

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg- Essen

Aus der Klinik für Nephrologie

**Blockade des IL-17 Pathways in einem Rattenmodell zur
ANCA-assozierten Vaskulitis**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Erika Boschmann
aus Almaty,
Kasachstan
2023

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/82602

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20241204-115048-5

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. B. Wilde

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. St. Herget-Rosenthal

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 2024

Inhalte dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Posterpräsentationen:

- **E. Boschmann**, T. Hinkeldein, A. Kribben, S. Dolff, O. Witzke, B. Wilde

Therapeutic IL-17 Blockade in a rat model of ANCA-vasculitis

-Forschungstag der Universität Duisburg-Essen (2019)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Übersicht Vaskulitiden / ANCA-assoziierte Vaskulitis	7
1.2 Epidemiologie.....	7
1.3 Klinische Symptomatik	7
1.4 Das Immunsystem	8
1.4.1 Das angeborene Immunsystem.....	8
1.4.2 Erworbenes Immunsystem	9
1.5 Pathogenese der ANCA-assoziierten Vaskulitis	10
1.5.1 Genese der ANCA-Synthese	10
1.5.2 Immunkaskade der Vaskulitis.....	10
1.5.3 Th-17 Zellen und Interleukin-17 Pathway	13
1.6 Therapieprinzipien und Komplikationen.....	14
1.6.1 Therapieansätze	14
1.6.2 Komplikationen und Therapiefolgen	15
1.7 Fragestellungen und Zielsetzungen der Arbeit	16
2. Material und Methoden	16
2.1 Tabelle 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	16
2.2 Tabelle 2: Antikörper Immunhistochemie	20
2.3 Tabelle 3: PCR-Primer.....	21
2.4 Tabelle 4: Tiermodell.....	22
2.5 Tabelle 5: Geräte.....	23

2.6 Methoden.....	24
2.6.1 Tiermodell	24
2.6.2 Quantifizierung von Anti-MPO und Albuminurie mittels ELISA	27
2.6.3 Histologische Aufbereitung.....	28
2.6.4 Glomerulärer Nierenschaden.....	28
2.6.5 Petechiale Lungenblutungen	29
2.6.6 Prozentualer Lungenschaden.....	30
2.6.7 Isolierung von RNA und Bestimmung der Genexpression mittels qPCR und der $\Delta\Delta$ CT Methode	30
2.6.8 Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antikörper und Zielstrukturen ...	32
2.6.9 Statistik.....	33
3. Ergebnisse	33
3.1 Unterschiede in Parametern für Krankheitsaktivität	33
3.1.1 Quantifizierung des Nierenschadens unter IL-17A und IL-17C Blockade	33
3.1.2. Ausmaß der Lungendestruktion unter IL-17A und IL-17C Blockade.....	39
3.2. Beteiligte Zelltypen an der Lungendestruktion bei unbehandelten und mit anti-IL- 17A behandelten Tieren	42
3.3. Höhe des anti-MPO Verdünnungstiters	45
3.4. Genexpression immunmodulatorischer Gene unter IL-17A und IL17C Blockade.....	48
3.4.1 Unterschiede der Genexpression bei den blockierten Zielgenen IL-17A und IL-17C	48
3.4.2 Unterschiede der Genexpression bei den von IL-17A und IL-17C.....	54
beeinflussten Genen	54

4. Diskussion.....	66
5. Zusammenfassung.....	75
6.Literaturverzeichnis.....	77
7. Verzeichnisse.....	85
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	85
7.2 Abbildungsverzeichnis	87
7.3 Tabellenverzeichnis	88
8.Anhang	89
8.1 Primersequenzen.....	89
8.2 Publikationslizenzen.....	95
9. Danksagung.....	99
10. Lebenslauf.....	100

1. Einleitung

1.1 Übersicht Vaskulitiden / ANCA-assoziierte Vaskulitis

Vaskulitiden stellen eine heterogene Gruppe an Gefäßerkrankungen dar. Dabei unterscheidet man primäre Vaskulitiden, welche idiopathischer Genese sind, von sekundären Vaskulitiden, welche im Rahmen einer anderen Grunderkrankung auftreten. Weiterhin lassen sich die Vaskulitiden klassifizieren gemäß der Chapel Hill Consensus Conference von 2012 anhand der Gefäßgröße, sowie Ätiologie (Jennette et al., 2012). Unter den primären Vaskulitiden befinden sich die anti-neutrophilen zytoplasmatischen Antikörper (ANCA)-assoziierten Vaskulitiden (AAV) und die Nicht-ANCA-assoziierten Vaskulitiden. Bei den ANCA-assoziierten Vaskulitiden sind vor allem die kleinen bis mittelgroßen Gefäße betroffen. Ferner lassen sich der AAV drei Entitäten zuordnen: die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), die Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA), sowie die Mikroskopische Polyangiitis. Für diese Entitäten ist das Auftreten von Autoantikörpern gegen bestimmte zytoplasmatische Antigene, den ANCAs, charakteristisch. Anhand des Immunfluoreszenzmusters lassen sich die ANCAs weiter unterscheiden. Dazu gehören die cANCAs, die ein zytoplasmatisches Immunfluoreszenzmuster aufweisen und sich gegen Proteinase-3 (PR-3) richten, diese sprechen für die Entität der GPA. Desweiteren gibt es die pANCAs, diese weisen ein perinukleäres Immunfluoreszenzmuster auf und richten sich gegen die Myeloperoxidase (MPO) der Neutrophilen (Gapud et al., 2012). Diese lassen sich häufiger bei der Mikroskopischen Polyangiitis und auch bei der EGPA finden.

1.2 Epidemiologie

Die meisten epidemiologischen Studien zur AAV entspringen aus Europa, dort beträgt die allgemeine Inzidenz aller Formen der AAV durchschnittlich zwanzig Fälle pro eine Million Einwohner. Die EGPA stellt dabei die seltenste Subgruppe dar. Die Verteilung der Häufigkeit der Subtypen unterscheidet sich jedoch in geographischen Arealen (Watts et al., 2001). Prinzipiell kann die AAV in jedem Alter auftreten, die höchsten Inzidenzraten betreffen die Altersgruppe von 65-74 Jahren (Watts et al., 2001).

