht nachgewiesen werden.

Ein weiterer bekannter Mechanismus ist die akute Tubulusnekrose durch Ischämie. Durch die endotheliale Schädigung der Glomeruluskapillaren kann der notwendige Blutfluss durch die nachgeschalteten peritubulären Kapillaren nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zur Nekrose der durch diese versorgten Tubulusepithelzellen [156]. Zusätzlich kann es durch einen Niedergang der Glomeruli zu einem sekundären Tubulusschaden kommen, da diese bei Funktionslosigkeit atrophieren. Durch diese Reaktionskette kann auch die nachhaltige weitere Fibrosierung des Niereninterstitiums erklärt werden.

Aus diesen Theorien kann man ableiten, dass durch die verringerte Nierenschädigung der *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse eine geringere kapilläre Endothelschädigung einer Ischämie der Tubulusepithelzellen vorbeugt. Dadurch wurden in Folge auch sekundär weniger Tubuli durch Glomerulosklerose zur Aufgabe gezwungen.

5.4 Die Immunkomplexnephritis konnte im Verlauf nicht nachgewiesen werden

Nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis durch Anti-GBM-Immunglobuline hat man nach einigen Tagen die Bildung von Immunkomplexen erwartet, welche sich in der Niere ablagern, und zu einer Immunkomplexnephritis führen, welche durch Komplementaktivierung und Zutun anderer Mediatoren zu einem Anstieg der Proteinurie führt. Durch die Immunreaktion und Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen wurde eine messbare Reaktion auf die Nieren mit Zeichen einer RPGN erwartet. Physiologisch werden Immunkomplexe, welche sich innerhalb des Gefäßsystems bilden, relativ rasch vom mononukleären Phagozytensystem eliminiert, jedoch können sich durch Antikörperüberschuss schwer lösliche Komplexe bilden, die eine Nephritis auslösen. Es ist beschrieben, dass sich die Alteration der Nieren erst bei einer anhaltenden Immunkomplexämie zeigt [157].

Die fehlende Auslösung dieser Nephritis könnte an verschiedenen Stationen der dazu erforderlichen Kette gelegen haben. Beispielsweise könnte die Immunkomplexbildung nicht ausgeprägt oder anhaltend genug gewesen sein, weshalb jedoch stets Freund Adjuvans als Immunbooster bei der Präimmunisierung hinzugefügt wurde. Das Phänomen, dass die autologe Phase mit Immunkomplexnephritis nicht auftritt, wurde von einer Forschergruppe bereits beobachtet. Hier wurden *Cd28*-Knockoutmäuse im Anti-GBM-Modell untersucht und es wurde festgestellt, dass die fehlende Stimulation von Liganden von CD28 eine Immunkomplexnephritis

verhindert [158] (vgl. Abbildung 6, T-Zellaktivierung). Durch die Reduktion von CD4-Zellen könnte bei den *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäusen ein ähnlicher Mechanismus dafür verantwortlich gewesen sein, was jedoch das fehlende Auftreten der autologen Phase in der Kontrollgruppe nicht erklärt. Die veränderte Immunkonstellation in den Knockoutmäusen könnte ebenfalls eine Rolle gespielt haben, wie auch ein vorzeitiger Verbrauch der für die Entzündungsreaktion benötigten Faktoren, welche in der akuten Entzündungsphase sicherlich massiv in Anspruch genommen wurden. Schließlich konnte die Immunkomplexnephritis nach mehrfachen Versuchen nicht nachgewiesen werden, wodurch der Fokus auf die heftige rasche, heterologe Immunreaktion gelegt wurde. Im Vergleich der Experimente mit Präimmunisierung beobachtete man, dass ohne Präimmunisierung das Albumin/ Kreatininverhältnis nur etwa ein Zehntel des Ausmaßes in der akuten Phase der Immunreaktion in den ersten Tagen nach Antikörperinjektion angenommen hat. Die Präimmunisierung bewirkte eine Aktivierung des Abwehrsystems, verstärkt durch das Freund Adjuvans, welches durch abgetötete Mykobakterien das Immunsystem zusätzlich stimuliert. Durch die Injektion des Anti-GBM-Serums fluten Antikörper in die Niere und binden an die Basalmembran. Das Immunsystem, welches sich bereits in einem Aktivierungszustand auf höchstem Niveau befindet, zerstört mit Komplementfaktoren und Immunzellen die Glomeruli. Es erscheint daher verständlich, dass sich die Nierenschädigung ohne Präimmunisierung nicht so stark ausgeprägt hat.

5.5 MDM2-Inhibitoren sind erfolgsversprechend, therapeutisch bei RPGN eingesetzt zu werden

MDM2 wurde vor allem durch seine Rolle in Tumoren als therapeutisches Ziel erkannt. Auch in der Nephrologie wurde in tierexperimentellen Studien die Inhibierung von MDM2 als Therapieform bei Nierenerkrankungen wie der RPGN entdeckt. Hierzu wurden MDM2-Inhibitoren entwickelt, welche in Studien getestet wurden. Leider bewährten sich nur wenige Substanzen wegen zu geringer Affinität, Bioverfügbarkeit oder toxischer Nebenwirkungen, sodass nur selten die klinische Phase erreicht wurde [159].

Prinzipiell eignet sich die Therapie mit MDM2-Inhibitoren zur Bekämpfung der RPGN, wie Mulay et al. in Experimenten mit dem Inhibitor Nutlin-3a gezeigt hat. Die klinischen Studien zu der Substanz sind zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch im Gange.