1.3 Klinische Symptomatik

Die klinischen Symptome umfassen eine Vielzahl unspezifischer Beschwerden wie Fatigue, Fieber, Gewichtsverlust, Muskel- sowie Gelenkschmerzen. Oftmals wird am Anfang der Erkrankung auch ein „Grippe-ähnliches“ Syndrom beschrieben. Bei der Erkrankung kann es zu einer Schädigung vielzähliger Organe kommen. Die häufigste

kutane Läsion ist die leukozytoklastische Angiitis, diese bewirkt typischerweise eine Purpura, teilweise mit fokalen Nekrosen und Ulzerationen bevorzugt in den unteren Extremitäten (Jennette et al., 1994). Neurologische Manifestationen äußern sich im peripheren Nervensystem häufig durch eine Mononeuritis multiplex (Kissel et al., 1992). Erkrankungen des zentralen Nervensystems werden durch eine Beteiligung der meningealen Gefäße hervorgerufen. Häufig findet sich eine Inflammation des oberen Respirationstraktes resultierend in einer Rhinorrhoe, Epistaxis, Sinusitis, Otitis media und Ulzerationen der Nasenschleimhaut. Eine Erkrankung der Lunge präsentiert sich mit Husten, Hämoptysen und Dyspnoe bis hin zur pulmonalen Hämorrhagie. Eine renale Beteiligung äußert sich in einer Hämaturie und Proteinurie, dabei kann es auch schnell zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion kommen, im Sinne einer rapid-progressiven Glomerulonephritis. Weitere Manifestationen betreffen den Darm mit Auftreten von Ischämien und Hämorrhagien und das Herz in Form einer Myokarditis. Bei der Granulomatose mit Polyangiitis sind typischerweise der obere und untere Respirationstrakt sowie die Nieren betroffen. Kennzeichnend ist insbesondere eine granulomatöse, nekrotisierende Entzündung. Die mikroskopische Polyangiitis zeichnet sich ebenso durch renale Manifestationen und pulmonale Blutungen aus, jedoch lassen sich keine Granulome vorfinden. Im Gegensatz dazu, kommt es bei der EGPA zu einer Hypereosinophilie, Asthma und einer nekrotisierenden Vaskulitis, bei der die Nieren seltener betroffen sind (Jennette et al., 1997; Kamesh et al., 2002).

1.4 Das Immunsystem

Die Rolle des Immunsystems besteht unter physiologischen Umständen darin, den Organismus vor Pathogenen zu schützen. Dieses kann dabei in ein angeborenes und erworbenes Immunsystem unterschieden werden.

1.4.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem reagiert sofort bei Kontakt mit Krankheitserregern. Die Immunantwort ist jedoch unspezifisch und bei einer zweiten Exposition gegen das gleiche Antigen reagiert es ebenso wie bei der ersten Exposition. Dabei basiert dies auf vorhandenen physikalischen, chemischen, humoralen und zellulären Abwehrmechanismen gegen Krankheitserreger. Zu den physikalischen und chemischen Abwehrmaßnahmen gehört eine intakte äußere Haut und Schleimhaut, sowie die Schleimproduktion, welche antimikrobielle Peptide enthält. Auch physiologische Reflexe, wie der Husten- oder Schluckreflex, verhindern das Eindringen von Mikroben.

Zu der humoralen Abwehr gehört das Komplementsystem, welches aus ca. 20 löslichen Proteinen besteht und die Funktion von Antikörpern ergänzt. Komplementfaktoren zirkulieren im Blut und extrazellulären Flüssigkeiten. Diese können durch Antikörper oder Bestandteilen von Bakterien und Viren aktiviert werden. Als Reaktion darauf kommt es zur Phagozytose durch Makrophagen, Lyse des Ziels oder der Rekrutierung von weiteren inflammatorischen Zellen. Des Weiteren sind auch proinflammatorische Zytokine Bestandteil der humoralen Abwehr, wie Interferone, Interleukine und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), welche von aktivierten Zellen freigesetzt werden. Zu den Zellen der angeborenen Immunantwort gehören Granulozyten, Makrophagen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), sowie dendritische Zellen. Mithilfe der Major Histocompatibility Complex-Rezeptoren (MHC-Rezeptoren) können Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten (Antigen-präsentierende Zellen, APZ) Antigene den Zellen der spezifischen Immunabwehr präsentieren. Dabei kommen MHC-I-Rezeptoren auf fast allen kernhaltigen Zellen vor und dienen dazu intrazelluläre Antigene zu präsentieren. MHC-II-Rezeptoren kommen vor allem auf antigenpräsentierenden Zellen vor und dienen der Präsentation von externen, aufgenommenen Antigenen gegenüber T-Lymphozyten (Janeway et al., 2001; Alberts et al., 2002).

1.4.2 Erworbenes Immunsystem

Das erworbene Immunsystem reagiert im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem hochspezifisch und bildet Gedächtniszellen gegen das gleiche Antigen. Dabei gibt es zwei Klassen der Immunantwort, eine Antikörper- und eine Zell-medierte Antwort. Diese werden von verschiedenen Gruppen von Lymphozyten ausgeführt, den B- und T-Zellen. Bei der Antikörper-Antwort werden B-Zellen aktiviert und sezernieren Antikörper, die Immunglobuline (Ig). Die Antikörper zirkulieren im Blutkreislauf und gelangen in andere Körperflüssigkeiten, wo sie spezifisch an fremde Antigene binden und diese entweder direkt neutralisieren oder das angeborene Immunsystem bei der Neutralisation des Ziels unterstützen. CD8-Effektorzellen, auch zytotoxische T-Lymphozyten genannt, erkennen und neutralisieren virusinfizierte oder entartete Körperzellen über unterschiedliche Mechanismen. CD4-Effektorzellen, auch T-Helferzellen (Th-Zellen), differenzieren sich anhand der einwirkenden Zytokine weiter in verschiedene Subklassen wie den T_H1 - und T_H2 -Zellen. T_H1 -Zellen fördern vor allem die Zell-medierte Immunität, durch Aktivierung von Makrophagen. T_H2 -Zellen initiieren die humorale Immunantwort, indem sie naive B-Zellen zur Produktion von Antikörpern aktivieren (Janeway et al., 2001; Alberts et al., 2002).

1.5 Pathogenese der ANCA-assoziierten Vaskulitis

1.5.1 Genese der ANCA-Synthese

Für das Auftreten von ANCAs gibt es viele mutmaßliche genetische und ökologische Faktoren. Diese müssen jedoch nicht alle gleichzeitig vorliegen und unterscheiden sich zwischen unterschiedlichen Patientenpopulationen. Das Auftreten von ANCAs an sich ist jedoch nicht immer pathologisch. Gesunde Individuen können selten ebenso Autoantikörper gegen MPO und PR3 aufweisen (Cui et al., 2010). Im Gegensatz zu pathogenen ANCAs besitzen diese jedoch einen niedrigeren Titer, eine geringere Avidität, geringere Subklassen Diversität, sowie ein geringeres Potenzial neutrophile Granulozyten *in vitro* zu aktivieren (Xu et al., 2011). Pathogene ANCAs können aufgrund einer vorausgehenden Infektion auftreten. Zum Beispiel können Peptide mikrobiellen Ursprungs mit komplementärer Aminosäuresequenz zu Proteinase-3 eine anti-idiotypische Immunantwort bewirken (Pendegrift et al., 2004). Medikamente wie Propylthiouracil, Allopurinol, Minocyclin, D-Penicillamine und mit Levamisol gestrecktes Kokain können ANCAs induzieren und die Entwicklung einer pulmonalen Vaskulitis sowie Glomerulonephritis hervorrufen (Pendegrift et al., 2014). Des Weiteren spielen Umweltfaktoren, wie die Inhalation von Stäuben und die Assoziation zu Silikat-Stäuben eine Rolle bei der Pathogenese der ANCA-assoziierten Vaskulitis (Gomez et al., 2013). Wie bei vielen anderen Erkrankungen auch, gibt es genetische Faktoren, welche prädisponierend sein können. Dabei gab es Studien, welche eine starke Assoziation von bestimmten HLA-Molekülen und der ANCA-assoziierten Vaskulitis aufwiesen (Merkel et al., 2017).

1.5.2 Immunkaskade der Vaskulitis

Der genaue Ablauf der Immunkaskade lässt sich für die neutrophilen Granulozyten wie folgt beschreiben. Ausgangspunkt ist dabei eine Infektion, wie sie z.B. im Rahmen einer Lungenentzündung auftreten kann. Als Folge einer Inflammation werden proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1-beta (IL-1 β) und TNF- α sezerniert, daraufhin werden die neutrophilen Granulozyten aktiviert und exprimieren vermehrt MPO, PR3, sowie Adhäsionsmoleküle auf ihrer Zelloberfläche (Harper et al., 2001). Anschließend binden ANCAs mit dem Fab-Teil an die Zielantigene auf den Neutrophilen und mit dem Fc-Ende an den Fc-Rezeptor eines anderen Neutrophilen. Durch diese Bindung kommt es zu einer gesteigerten Adhäsion der Neutrophilen an die Gefäßwand. Sauerstoffradikale, Serin-Proteasen und proinflammatorischen Cytokinen werden dann

direkt am Endothel freigesetzt (Kallenberg et al., 2006). Dieser Prozess führt zur Schädigung der Gefäßwand und bewirkt den vaskulitischen Endothelschaden als Ausgangspunkt der Vaskulitis (Hu et al., 2011). Die ANCA-vermittelte Sekretion von Zytokinen führt zur Rekrutierung weiterer proinflammatorischer Zellen und fördert somit den Entzündungsprozess (Schreiber et al., 2013). Darüber hinaus kommt es aufgrund der ANCA-vermittelten Aktivierung zu einer Störung der Apoptose, woraufhin die Neutrophilen eine sekundäre Nekrose durchlaufen und folglich entzündliche Mediatoren freisetzen (Xiao et al., 2002). Ein weiterer Mechanismus beinhaltet die Freisetzung von sogenannten „neutrophil extracellular traps“ (NET). NETs resultieren aus einem speziellen Zelltod, der NETosis und sind dafür da, um Bakterien festzuhalten und zu neutralisieren. Komponenten der NETs sind dabei ein DNA-Gerüst samt Histonen, sowie verschiedene proinflammatorische Proteine. Für die Pathogenese der AAV sind die proinflammatorischen Aspekte der NETs von Bedeutung: NETs schädigen das Endothel und aktivieren den alternativen Komplementweg. Diese Faktoren amplifizieren den Entzündungsprozess bei der AAV. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Autoantigene PR3 und MPO-Bestandteile der NETs sind. NETs sind in Biopsien von betroffenen Nieren zu finden (Söderberg et al., 2016). Neben Neutrophilen, spielen auch B-Zellen eine außerordentliche Rolle bei der Pathogenese, da diese die Vorläufer zu Plasmazellen sind, welche ANCAs produzieren. Zudem sind B-Zellen Antigen präsentierende Zellen und aktivieren T-Zellen. Viele Gruppen zeigten eine Erhöhung des B-Zell aktivierenden Faktors (BAFF) bei der AAV (Schneeweis et al., 2010; Sanders et al., 2006). Dieser Faktor ist ein positiver Regulator für das Überleben von B-Zellen, sowie deren Differenzierung und Proliferation. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Neutrophilen durch ANCAs zu einer Freisetzung von BAFF führte und somit potenziell die B-Zell-Reifung förderte (Bouaziz et al., 2010). Es gibt auch antiinflammatorische Zellen, wie die regulatorischen B-Zellen (Breg), welche entzündungshemmende Zytokine wie IL-10 sezernieren und dadurch das Immunsystem regulieren (Hruskova et al., 2009). Dies könnte ein relevanter Mechanismus für viele Autoimmunerkrankungen sein, jedoch ist die Rolle der regulatorischen B-Zellen noch wenig erforscht. Es gibt eine Studie, die eine Verbindung zwischen erniedrigten IL-10 Spiegel und einem erhöhten Risiko für einen Rückfall der AAV aufzeigte (Wilde et al., 2013; Tipping et al., 2006). Eine besondere Rolle bei der Pathogenese spielen außerdem T-Zellen, diese können in befallenen Läsionen in Nieren, Lungen und nasalen Biopsien von AAV Patienten, sowie in den Granulomen nachgewiesen werden (Tipping et al., 2006). Außerdem sind die T-Zell- Aktivitätsmarker im Blut von AAV Patienten erhöht