Die selektive Inhibierung von MDM2 in CD4-Zellen ist nach heutigem Stand der Pharmakologie nicht möglich und spielt dadurch keine Rolle als Therapiemöglichkeit. Stattdessen ist die Anti-CD4-Therapie zu berücksichtigen, da ein wesentlicher Effekt des Genotyps der Versuchstiere die CD4-

Depletion war. CD4 ist schon lange im Visier von Forschern als mögliches Ziel zur Bekämpfung von immunologischen Erkrankungen und Abstoßungsreaktionen. Es wurden monoklonale CD4-Antikörper mit immunsuppressiver Wirkung in verschiedenen Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis, Multiplen Sklerose, Lupus erythematosus oder Psoriasis mit enttäuschenden Ergebnissen getestet [160]. Bei nierentransplantierten Patienten wurde mit verschiedenen CD4-Antikörpern versucht, eine Abstoßungsreaktion zu verhindern [161]. Diese Ansätze konnten jedoch keinen langfristigen Erfolg bewirken. Dann versuchte man, Therapieprotokolle und Dosierungen zu finden, welche zu einer besseren Wirksamkeit führen sollen [162]. Im Experiment, in dem eine CD4-Depletion durch einen monoklonalen CD4-Antikörper erreicht wurde, konnte man ebenfalls keinen Vorteil in der nephrotoxischen Serumnephritis sehen. In modernen Therapien immunologischer Erkrankungen spielt diese Therapie jedenfalls keine Rolle, da breitere immunsuppressive Therapien zur Verfügung stehen, welche oft kostengünstiger und unkomplizierter zum klinischen Erfolg führen. Auch beim Experiment, bei dem antikörperbasiert die CD4-Zellen erfolgreich depletiert wurden, konnte der Erfolg der vorherigen Experimente mit CD4-Zelldepletion durch *Mdm2*-Knockout nicht reproduziert werden. Aufgrund der vielen gescheiterten klinischen Versuche, mit Antikörpern CD4-vermittelte Immunreaktionen zu vermindern, ist das Ergebnis des durchgeführten Experimentes mit den beschriebenen Aspekten zu interpretieren.

Zusammenfassend kann die Inhibierung von MDM2 eine aussichtsreiche Therapie der RPGN darstellen. Da die Depletion von CD4 mit monoklonalen Antikörpern zur Immunsuppression in mehreren Studien nicht zum Erfolg geführt hat, ist eine Therapie damit kritisch zu beäugen. Hierfür müssten neue Antikörper entwickelt und präzise Protokolle entwickelt werden, damit ein langfristiger Erfolg möglich wäre.

5.6 Limitationen der Studie

Für die Interpretation der Ergebnisse gelten Beschränkungen und sollten somit als Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen angesehen werden und nicht als die Basis für abschließende Erkenntnisse. Aufgrund Verwendung eines Maus-Modells lassen die Ergebnisse nur eingeschränkte Rückschlüsse auf den Menschen zu.

Beim verwendeten *Cre/loxP*-Rekombinationssystem ist es der Methode geschuldet, dass ein vollständiger Knockout von *Mdm2* nicht möglich ist, was dementsprechend Einfluss auf die durchgeführten Experimente hatte. Es konnte keine vollständige Depletion der CD4-Zellen

erfolgen, die Zellzahl wurde auf etwa ein Zehntel der Vergleichsgruppe reduziert. Der Genotyp hatte aufgrund der konstitutiven Expression von *Cre* auch Einfluss auf die immunologische Entwicklung der Versuchstiere von Beginn an. Alternative Knockoutmethoden wie induzierbares *Cre* durch Doxycyclin oder Tamoxifen standen nicht zur Verfügung.

Um eine reinerbige Nachkommenschaft zu gewährleisten, wurden Mäuse aller Verwandtschaftsgrade miteinander verpaart, was zur Ausbildung einer Inzuchtlinie führte und nicht den natürlichen Umständen der Mäuse entspricht. Dies kann zur Verstärkung von genetischen Merkmalen führen sowie zur Ausbildung von unterschiedlichen genetischen Erkrankungen und Verhaltensweisen.

Die Versuchstiere wurden, wie in den Methoden bereits beschrieben, unter spezifisch pathogenfreien Verhältnissen gezüchtet und gehalten. Dies führt aufgrund der Bedingungen und dem verminderten Kontakt zu Antigenen zu einer Unterentwicklung des Immunsystems, welches besonders anfällig für fremde Antigene wird [163]. Dadurch können Immunreaktionen dieser Tiere nur begrenzt auf ihre natürlichen Artgenossen übertragen werden. Möglicherweise hätte eine Verwendung von Mäusen, welche nicht in einer pathogenfreien Umwelt aufgewachsen sind, Ergebnisse gebracht, welche besser mit den natürlichen Gegebenheiten vergleichbar wären.

Die nephrotoxische Serumnephritis ist ein Modell, welches durch ihre unterschiedlichen Krankheitsphasen eine RPGN Typ 1 und Typ 2 repräsentiert. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die injizierten Antikörper nicht vom eigenen Organismus stammen, sondern von einer anderen Spezies. Die Antikörper, welche an die glomeruläre Basalmembran binden, können durch unterschiedliche Epitope der Immunglobuline das Immunsystem (z.B. Komplementfaktoren) auf eine differente Art und Weise aktivieren. In den Tieren fand entsprechend auch kein Toleranzverlust statt, wie es bei RPGN autoimmuner Genese der Fall ist. Somit ist das Modell nur unter Vorbehalt mit einer Erkrankung autoimmuner Genese zu interpretieren. Des Weiteren wurde beim Modell mit Präimmunisierung Freund's Adjuvans injiziert, welches durch Antigene von Mykoplasmen die Immunreaktion zusätzlich potenziert.

Mdm2 hat aufgrund von p53-unabhängigen Funktionen als Transkriptionsfaktor von NF- κ B auch einen wesentlichen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen in Zellen. Ein Knockout von *Mdm2* hat entsprechende immunsupprimierende Effekte, welche in den beschriebenen Experimenten nicht spezifisch untersucht und differenziert wurden.

Die Immunkomplexnephritis könnte durch andere Methoden als das Anti-GBM-Modell induziert (z.B. mit Bovine Serum Albumin) und der Einfluss von CD4⁺-T-Zellen auf die Krankheit untersucht

werden. Zur Untersuchung der Funktion von CD4⁺-T-Zellen in der akuten Entzündungsreaktion empfiehlt sich ein Modell in der Zellkultur und ein weiteres In-vitro-Modell mit CD4-Antikörpern oder anderen CD4-Knockout-Modellen sowie breitere Untersuchungsmethoden mit Messung der Komplementfaktoren und weiterer Zytokine.