und assoziiert mit der Krankheitsaktivität (Stegmann et al., 1993; Schmitt et al., 1992). Darüber hinaus deutet der IgG-Isotyp darauf hin, dass ein T-Zell vermittelter Subklassenwechsel stattgefunden hat (Brouwer et al., 1991). Bei den T-Zellen gibt es mehrere Untergruppen von Bedeutung. Zum einen gibt es die regulatorischen T-Zellen (Tregs), diese limitieren und regulieren die Immunantwort. Zum anderen gibt es CD4+ T-Effektorzellen (Teffs), welche Entzündungsvorgänge induzieren, B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern aktivieren und durch Tregs reguliert werden. Tatsächlich konnte in Studien gezeigt werden, dass beide Subklassen im Rahmen der AAV erhöht waren (Sakaguchi et al., 2006). In zwei Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die Tregs bei der GPA funktionelle Defekte aufwiesen. Dabei konnten die Tregs die Proliferation oder Zytokin-Produktion der Effektor T-Zellen nicht inhibieren. (Abdulahad et al., 2007; Morgan et al., 2010). Weitere Studien werden jedoch benötigt, um die Homöostase zwischen Tregs und Teffs näher zu beleuchten. Bisher sind bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel bei der Multiplen Sklerose oder dem Kawasaki-Syndrom, Defekte von regulatorischen T-Zellen beschrieben (Viglietta et al., 2004; Furuno et al., 2004). Als weitere Untergruppe sind Effektor T-Gedächtniszellen (Effector memory T cells, Tem) zu nennen, diese sind beteiligt an der Initiierung und Aufrechterhaltung der Immunantwort. Außerdem haben diese Zellen eine lange Überlebensdauer und reagieren schnell auf Stimulationsreize. Bei der aktiven GPA zeigte sich, dass die Anzahl der Tems deutlich verringert war und diese im Urin detektiert werden konnten (Abdulahad et al., 2009). Dies weist darauf hin, dass Tems in aktive entzündliche Läsionen migrieren. Allerdings gibt es hierzu bislang nur wenige Studien und es bleibt bisher unklar, ob eine Dysbalance von Teffs/Tmems bei der AAV *in vivo* vorliegt. Wie bereits vorher beschrieben, wandern T-Zellen in Gewebe während der aktiven Phase der Entzündung aus. Zudem sind sie beteiligt an der Bildung von Granulomen, wie sie zum Beispiel in den oberen Atemwegen, der Lunge und gelegentlich auch in den Nieren zu finden sind (Viswinkel et al., 2005). In den Granulomen der GPA, lassen sich T- und B-Zellen, Riesenzellen, sowie dendritische Zellen finden. Um die beteiligten Zellen in den Granulomen näher zu differenzieren, eignet sich das Verfahren der Immunhistochemie. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der T-Zellen CD4+ ist (Müller et al., 2000). Anhand der weiteren Phänotypisierung ließ sich ein Großteil der beteiligten T-Zellen zu der Population der T-Gedächtniszellen zuordnen (Sallusto et al., 2004). Dabei ist es vorstellbar, dass T-Gedächtniszellen in das Gewebe auswandern und dort als Teffs agieren (Abdulahad et al., 2006).

Bei diversen anderen Autoimmunerkrankungen wurden bereits die Bildung von tertiären Lymphoiden Organen (TLO), als Reaktion auf eine lokale Entzündungskontrolle, thematisiert (Aloisi et al., 2006). TLO spiegeln dabei die Struktur von sekundären Lymphoidorganen wieder und bestehen aus einem B-Zell Follikel und einem umgebenden T-Zellen Wall mit Dendritischen Zellen. In diesen TLOs erfolgt auch eine T-Zell Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen (wie z.B. dendritische Zellen) und B-Zell Stimulation. Im Gegensatz zu sekundären Lymphorganen fehlt es den TLO an einem gerichteten Lymph- und Zellfluss. Daraus resultiert ein uneingeschränkter Zugang zu Antigenen und weiteren Lymphozyten. Diese Faktoren begünstigen eine überschießende T-Zell Aktivierung. Zum jetzigen Zeitpunkt zählen Granulome bei der AAV als eine Art von TLO (Mueller et al., 2008). Eine Studiengruppe konnte zeigen, dass PR3 in Granulomen präsent ist und so die T-Zell Antwort verstärkt (Csernok et al., 2006). Des Weiteren gab es eine Studie die demonstrierte, dass die B-Zell Reifung in Granulomen erfolgt (Voswinkel et al., 2006). Ebenso wird angenommen, dass die Produktion von ANCAs in diesen Granulomen stattfindet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass T-Zellen bei der AAV viele Auffälligkeiten aufweisen und ein Ungleichgewicht zwischen den einzelnen Subklassen zugunsten der proinflammatorischen Zelllinien herrscht (Wilde et al., 2010).

1.5.3 Th-17 Zellen und Interleukin-17 Pathway

Besonderer Beachtung bedarf es außerdem der Th17 Zellen, diese sind charakterisiert durch die Sekretion von IL-17A und anderen Zytokinen wie IL-17F, IL-21 und IL-22. Zudem ist diese Zellpopulation mitbeteiligt bei Entzündungsvorgängen und bei autoimmunen Erkrankungen (Ooi et al., 2010). Die Bedeutung der Th17-Zellen und IL-17A konnte bereits bei anderen Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) oder der rasch progressiven Glomerulonephritis gezeigt werden (Cortvrindt et al., 2017). Außerdem war beim SLE eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an zirkulierenden Th17-Zellen und der Lupus Aktivität auffällig (Chen et al., 2012; Dollf et al., 2010). Im Rahmen der AAV ließ sich eine erhöhte Anzahl von Th17 Zellen finden, unabhängig von der Krankheitsaktivität (Wilde et al., 2012; Abdulahad et al., 2008). Die Effekte von IL-17A in Bezug auf die Gewebeinflammation resultieren aus einer Expression von Chemokinen, proinflammatorischen Zytokinen und Metallomatrixproteasen (Kolls et al., 2004). Dabei werden unter anderem Chemokine wie CXCL1, CXCL2, CXCL5 und CLL20 freigesetzt, wodurch wiederum vor allem Neutrophile in die Niere rekrutiert werden (Atarashi et al., 2015). Folglich kommt es