Die Zahl der Versuchstiere pro Gruppe erlaubt die Erkennung von Unterschieden nur ab 1,5 SD hinsichtlich der Proteinurie. Es muss angenommen werden, dass geringere Unterschiede übersehen wurden und nur mit Hilfe größerer Gruppengrößen erkennbar würden. Hierfür lag keine behördliche Genehmigung vor.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In den beschriebenen Experimenten wurden *Cd4CreMdm2^{fl/fl}*-Mäuse mit *Mdm2^{fl/fl}*-Mäusen verglichen. Der Genotyp *Cd4CreMdm2^{fl/fl}* der Experimentengruppe führte zu einer Depletion der CD4+-T-Zellen auf etwa ein Zehntel. Hingegen wurden in der Durchflusszytometrie signifikant mehr Makrophagen gezählt.

Bei den Mäusen wurde eine nephrotoxische Serumnephritis durch Injektion von Anti-GBM-Serum induziert. Bei Vorexperimenten konnte man bei *Mdm2*-defizienten Mäusen bereits einen protektiven Mechanismus bei der RPGN nachweisen [133]. In unseren Experimenten konnte im Modell mit Präimmunisierung die autologe Immunkomplexnephritis nicht beobachtet werden. Dafür wurde überraschend eine starke Albuminurie in den ersten Stunden nach Injektion von Anti-GBM-Serum beobachtet, welche jedoch in der Experimentengruppe signifikant geringer ausfiel. Zudem wurden eine schnellere Regeneration der Nierenfunktion und histologisch erheblich geringere morphologische Schädigungen entdeckt.

Im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis ohne Präimmunisierung war das Ausmaß der Nierenschädigung sehr viel geringer als im Modell mit Präimmunisierung, aber auch hier konnte festgestellt werden, dass die Knockoutmäuse gesünder waren als die der Vergleichsgruppe.

Um das Phänomen, bei dem die Mäuse eine hohe Proteinurie innerhalb der ersten Stunden entwickeln, genauer zu beobachten, wurde der Beobachtungszeitraum der Mäuse auf etwa einen Tag verkürzt und in dieser Zeit mehrmals Urinproben genommen. Hier konnte man sehen, dass der Anstieg der Albuminurie innerhalb der ersten 5 Stunden beginnt. Zusätzlich bestätigte sich, dass die Knockoutmäuse durch einen protektiven Mechanismus weniger Nierenschaden erleiden. Man konnte beobachten, dass sich die Konzentration von IgM bei beiden Gruppen erstaunlich schnell während der Präimmunisierungsphase erhöht, und dass diese in der Kontrollgruppe viel stärker anwächst.

Um zu sehen, ob die Depletion der CD4-Zellen für den protektiven Effekt verantwortlich ist, wurden diese Zellen durch einen spezifischen CD4-Antikörper aus einer Gruppe von Mäusen ohne Knockout vermindert. Diese Gruppe wurde mit einer weiteren Gruppe mit physiologischer Zellverteilung ebenfalls im Anti-GBM-Modell verglichen, wobei man keinen Unterschied feststellen konnte.

Durch die Experimente konnte gezeigt werden, dass *Mdm2*-Defizienz in CD4-Zellen einen protektiven Mechanismus hat und die Mäuse weniger Nierenschaden im Sinne von Proteinurie, GFR, Harnstoffelimination und auch langfristig durch die Bildung von Halbmondformationen und

Nierenfibrose haben. Damit konnten die Ergebnisse von Vorarbeiten zu *Mdm2*-Knockout bestätigt werden. Die p53-abhängigen und -unabhängigen Funktionen von MDM2 durch die Regulation von NF- κ B führen tatsächlich zu einer verminderten Immunantwort und verstärken den Nierenschaden bei immunologischen Nierenerkrankungen. Es ist spannend, welche Funktionen CD4-Zellen im Immunsystem übernehmen und welchen Einfluss sie in der frühen Phase der Entzündungsreaktion haben. Aufgrund von Studien in der Vergangenheit ist aktuell der Einsatz und Erfolg von CD4-Depletion bei immunologischen Nierenerkrankungen unwahrscheinlich. Der Einsatz von MDM2-Inhibitoren, allen voran Nutlin-3a, ist in der Phase von klinischen Studien angelangt und wird eventuell in den folgenden Jahren im klinischen Alltag benutzt werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANV	Akutes Nierenversagen
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATN	Akute Tubulusnekrose
BSA	Bovine Serum Albumin
BUN	Blood Urea Nitrogen
CCL5	CC-Chemokine Ligand 5
CD	Cluster of Differentiation
Cre	Causes Recombination
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAPK	DNA-Dependent Protein Kinase
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Essay
FACS	Flourescence Activated Cell Sorting
Fab	Fragment Antigen Binding
FBS	Fetales bovines Serum
Fc	Fragment Crystallizable Region
FSC	Forward Scatter
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSGS	Fokale segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomerular Basal Membrane
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HRP	Horseraddish Peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
i.v.	Intravenös
i.p.	Intraperitoneal
LoxP	Locus of X Over P1

MDM2	Murine Double Minute 2
MCGN	Minimal Change Glomerulonephritis
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
NF κ B	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells
NHPS1	Nephrotic Syndrome Type 1
PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphate Buffer Saline
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RPGN	Rapid progressive Glomerulonephritis
SSC	Side Scatter
TAC	Trisammoniumchlorid
TCR	T-Cell Receptor
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Th	T-Helper Cell
TSA	Tissue Specific Antigens
WAF1/ CIP1	Proteinkomplex p21
wt	Wildtyp

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die glomeruläre Filtrationsbarriere.....	4
Abbildung 2: Verschiedene Ursachen für das akute Nierenversagen.....	7
Abbildung 3: Halbmondbildung des Glomerulus.....	9
Abbildung 4: Die Nephrotoxische Serumnephritis.....	11
Abbildung 5: B-Zell-Aktivierung.....	13
Abbildung 6: T-Zellaktivierung.....	14
Abbildung 7: Positive und negative Selektion der T-Zellen im Thymus.....	16
Abbildung 8: Die Regulationsmechanismen von MDM2 und p53.....	23
Abbildung 9: Das Cre-Lox-System am Beispiel von <i>Cd4CreMdm2^{fl/fl}</i>	38
Abbildung 10: Auswertung der Gelelektrophorese für die Gene <i>Mdm2^{fl/fl}</i> und <i>Cd4Cre</i>	41
Abbildung 11: Das Prinzip des Sandwich-ELISA.....	52
Abbildung 12: Die Funktionsweise der Durchflusszytometrie.....	55
Abbildung 13: Die Gating-Strategie für Zytometrieanalysen in der Zweiparameterdarstellung.....	55
Abbildung 14: Ergebnisse der Durchflusszytometrie von naiven Splenozyten.....	62
Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von Schaf-IgG 28 Stunden nach Injektion von 150µl Anti-GBM-Serum.....	63
Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von Schaf- IgG 31 Tage nach Injektion von 150µl Anti- GBM- Serum.....	64
Abbildung 17: Verlauf der Albumin- und Kreatinin-Werte im Urin sowie der Blut-Harnstoff-Stickstoffwerte bei der 150µl-Dosis mit Präimmunisierung.....	66
Abbildung 18: Gewebsschnitte der Nieren, 31 Tage nach Injektion von 150µl Anti-GBM-Serum.....	67
Abbildung 19: Auftreten von Halbmondformationen und Glomerulosklerose im Vergleich.....	68
Abbildung 20: Podozytenverlust in den Glomeruli.....	68
Abbildung 21: Verlauf der Albumin- und Kreatinin- Werte im Urin sowie der INF- γ-Serumkonzentrationen bei 100µl Anti- GBM- Serum mit Präimmunisierung.....	70
Abbildung 22: Zellanalyse von aktivierten und nicht aktivierten Splenozyten nach der Injektion von 100µl Anti- GBM Serum.....	71
Abbildung 23: Verlauf der Albumin- und Kreatinin-Werte im Urin sowie der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Werte bei der 200µl-Dosis mit Präimmunisierung.....	73
Abbildung 24: Absolute und relative Werte der GFR-Messungen im Verlauf nach Injektion von 200µl Anti-GBM-Serum mit Präimmunisierung.....	74

Abbildung 25: Gewebsschnitte der Nieren, 21 Tage nach Injektion von 200µl Anti-GBM-Serum.	75
Abbildung 26: Verlauf der Albumin- und Kreatinin-Werte im Urin bei der 100µl- Dosis ohne Präimmunisierung. Daten dargestellt als Mittelwerte ± SEM; *p<0.05, **p<0.01, p-Wert errechnet durch t-Test, n=10 pro Gruppe, Anzahl der Experimente: 1.....	77
Abbildung 27: Verlauf der Albumin- und Kreatinin- Werte im Urin sowie der GFR bei der 200µl-Dosis ohne Präimmunisierung.	78
Abbildung 28: Verlauf der Albumin- und Kreatinin-Werte im Urin sowie der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Werte bei der 150µl-Dosis mit Präimmunisierung.	80
Abbildung 29: Die Ergebnisse der quantitativen PCR, 27h nach Injektion.	81
Abbildung 30: IFN-γ und IgM-Konzentrationen im Maus-Serum vor und nach dem Experiment.	82
Abbildung 31: Interleukin- 10 im Serum, vor und 27h nach 150µl Anti- GBM- Serum mit Präimmunisierung.	83
Abbildung 32: Verlauf der Albumin- und Kreatinin- Werte im Urin sowie der Serumkonzentration von Harnstoff-Stickstoff bei der 150µl- Dosis ohne Präimmunisierung.	84
Abbildung 33: IgM- und Interleukin- 10 Konzentration im Serum, nach 150µl Anti-GBM-Serum ohne Präimmunisierung.	85
Abbildung 34: Nachweis der erfolgreichen Depletion von CD4-Zellen im Blut und in der Milz. ...	86
Abbildung 35: Verlauf der Albumin- und Kreatinin-Werte im Urin sowie der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Werte im CD4--Zelldepletionsmodell bei 150µl-Dosis Anti-GBM-Serum mit Präimmunisierung.	87

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer	34
Tabelle 2: Die Flourophor-konjugierten Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	36
Tabelle 3: Immunohistologische Antikörper	36
Tabelle 4: Die Sequenzen der Primer für die Überprüfung auf <i>Cd4Cre</i> und <i>Flp</i>	39
Tabelle 5: Anzahl der Basenpaare der jeweiligen PCR-Produkte.....	39
Tabelle 6: Die Sequenzen der verwendeten Primer für die Überprüfung auf <i>Mdm2</i>	40