dadurch zu einer Nierenschädigung. Tatsächlich konnte in einer Studie gezeigt werden, dass IL-17A defiziente Mäuse geschützt waren vor einer anti-MPO mediierten Glomerulonephritis (Gan et al., 2010). Erhöhte Serum-Level von IL-17A und IL-23, sowie MPO und Pr3 spezifische Th17 Zellen sind präsent bei Patienten mit AAV (Abdulahad et al., 2008). IL-23 ist ein Zytokin, welches IL-17 vorgeschaltet ist und wichtig für die Stabilisierung der Th17 Zelllinie (Nogueira et al., 2010). Dieses wird auf Entzündungsreize hin von Antigenpräsentierenden Zellen sezerniert (Ivanov et al., 2007). In einer experimentellen Studie ließ sich außerdem zeigen, dass MPOANCA direkt Neutrophile aktivieren und die Produktion von IL-6, IL-17A und IL-23 auslösen und so wiederum die Th17 mediierte Autoimmunität fördern (Hoshino et al., 2008). Der genaue Grund für die Expansion von Th17-Zellen bleibt bisher unklar. Jedoch ist anzunehmen, dass der Mangel an immunologischer Kontrolle die ungewöhnliche Polarisierung der TZellen fördert. Dabei spielen funktionelle Defekte der Tregs bei der AAV eine Rolle (Dollf et al., 2019). Als weiteres Interleukin ist IL-17C zu nennen. Bei diesem konnte in einem Tiermodell zur nephrotoxischen Nephritis und in einem murine Lupus Modell gezeigt werden, dass IL-17C durch Nierenzellen exprimiert wird. Dieses Zytokin zieht insbesondere Th17-Zellen zum Entzündungsgeschehen heran und hat somit direkte Effekte auf die Nierenzellen, indem es die Leukozytentransmigration und T-Zell Interaktion fördert (Krohn et al., 2018; Ghali et al., 2015).

1.6 Therapieprinzipien und Komplikationen

1.6.1 Therapieansätze

Zu Beginn der Therapie einer aktiven Vaskulitis steht die Induktion einer Remission (Induktionstherapie). Um eine aktive Vaskulitis in der Aktivität einzuschätzen, eignet sich dabei der Birmingham vasculitis activity score (BVAS), dieser beinhaltet viele klinische Merkmale, die in neun Organsystemen gruppiert sind (Flossmann et al., 2007). Ein rascher Beginn der immunsuppressiven Therapie ist wichtig, um potenziell lebens- oder organfunktionsbedrohende akute, sowie chronische Organschädigungen behandeln oder verhindern zu können. Durch den Einsatz einer immunsuppressiven Therapie kann die Mortalität der AAV reduziert werden (Hogan et al., 1996). Bei Erkrankungsstadien mit einer kritischen Organfunktion sollen hoch dosierte Glucocorticoide (GC) zusammen mit Cyclophosphamid oder Rituximab verabreicht werden. In nicht organbedrohten Stadien hoch dosierte GC zusammen mit Methotrexat. Anschließend wird die GC-Dosis schrittweise reduziert. Nach Erreichen einer Remission, üblicherweise drei bis vier Monate nach der Induktionstherapie erfolgt eine Umstellung auf eine

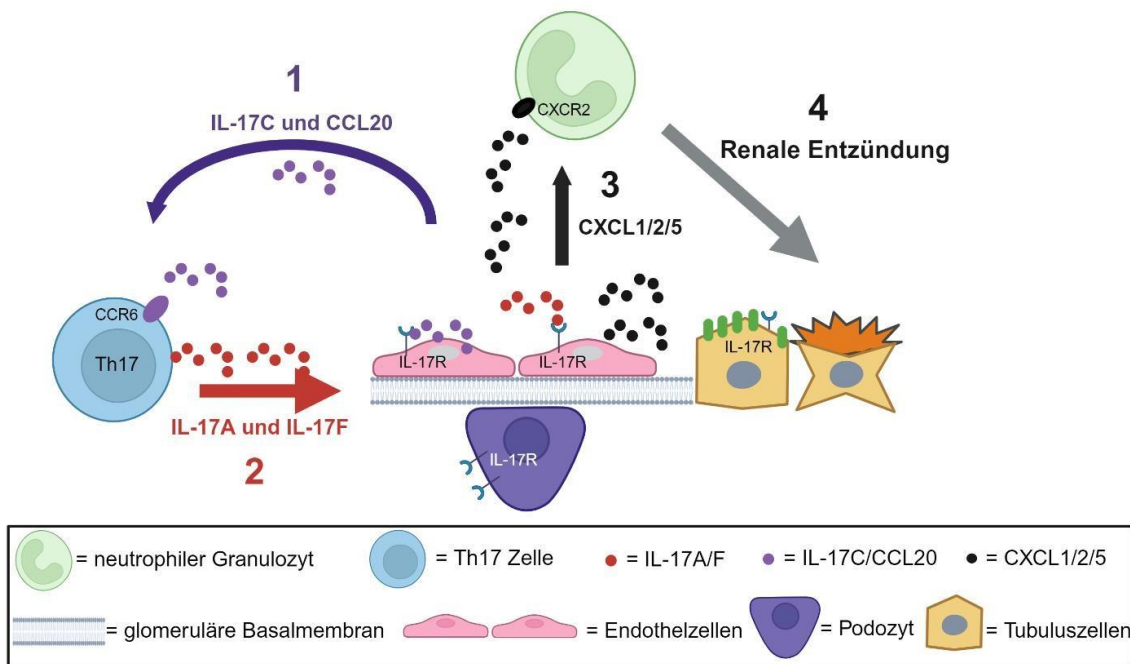


Abbildung 1: IL-17 und deren Rolle bei renaler Entzündung.

(1) IL-17C und CCL20 werden von renalen Gewebezellen unter einer Entzündungsreaktion freigesetzt. IL-17C und CCL20 sind Chemokine, welche die Migration von Th17-Zellen in die Niere fördern. (2) Daraufhin gelangen die Th17-Zellen in die Niere und setzen IL-17A und IL17F frei. IL-17A/F haben direkte Effekte auf die renalen Parenchymzellen. (3) Unter Einfluss von IL-17A sezernieren die renalen Parenchymzellen CXCL1/2/5 und bewirken somit (4) eine verstärkte Entzündung durch Rekrutierung von Neutrophilen.

Created with BioRender.com

remissionserhaltende Therapie. Dies ist notwendig aufgrund der ausgeprägten Rezidivneigung. Eine Remission ist dabei definiert als die Abwesenheit von signifikanter Krankheitsaktivität (BVAS <1) unter einer täglichen niedrigen GC-Dosis. Für die remissionserhaltende Therapie eignen sich Therapeutika, wie Methotrexat, Azathioprin oder Rituximab, gegebenenfalls kombiniert mit niedrig dosierten GC. Diese Therapie soll dabei für einen Zeitraum von 24 Monaten nach Erreichen der Remission fortgeführt werden. Im Falle eines Rezidives wird entweder die immunsuppressive Therapie intensiviert (Minor-Rezidiv) oder bei organbedrohenden Manifestationen (MajorRezidiv) eine erneute Induktionstherapie erfolgen (Schirmer et al., 2017).

1.6.2 Komplikationen und Therapiefolgen

Bereits früh im Verlauf treten Komorbiditäten und chronische Organschäden auf (Robson et al., 2015). Diese sind zum Teil durch die Vaskulitis selbst, zum anderen Teil aber durch Arzneimittelwirkungen der immunsuppressiven Therapie bedingt (Seo et al., 2005).

Insbesondere treten unter der immunsuppressiven Therapie vermehrt infektiöse Komplikationen auf, vor allem in den ersten zwei Monaten unter hohen GC-Dosen (Koselj-Kajtna et al., 2002). Im ersten Jahr nach Diagnosestellung sind die Hauptursachen der Mortalität bei der AAV Infektionen (59%) und aktive Vaskulitis (11%) (Little et al., 2010), in den darauffolgenden Jahren kardiovaskuläre Ereignisse, Malignome und Infektionen (Flossmann et al., 2011). Insgesamt beläuft sich das 1-, 5- und 10Jahres-Infektions-freie Überleben auf 75%, 65% und 53% (Rathmann et al., 2021).

1.7 Fragestellungen und Zielsetzungen der Arbeit

Die ANCA-assoziierten Vaskulitiden stellen eine seltene und heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, die potenziell tödlich verlaufen können. Bisher sind nur wenige Therapieoptionen vorhanden. Zudem sind die Therapieoptionen stark durch die möglichen Komplikationen der eingesetzten Medikamente limitiert. Die Th-17 Zellen und Interleukin-17 scheinen eine wichtige Schlüsselposition bei der Pathogenese einzunehmen und könnten einen möglichen Angriffspunkt bei der Behandlung der AAV darstellen. Bereits bei der Psoriasis konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von IL17A therapeutisch wirksam ist (Chiricozzi et al., 2013). Bislang fehlen jedoch Studien, ob dies auch für die AAV zutreffen würde. Diese Dissertation entstand unter der Zielsetzung die Effekte einer Blockade von IL-17 im Tiermodell zu untersuchen. Dazu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Unterscheiden sich die Parameter für die Krankheitsaktivität bei Tieren mit IL-17 Blockade gegenüber Kontrollen und unbehandelten Tieren?
2. Bewirkt die IL-17 Blockade Veränderungen der Genexpression immunmodulatorischer Gene in der Niere, Milz oder Lunge?

2. Material und Methoden

2.1 Tabelle 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Pipettenspitzen Finntips™ (5ml, 10ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen (10ul, 100ul, 200ul, 1000ul)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safe-Lock Tubes (0,5mL/1,5mL/2mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Normale Tubes	Eppendorf
Tube 15 mL	Sarstedt
Tube 50 mL	Sarstedt
Eppendorf ep TIPS 0.1-10 µl Box	Eppendorf
96er wellplatte	Bioplastics, Landgraaf, Niederlande
Advanced Polyolefin Film	Starlab, Hamburg, Deutschland
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems, Waltham, USA
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
96er-wellplatte, F-bottom	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Easyseal Abdeckfolie	Greiner bio-one
Ethanol (100%,90%,70%)	Apotheke hauseigen, UK Essen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Ethanol absolut	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Edelstahl Beads	Qiagen

Trizol	Thermo Fisher Scientific
Glykogen	Thermo Fisher Scientific
Chloroform	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck Millipore, Darmstadt
DEPC-Wasser	Thermo Fisher Scientific
Quick-RNA FFPE Kit	Zymo Research, Freiburg

Na ₂ CO ₃ (Coating Buffer)	AppliChem BioChemica
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween [®] -20	Serva, Heidelberg
Hydrochloridsäure 5N (HCl)	PanReac AppliChem
Albumin ELISA KIT	ALPCO, Salem, USA
Xylol	Thermo Scientific
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich
PBS Puffer (10x Dulbecco's)	PanReac AppliChem
Methanol	PanReac AppliChem
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Serva
Ethylendinitrilotetraessigsäure (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ *2Na*2H ₂ O)	Merck Millipore
Super PapPen	Invitrogen, Carlsbad, USA
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Deckgläser 24x32mm	Engelbrecht
Labeled Polymer-HRP anti-rabbit kit	Dako, Santa Clara, USA

SAB substrate Kit High Contrast	Zytomed, Berlin
Mayers Hämalaunlösung	Merck Millipore
Eosin 1%	Leica, Nussloch
VitroClud	Langenbrinck, Emmendingen
Streptavidin-HRP Polymerkonjugat	Sigma
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	AppliChem
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma

Perjodsäure	Merck Millipore
Schiffs Reagenz	Merck Millipore
Avidin Biotin Blocking Kit	Linaris, Dossenheim
normal rat serum	JacksonImmuno Research, Ely, England
Einmalhandschuhe	Abena, Zörbig
T-PER Tissue Protein Extraction Reagent	Thermo Scientific
Protease/-Phosphatase Inhibitor Cocktail	Cell Signaling, Danvers, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
10x Tris-Glycine	Bio-Rad
SDS 10%	Bio-Rad
Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad
Mini-Protean Precast Gel 12%	Bio-Rad
Glycerol	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
MilliQ	Merck Millipore
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris/HCl)	Serva
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem
ϵ -Aminocapronsäure	Fluka, Morristown, USA
Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien
Chromatographie Papier	GE Healthcare
Ponceau S Lösung	Sigma
Polyklonaler Kaninchen Anti-Maus/Ratte CCL20 Primärantikörper	Invitrogen
Monoklonaler Maus Anti-Kaninchen IgG HRP Sekundärantikörper	Santa Cruz, Dallas, USA

Positivkontrolle rekombinantes CCL20 aus Ratte	Creative BioMart, Shirley, USA
Magermilchpulver	Fluka
Super Signal West Femto Substrat	Thermo Scientific

2.2 Tabelle 2: Antikörper Immunhistochemie

Antikörper	IgGSubklasse und Wirt	Clon	Konjugat	Hersteller	Katalog Nr. /Referenz
Anti-Ratte CD3	Kaninchen, IgG	SP7	Unkonjugiert	ThermoFisher Scientific	MA1-90582
Anti-Ratte FoxP3	Ratte, IgG2a kappa	FJK-16s	Biotin	Invitrogen	13-5773-82
Isotypen- kontrolle	Ratte, IgG2a kappa	eBR2a	Biotin	Invitrogen	13-4321-82
Anti-Ratte CD45RA	Maus,	OX-33	Biotin	BioLegend	202303
Isotypen- kontrolle	Maus, IgG1 kapa	MOPC-21	Biotin	BioLegend	400104
Anti-Ratte CD68	Maus	ED1	Biotin	Bio Rad	MCA341B
Anti-Mensch, AntiMyeloperoxidase	Kaninchen	Polyklonal	Unkonjugiert	abcam	ab9535
Isotypen- kontrolle	Kaninchen, IgG Gesamtmolekül	Polyklonal	Unkonjugiert	Dianova	DLN-013121

StreptavidinHRP Polymer- konjugat	Sekundär- antikörper		Biotin	Sigma	S2438
Labbeled Polymer-HRP anti rabbit Kit	Sekundär- antikörper			Dako EnVision	K4010

2.3 Tabelle 3: PCR-Primer

Die im folgenden genannten Primer sind allesamt von Thermo Fisher Scientific hergestellt und richten sich gegen Strukturen von der Ratte. Die Sequenzen befinden sich im Anhang.

Gen	Chromosomen Lokalisation
Interferon, alpha 4 (INF α 4)	Chr.5: 106922563 - 106923132 on Build Rnor_6.0
Actin, beta (Actb)	Chr.12: 13715843 - 13718813 on Build Rnor_6.0
Interferon beta 1, fibroblast (INF β 1)	Chr.5: 106865192 - 106865746 on Build Rnor_6.0
Interleukin-17C (IL- 17C)	Chr.19: 55246926 - 55248678 on Build Rnor_6.0
CD274 (CD274/Pdcd1Ig1)	Chr.1: 247519890 - 247539659 on Build Rnor_6.0
Transmembranöses Protein 173 (TmeM 173)	Chr.18: 28529576 - 28535828 on Build Rnor_6.0
Mab-21 domain containing 1 (Mb21d1)	Chr.8: 85795312 - 85803610 on Build Rnor_6.0
Matrix Metallopeptidase 2 (MMP2)	Chr.19: 15542771 - 15570589 on Build Rnor_6.0

Matrix Metallopeptidase 8 (MMP8)	Chr.8: 5768808 - 5777741 on Build Rnor_6.0
Chemokin (C-X-C motif) Ligand 1 (CXCL1)	Chr.14: 18743678 - 18745457 on Build Rnor_6.0
Chemokin (C-X-C motif) Ligand 2 (CXCL2)	Chr.14: 18731346 - 18733391 on Build Rnor_6.0
Chemokin (C-C motif) Ligand 2 (CCL2)	Chr.10: 69412065 - 69413863 on Build Rnor_6.0
Chemokin Ligand 20 (CCL20)	Chr.9: 88918357 - 88921011 on Build Rnor_6.0
Chemokin Ligand 10 (CXCL10/IP-10)	Chr.14: 17210733 - 17212930 on Build Rnor_6.0
Interleukin 17A (IL17a)	Chr.9: 26841299 - 26844786 on Build Rnor_6.0

2.4 Tabelle 4: Tiermodell

Produkt	Hersteller
Wystar Kyoto Ratten	Charles River, Wilmington, USA
MPO Myeloperoxidase	Calbiochem, San Diego, USA
Complete Freund's Adjuvans	Chondrex, Woodinville, USA
Pertussis-Toxin	Sigma-Aldrich
Anti-IL-17A monoklonaler Antikörper Ratte Anti-Maus und Ratte Klon: eBio17CK15A5	eBioscience, San Diego, USA
Anti-IL-17C polyklonaler Antikörper Kaninchen Anti-Maus und Ratte	Invitrogen

IgG Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen	Merck Millipore
Monoklonale IgG2a Isotype Ratte (Isotype für IL-17A Antikörper) Klon: RTK2758	BioLegend, San Diego, USA

2.5 Tabelle 5: Geräte

Gerät	Hersteller
Kühlzentrifuge Rotina 35R	Hettich, Tuttlingen
Rotina 460 RS Zentrifuge	Hettich
Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific
IKA ® Vortex	Sigma Aldrich
GLW L46 Vortex	GLW, Würzburg
Mikroskop AXIO Imager. A1	Carl Zeiss, Köln
Sicherheitswerkbank Klasse II	Thermo Scientific
Eppendorf Research Pipette 1-10ul	Eppendorf

Finnpipette ® 5-50ul	Thermo Fisher Scientific
Finnpipette ® 50-200ul	Thermo Fisher Scientific
Finnpipette ® 100-1000ul	Thermo Fisher Scientific
Finnpipette ® 2-10ml	Thermo Fisher Scientific
Finnpipette ® 1-5ml	Thermo Fisher Scientific
Eppendorf Research Pipette 1-10ul	Eppendorf
Eppendorf Reference Pipette, 5-50ul	Eppendorf