10 Referenzen

1. Liano, F. and J. Pascual, *Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study*. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int*, 1996. **50**(3): p. 811-8.
2. Lea, P.J., et al., *Tridimensional ultrastructure of glomerular capillary endothelium revealed by high-resolution scanning electron microscopy*. *Microvasc Res*, 1989. **38**(3): p. 296-308.
3. Reitsma, S., et al., *The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization*. *Pflugers Arch*, 2007. **454**(3): p. 345-59.
4. Grumbach, I.M., et al., *A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription*. *J Mol Cell Cardiol*, 2005. **39**(4): p. 595-603.
5. Miner, J.H., *Building the glomerulus: a matricentric view*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(4): p. 857-61.
6. Abrahamson, D.R., *Role of the podocyte (and glomerular endothelium) in building the GBM*. *Semin Nephrol*, 2012. **32**(4): p. 342-9.
7. Sariola, H., et al., *Dual origin of glomerular basement membrane*. *Dev Biol*, 1984. **101**(1): p. 86-96.
8. St John, P.L. and D.R. Abrahamson, *Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and -11 chains*. *Kidney Int*, 2001. **60**(3): p. 1037-46.
9. Suh, J.H. and J.H. Miner, *The glomerular basement membrane as a barrier to albumin*. *Nat Rev Nephrol*, 2013. **9**(8): p. 470-7.
10. Fukasawa, H., et al., *Slit diaphragms contain tight junction proteins*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(7): p. 1491-503.
11. Schlondorff, J., *Nephrin AKTs on actin: The slit diaphragm-actin cytoskeleton signaling network expands*. *Kidney Int*, 2008. **73**(5): p. 524-6.
12. Siew, E.D. and A. Davenport, *The growth of acute kidney injury: a rising tide or just closer attention to detail?* *Kidney Int*, 2015. **87**(1): p. 46-61.
13. Nephrologie, D.G.f. 2017; Available from: <https://www.dgfn.eu/nephrologische-diagnosen.html>.
14. Fry, A.C.F.K., *Management of acute renal failure*. *Postgrad Med J*, 2006. **82**(964): p. 106-116.
15. Rewa, O. and S.M. Bagshaw, *Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics*. *Nat Rev Nephrol*, 2014. **10**(4): p. 193-207.
16. Hoste, E.A. and M. Schurgers, *Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem?* *Crit Care Med*, 2008. **36**(4 Suppl): p. S146-51.
17. Murugan, R. and J.A. Kellum, *Acute kidney injury: what's the prognosis?* *Nat Rev Nephrol*, 2011. **7**(4): p. 209-17.
18. Valette, X. and D. du Cheyron, *A critical appraisal of the accuracy of the RIFLE and AKIN classifications in defining "acute kidney insufficiency" in critically ill patients*. *J Crit Care*, 2013. **28**(2): p. 116-25.
19. Ali, T., et al., *Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(4): p. 1292-8.
20. Bellomo, R., et al., *Acute kidney injury in sepsis*. *Intensive Care Med*, 2017. **43**(6): p. 816-828.
21. Qian, Q., et al., *Hemolysis and acute kidney failure*. *Am J Kidney Dis*, 2010. **56**(4): p. 780-4.
22. Krauss, B., *[Kidney function and prostatic disease in the aged]*. *Z Gerontol*, 1981. **14**(5): p. 339-53.
23. Kellum, J.A. and N. Lameire, *Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1)*. *Crit Care*, 2013. **17**(1): p. 204.
24. Ricci, Z., D. Cruz, and C. Ronco, *The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review*. *Kidney Int*, 2008. **73**(5): p. 538-46.
25. Mathieson, P.W., *The ins and outs of glomerular crescent formation*. *Clin Exp Immunol*, 1997. **110**(2): p. 155-7.
26. Shankland, S.J., et al., *The emergence of the glomerular parietal epithelial cell*. *Nat Rev Nephrol*, 2014. **10**(3): p. 158-73.

27. Ryu, M., et al., *Plasma leakage through glomerular basement membrane ruptures triggers the proliferation of parietal epithelial cells and crescent formation in non-inflammatory glomerular injury*. J Pathol, 2012. **228**(4): p. 482-94.
28. Fresquet, M., et al., *Identification of a major epitope recognized by PLA2R autoantibodies in primary membranous nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(2): p. 302-13.
29. Ricklin, D., E.S. Reis, and J.D. Lambris, *Complement in disease: a defence system turning offensive*. Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(7): p. 383-401.
30. Rodriguez-Iturbe, B. and M. Haas, *Post-Streptococcal Glomerulonephritis*, in *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*, J.J. Ferretti, D.L. Stevens, and V.A. Fischetti, Editors. 2016, The University of Oklahoma Health Sciences Center.: Oklahoma City OK.
31. Suzuki, H., et al., *The pathophysiology of IgA nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(10): p. 1795-803.
32. Berthoux, F., et al., *Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(9): p. 1579-87.
33. Ebefors, K., et al., *Mesangial cells from patients with IgA nephropathy have increased susceptibility to galactose-deficient IgA1*. BMC Nephrol, 2016. **17**: p. 40.
34. Berthoux, F., et al., *Predicting the risk for dialysis or death in IgA nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(4): p. 752-61.
35. Schwartz, N., B. Goilav, and C. Putterman, *The pathogenesis, diagnosis and treatment of lupus nephritis*. Curr Opin Rheumatol, 2014. **26**(5): p. 502-9.
36. Hellmark, T. and M. Segelmark, *Diagnosis and classification of Goodpasture's disease (anti-GBM)*. J Autoimmun, 2014. **48-49**: p. 108-12.
37. Alchi, B., et al., *Predictors of renal and patient outcomes in anti-GBM disease: clinicopathologic analysis of a two-centre cohort*. Nephrol Dial Transplant, 2015. **30**(5): p. 814-21.
38. Lerner, R.A., R.J. Glassock, and F.J. Dixon, *The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis*. J Exp Med, 1967. **126**(6): p. 989-1004.
39. Luo, W., et al., *Alport alloantibodies but not Goodpasture autoantibodies induce murine glomerulonephritis: protection by quinary crosslinks locking cryptic alpha3(IV) collagen autoepitopes in vivo*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3520-8.
40. Pusey, C.D., *Anti-glomerular basement membrane disease*. Kidney Int, 2003. **64**(4): p. 1535-50.
41. Escolar Castellon, J.D., et al., *The modifications produced in allergic alveolitis and in Goodpasture's syndrome due to exposure to cigarette smoke*. Histol Histopathol, 1991. **6**(4): p. 535-47.
42. Lahmer, T., *A rare autoimmune disorder affecting the kidney and the lung*. Autoimmunity Reviews, 2012. **Volume 12**(Issue 2): p. 169-173.
43. Khoshnoodi, J., V. Pedchenko, and B.G. Hudson, *Mammalian collagen IV*. Microsc Res Tech, 2008. **71**(5): p. 357-70.
44. Fischer, E.G. and D.J. Lager, *Anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis: a morphologic study of 80 cases*. Am J Clin Pathol, 2006. **125**(3): p. 445-50.
45. Salama, A.D., et al., *Goodpasture's disease*. Lancet, 2001. **358**(9285): p. 917-20.
46. Johnson, J.P., et al., *Plasmapheresis and immunosuppressive agents in antibasement membrane antibody-induced Goodpasture's syndrome*. Am J Med, 1978. **64**(2): p. 354-9.
47. Daniels, M.A., et al., *Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling*. Nature, 2006. **444**(7120): p. 724-9.
48. Anderson, M.S. and M.A. Su, *Aire and T cell development*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(2): p. 198-206.
49. Sarang, Z., et al., *Macrophages engulfing apoptotic thymocytes produce retinoids to promote selection, differentiation, removal and replacement of double positive thymocytes*. Immunobiology, 2013. **218**(11): p. 1354-60.
50. Luckheeram, R.V., et al., *CD4(+)T cells: differentiation and functions*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 925135.
51. Tuulasvaara, A., et al., *Interleukin-7 promotes human regulatory T cell development at the CD4+CD8+ double-positive thymocyte stage*. J Leukoc Biol, 2016.

52. Guy-Grand, D., et al., *Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice*. J Exp Med, 2003. **197**(3): p. 333-41.
53. Blais, M.E., et al., *Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2299-312.
54. Rocha, B., P. Vassalli, and D. Guy-Grand, *The extrathymic T-cell development pathway*. Immunol Today, 1992. **13**(11): p. 449-54.
55. Stahl, E.C. and B.N. Brown, *Cell Therapy Strategies to Combat Immunosenescence*. Organogenesis, 2015. **11**(4): p. 159-72.
56. Behrens, G., et al., *Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(1): p. 84-90.
57. Del Prete, G., *Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy*. Allergy, 1992. **47**(5): p. 450-5.
58. Annunziato, F., et al., *Human T helper type 1 dichotomy: origin, phenotype and biological activities*. Immunology, 2015. **144**(3): p. 343-351.
59. Steinke, J.W. and L. Borish, *Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists*. Respir Res, 2001. **2**(2): p. 66-70.
60. Takatsu, K., *Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2011. **87**(8): p. 463-85.
61. Couper, K.N., D.G. Blount, and E.M. Riley, *IL-10: the master regulator of immunity to infection*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5771-7.
62. Moseley, T.A., et al., *Interleukin-17 family and IL-17 receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(2): p. 155-74.
63. Sakaguchi, S., et al., *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 8-27.
64. Pelletier, M., et al., *Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells*. Blood, 2010. **115**(2): p. 335-43.
65. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 519-31.
66. Li, L., et al., *The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury*. Kidney Int, 2008. **74**(12): p. 1526-37.
67. Bonventre, J.V., *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury*. 2011. **121**(11): p. 4210-21.
68. Anders, H.J. and L. Schaefer, *Beyond Tissue Injury—Damage-Associated Molecular Patterns, Toll-Like Receptors, and Inflammasomes Also Drive Regeneration and Fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(7): p. 1387-400.
69. Kinsey, G.R. and M.D. Okusa, *Expanding role of T cells in acute kidney injury*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014. **23**(1): p. 9-16.
70. Kinsey, G.R., et al., *Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(8): p. 1744-53.
71. Brunstein, C.G., et al., *Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics*. Blood, 2011. **117**(3): p. 1061-70.
72. Tipping, P.G. and S.R. Holdsworth, *T cells in crescentic glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(5): p. 1253-63.
73. Kitching, A.R., et al., *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, 2005. **16**(7): p. 2023-33.
74. Kitching, A.R., S.R. Holdsworth, and P.G. Tipping, *IFN-gamma mediates crescent formation and cell-mediated immune injury in murine glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(4): p. 752-9.
75. Huang, X.R., et al., *Mechanisms of T cell-induced glomerular injury in anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in rats*. Clin Exp Immunol, 1997. **109**(1): p. 134-42.

76. Singh, R.R., et al., *Differential contribution of IL-4 and STAT6 vs STAT4 to the development of lupus nephritis*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4818-25.
77. Bour, S., R. Geleziunas, and M.A. Wainberg, *The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection*. Microbiol Rev, 1995. **59**(1): p. 63-93.
78. Artyomov, M.N., et al., *CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(39): p. 16916-21.
79. Filion, L.G., et al., *Detection of surface and cytoplasmic CD4 on blood monocytes from normal and HIV-1 infected individuals*. J Immunol Methods, 1990. **135**(1-2): p. 59-69.
80. Lucey, D.R., et al., *Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus 1 gp120*. J Exp Med, 1989. **169**(1): p. 327-32.
81. Biswas, P., et al., *Expression of CD4 on human peripheral blood neutrophils*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4452-6.
82. Vremec, D., et al., *CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 2978-86.
83. Li, Y., et al., *Mast cells/basophils in the peripheral blood of allergic individuals who are HIV-1 susceptible due to their surface expression of CD4 and the chemokine receptors CCR3, CCR5, and CXCR4*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3484-90.
84. Zauli, G., et al., *A subset of human CD34+ hematopoietic progenitors express low levels of CD4, the high-affinity receptor for human immunodeficiency virus-type 1*. Blood, 1994. **84**(6): p. 1896-905.
85. Louache, F., et al., *Expression of CD4 by human hematopoietic progenitors*. Blood, 1994. **84**(10): p. 3344-55.
86. Valentin, A., et al., *Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(10): p. 7015-20.
87. Lusso, P., et al., *Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6*. Nature, 1991. **349**(6309): p. 533-5.
88. Lusso, P., et al., *Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6*. Nature, 1993. **362**(6419): p. 458-62.
89. Lusso, P., et al., *Infection of gamma/delta T lymphocytes by human herpesvirus 6: transcriptional induction of CD4 and susceptibility to HIV infection*. J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1303-10.
90. Hoennscheidt, C., et al., *Expression of CD4 on Epstein-Barr virus-immortalized B cells*. Scand J Immunol, 2009. **70**(3): p. 216-25.
91. Shangary, S. and S. Wang, *Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(17): p. 5318-24.
92. Feki, A. and I. Irminger-Finger, *Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **52**(2): p. 103-16.
93. Matlashewski, G., et al., *Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene*. Embo j, 1984. **3**(13): p. 3257-62.
94. Wawrzynow, B., et al., *MDM2 chaperones the p53 tumor suppressor*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 32603-12.
95. Wei, C.L., et al., *A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome*. Cell, 2006. **124**(1): p. 207-19.
96. Khanna, K.K., et al., *ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage*. Cell Death Differ, 2001. **8**(11): p. 1052-65.
97. Clancy, S., *DNA Damage & Repair: Mechanisms for Maintaining DNA Integrity* Nature Education, 2008. **1**(1): p. 103.
98. Lee, J.H. and T.T. Paull, *Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks*. Oncogene, 2007. **26**(56): p. 7741-8.
99. Lees-Miller, S.P., et al., *Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(11): p. 5041-9.
100. Woo, R.A., et al., *DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage*. Nature, 1998. **394**(6694): p. 700-4.

101. Maclaine, N.J. and T.R. Hupp, *The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(5): p. 490-502.
102. Menendez, D., A. Inga, and M.A. Resnick, *The expanding universe of p53 targets*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(10): p. 724-37.
103. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis*. Cancer Res, 1994. **54**(5): p. 1169-74.
104. Cmielova, J. and M. Rezacova, *p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization [corrected]*. J Cell Biochem, 2011. **112**(12): p. 3502-6.
105. Tokino, T. and Y. Nakamura, *The role of p53-target genes in human cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2000. **33**(1): p. 1-6.
106. Gudkov, A.V., K.V. Gurova, and E.A. Komarova, *Inflammation and p53: A Tale of Two Stresses*. Genes Cancer, 2011. **2**(4): p. 503-16.
107. Brady, C.A. and L.D. Attardi, *p53 at a glance*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 15): p. 2527-32.
108. Bond, G.L., W. Hu, and A.J. Levine, *MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting*. Curr Cancer Drug Targets, 2005. **5**(1): p. 3-8.
109. Zhang and H. Wang, *MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy*. Curr Pharm Des, 2000. **6**(4): p. 393-416.
110. Thomasova, D., et al., *Murine Double Minute-2 Prevents p53-Overactivation-Related Cell Death (Podoptosis) of Podocytes*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(7): p. 1513-23.
111. Momand, J., et al., *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation*. Cell, 1992. **69**(7): p. 1237-45.
112. Bueso-Ramos, C.E., et al., *The human MDM-2 oncogene is overexpressed in leukemias*. Blood, 1993. **82**(9): p. 2617-23.
113. Setoguchi, K., et al., *P53 Regulates Rapid Apoptosis in Human Pluripotent Stem Cells*. J Mol Biol, 2016. **428**(7): p. 1465-75.
114. Chen, J., V. Marechal, and A.J. Levine, *Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(7): p. 4107-14.
115. Li, M., et al., *Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2*. Science, 2003. **302**(5652): p. 1972-5.
116. Thomasova, D., et al., *p53-independent roles of MDM2 in NF-kappaB signaling: implications for cancer therapy, wound healing, and autoimmune diseases*. Neoplasia, 2012. **14**(12): p. 1097-101.
117. Ebrahim, M., et al., *MDM2 beyond cancer: podoptosis, development, inflammation, and tissue regeneration*. Histol Histopathol, 2015. **30**(11): p. 1271-82.
118. Gao, K., et al., *RNF12 promotes p53-dependent cell growth suppression and apoptosis by targeting MDM2 for destruction*. Cancer Lett, 2016. **375**(1): p. 133-41.
119. Badciong, J.C. and A.L. Haas, *MdmX is a RING finger ubiquitin ligase capable of synergistically enhancing Mdm2 ubiquitination*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49668-75.
120. Jones, S.N., et al., *Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53*. Nature, 1995. **378**(6553): p. 206-8.
121. Zhang, Y., et al., *Inhibition of p53 after acute myocardial infarction: reduction of apoptosis is counteracted by disturbed scar formation and cardiac rupture*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(3): p. 471-8.
122. Momand, J., et al., *The MDM2 gene amplification database*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(15): p. 3453-9.
123. Allam, R., et al., *Mdm2 promotes systemic lupus erythematosus and lupus nephritis*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(11): p. 2016-27.
124. Vassilev, L.T., et al., *In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2*. Science, 2004. **303**(5659): p. 844-8.
125. Haaland, I., et al., *Molecular mechanisms of nutlin-3 involve acetylation of p53, histones and heat shock proteins in acute myeloid leukemia*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 116.
126. Andreeff, M., et al., *Results of the Phase I Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist in Leukemia*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(4): p. 868-76.
127. Burgess, A., et al., *Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies*. Front Oncol, 2016. **6**: p. 7.

128. Pishas, K.I., et al., *Nutlin-3a efficacy in sarcoma predicted by transcriptomic and epigenetic profiling*. *Cancer Res*, 2014. **74**(3): p. 921-31.
129. Bartel, F., et al., *MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using antisense oligonucleotides*. *Mol Cancer Res*, 2004. **2**(1): p. 29-35.
130. El-Dahr, S., et al., *The MDM2-p53 pathway: multiple roles in kidney development*. *Pediatr Nephrol*, 2014. **29**(4): p. 621-7.
131. Thomasova, D., et al., *MDM2 prevents spontaneous tubular epithelial cell death and acute kidney injury*. *Cell Death Dis*, 2016. **7**(11): p. e2482.
132. Ye, C., et al., *MDM2 mediates fibroblast activation and renal tubulointerstitial fibrosis via a p53-independent pathway*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017. **312**(4): p. F760-f768.
133. Mulay, S.R., et al., *Murine Double Minute-2 Inhibition Ameliorates Established Crescentic Glomerulonephritis*. *Am J Pathol*, 2016. **186**(6): p. 1442-53.
134. Lou, Y.H., *Anti-GBM glomerulonephritis: a T cell-mediated autoimmune disease?* *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2004. **52**(2): p. 96-103.
135. Tipping, P.G. and S.R. Holdsworth, *T cells in glomerulonephritis*. *Springer Semin Immunopathol*, 2003. **24**(4): p. 377-93.
136. Marketos, S.G. and D.A. Koutras, *Experimental nephritis: one of the earliest publications on the subject by a pioneer of Neohippocratism*. *Am J Nephrol*, 1999. **19**(2): p. 333-5.
137. Frank J. Dixon, J.D.F., and Jacinto J. Vazquez, *Experimental Glomerulonephritis. The Pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human Glomerulonephritis*. *J Exp Med.*, 1961. **113**(5): p. 899.
138. Billiau, A. and P. Matthys, *Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases*. *J Leukoc Biol*, 2001. **70**(6): p. 849-60.
139. Sheerin, N.S., et al., *Protection against anti-glomerular basement membrane (GBM)-mediated nephritis in C3- and C4-deficient mice*. *Clin Exp Immunol*, 1997. **110**(3): p. 403.
140. Davin, J.C., et al., *Urinary excretion of neutral proteinases in nephrotic rats with a glomerular disease*. *Kidney Int*, 1987. **31**(1): p. 32-40.
141. Suzuki, Y., et al., *Distinct contribution of Fc receptors and angiotensin II-dependent pathways in anti-GBM glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 1998. **54**(4): p. 1166-74.
142. Heeringa, P., et al., *Pathogenesis of pulmonary vasculitis*. *Semin Respir Crit Care Med*, 2004. **25**(5): p. 465-74.
143. Cossarizza, A., et al., *Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies*. *Eur J Immunol*, 2017. **47**(10): p. 1584-1797.
144. Gerondakis, S. and U. Siebenlist, *Roles of the NF- κ B Pathway in Lymphocyte Development and Function*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(5).
145. Kawabe, T., et al., *The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation*. *Immunity*, 1994. **1**(3): p. 167-78.
146. Fuleihan, R.L., *The hyper IgM syndrome*. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2001. **1**(5): p. 445-50.
147. Burne, M.J., et al., *Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(9): p. 1283-90.
148. Tapmeier, T.T., et al., *Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction*. *Kidney Int*, 2010. **78**(4): p. 351-62.
149. Reynolds, J., et al., *Blockade of the CD154-CD40 costimulatory pathway prevents the development of experimental autoimmune glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 2004. **66**(4): p. 1444-52.
150. Reynolds, J., et al., *CD28-B7 blockade prevents the development of experimental autoimmune glomerulonephritis*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(5): p. 643-51.
151. Wang, Y., et al., *Depletion of CD4(+) T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine adriamycin nephropathy*. *Kidney Int*, 2001. **59**(3): p. 975-84.
152. Maignel, D., et al., *Small molecule-mediated activation of the integrin CD11b/CD18 reduces inflammatory disease*. *Sci Signal*, 2011. **4**(189): p. ra57.
153. Montecucco, F., et al., *Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways*. *Cell Signal*, 2008. **20**(3): p. 557-68.

154. Rosen, S. and I.E. Stillman, *Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(5): p. 871-5.
155. Yuste, C., et al., *Pathogenesis of glomerular haematuria*. World J Nephrol, 2015. **4**(2): p. 185-95.
156. Wong, M.G., et al., *Peritubular ischemia contributes more to tubular damage than proteinuria in immune-mediated glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(2): p. 290-7.
157. Schulz, L.C., *Pathologie der Haustiere*. Vol. 1. 1991, Jena: Gustav Fischer Verlag Jena. 550.
158. Nitta, K., et al., *Resistance of CD28-deficient mice to autologous phase of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis*. Clin Exp Nephrol, 2003. **7**(2): p. 104-12.
159. Burgess, A., et al., *Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies*. Front Oncol, 2016. **6**.
160. Schulze-Koops, H. and P.E. Lipsky, *Anti-CD4 monoclonal antibody therapy in human autoimmune diseases*. Curr Dir Autoimmun, 2000. **2**: p. 24-49.
161. Delmonico, F.L. and A.B. Cosimi, *Anti-CD4 monoclonal antibody therapy*. Clin Transplant, 1996. **10**(5): p. 397-403.
162. Kalden, J.R., H. Burkhardt, and H. Schulze-Koops, *Obstacles to Anti-CD4 Therapy in Rheumatoid Arthritis*. Arthritis Res. 2000;1(Suppl 1):S45. Epub 1999 Nov 15 doi:10.1186/ar59.
163. Beura, L.K., et al., *Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice*. Nature, 2016. **532**(7600): p. 512-6.

11 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Anders bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Labor mit einem tollen Team zu arbeiten. Aufgrund seiner konsequenten Leitung und Erfahrung haben ich und andere Mitarbeiter des Labors eine erfolgreiche Arbeitszeit haben dürfen, in der man rasch eingelernt und allseits unterstützt wurde. Aufgrund seiner Expertise und Professionalität hat er es geschafft, gleichzeitig als Arzt und Wissenschaftler ein Vorbild zu sein.

Des Weiteren bedanke ich mich besonders bei Frau PD Dr. med. Ph.D. Dana Thomasova, welche mich trotz familiärer Verpflichtungen stets in allen Belangen unterstützt hat.

Martrez Nabil Zaki Ebrahim gebührt größter Dank. Sie hat sich aufopfernd um die Tierhaltung und andere Tätigkeiten gekümmert und hat mich stets bei der Durchführung von Experimenten unterstützt. Auch Kristina Fleckinger war als erfahrene und liebenswürdige Person unerlässlich.

Zusätzlich bedanke ich mich auch bei Frau Ph.D. Dr. Stefanie Steiger, ohne die die Durchflusszytometrien nicht durchgeführt hätten werden können. Sie ist eine unschätzbare wertvolle Hilfe in allen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Angelegenheiten.

Eine ebenfalls wichtige Person während der Durchführung der Arbeit war PD Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech, der mit gutem Rat und organisatorischer Hilfe zur Seite stand.

Herr Dan Draganovici und Frau Janina Mandelbaum haben verlässlich die wichtigen histologischen Schnitte angefertigt sowie die Genotypisierungen durchgeführt, weshalb ich auch ihnen zu Dank verpflichtet bin.

Ich richte auch ein herzliches Dankeschön an Ewa Radomska, die in bürokratischen Belangen eine unverzichtbare Mitarbeiterin war, sowie an Prof. Dr. Bärbel Stecher welche als Mitglied in der Betreuungskommission Unterstützung geleistet hat.

Zusätzlich bedanke ich mich auch bei weiteren Labormitarbeitern, wie PD Dr. rer. biol. hum. Shrikant Ramesh Mulay, M. Sc. Biotech. Mohammad Mohsen Honarpisheh, M. Sc. Julian Marschner und bei Mitarbeitern und Doktoranden ohne namentlicher Erwähnung.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Ehefrau Tanja, die mir in allen Lebenslagen half, mich motivierte und mir verständnisvoll die Zeit gab, meinen Verpflichtungen nachzukommen.

Ich habe die Zeit im Labor genossen und fühlte mich von Beginn an aufgrund der familiären Atmosphäre sehr wohl. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht gelungen.