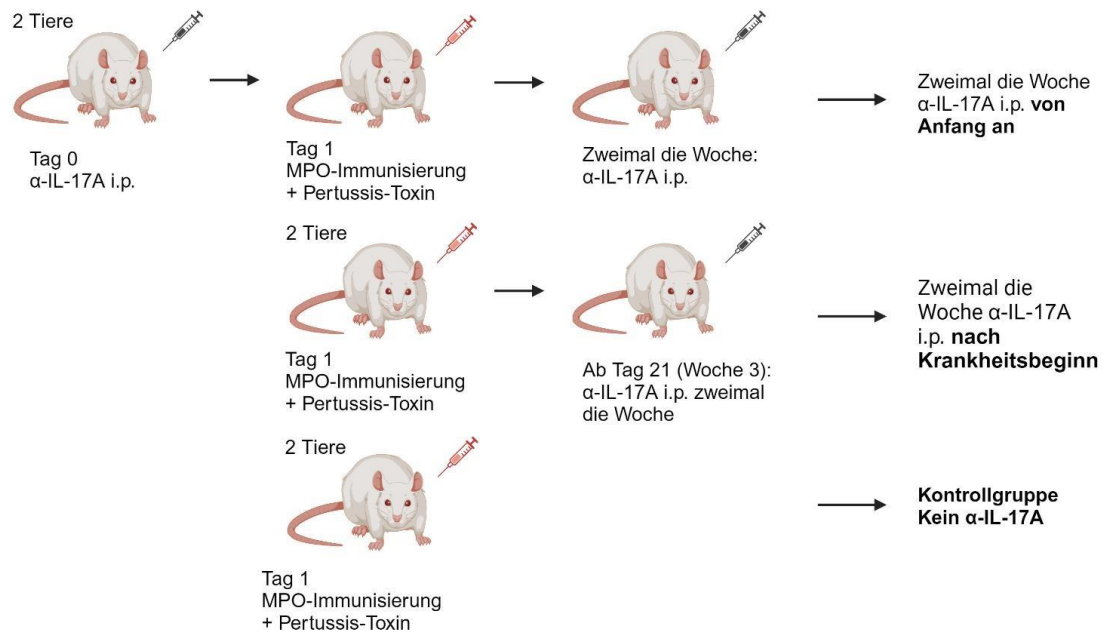
Eppendorf Reference Pipette, 50-200ul	Eppendorf
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Präzisionswaage	Kern, Balingen-Frommern
Mikroplattenleser Mithras LB940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Heracell™ 150 Inkubator	Thermo Scientific
Step One Plus RealTime PCR System	Applied Biosystems
Heizblockthermostat mit 0,5mL Einsatz	Ditabis, Pforzheim
Thermomixer comfort 0,5mL	Eppendorf
Wasserbad	GFL, Lauda-Königshofen
TissueLyser	Qiagen
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Power Pac HC	Bio Rad
Trans-Blot SD/Semi dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio Rad
Fusion Fx 7	Peqlab/Vilber
Eppendorf bio Photometer V1.35	Eppendorf

2.6 Methoden

2.6.1 Tiermodell

Für diese experimentelle Arbeit wurde das Tiermodell von Mark A Little (Little et al., 2009) herangezogen mit weiblichen Wistar Kyoto Ratten von Charles River, welche initial zwischen 100 und 140g gewogen haben und am Ende des Versuches 180-220g

schwer waren. Für die Induktion der Vaskulitis wurde den Ratten an Tag eins 1600µg/kg humane Myeloperoxidase (MPO) in einer Emulsion mit Freund's Adjuvans injiziert. Dazu wurde noch 800ng Pertussis Toxin intraperitoneal appliziert. Blutentnahmen aus der Schwanzvene wurden alle zwei Wochen und Urinentnahmen in metabolischen Käfigen wöchentlich durchgeführt. Nach sechs Wochen fand eine finale Blut- und Organentnahme statt. Dabei wurden die Nieren, Milzen und Lungen entnommen. Ein Teil davon wurde kryokonserviert, ein anderer für die RNA-Aufbereitung verwendet und der größte Teil wurde der histologischen Aufbereitung zugeführt. Die Versuchsgruppen bestanden jeweils aus sechs weiblichen Wistar-Kyoto Ratten. Der IL-17A Antikörper entstammt aus der Ratte und ist gegen Ratte und Maus gerichtet. Für die IL-17A Blockade erhielten die Ratten am Tag vor Immunisierung mit MPO jeweils 100µg oder 500µg IL17A Antikörper intraperitoneal (i.p.). Die Applikation wurde zwei Mal die Woche für insgesamt sechs Wochen durchgeführt (Insgesamt 200µg IL-17A Antikörper wöchentlich pro Tier). Eine weitere Gruppe an Tieren wurde an Tag 1 mit MPO immunisiert und erhielt ab dem einundzwanzigsten Tag jeweils 100µg des IL-17A Antikörpers zwei Mal wöchentlich i.p. für insgesamt drei Wochen. Die Kontrollgruppe erhielt nur die MPO-Immunisierung und ggfs. Gaben von Isotyp-Antikörpern. Für die IL-17C Blockade erhielten die Tiere am Tag vor der MPO-Immunisierung 100 µg des Antikörpers für IL17C intraperitoneal einmal wöchentlich für insgesamt sechs Wochen. Der Antikörper entstammt aus dem Kaninchen und ist gegen Maus und Ratte gerichtet. Die Kontrolltiere dieser Gruppe erhielten 100µg der Isotype für IL-17C einmal wöchentlich.



Finale Blut- und Organentnahme nach 6 Wochen

Abbildung 2: IL-17A Blockade im MPO-Vaskulitis Modell.

Zwei Tiere erhielten vor der MPO-Immunsierung und Pertussis-Boost den IL-17A Antikörper und dieser wurde zweimal die Woche i.p. appliziert. Zwei andere Tiere erhielten einundzwanzig Tage nach der MPO-Immunsierung den IL-17A Antikörper zweimal die Woche. Die zwei letzten Tiere erhielten keinen Antikörper und wurden demnach nur mit MPO immunisiert. Nach sechs Wochen fand dann die finale Blut- und Organentnahme statt. Created with BioRender.com

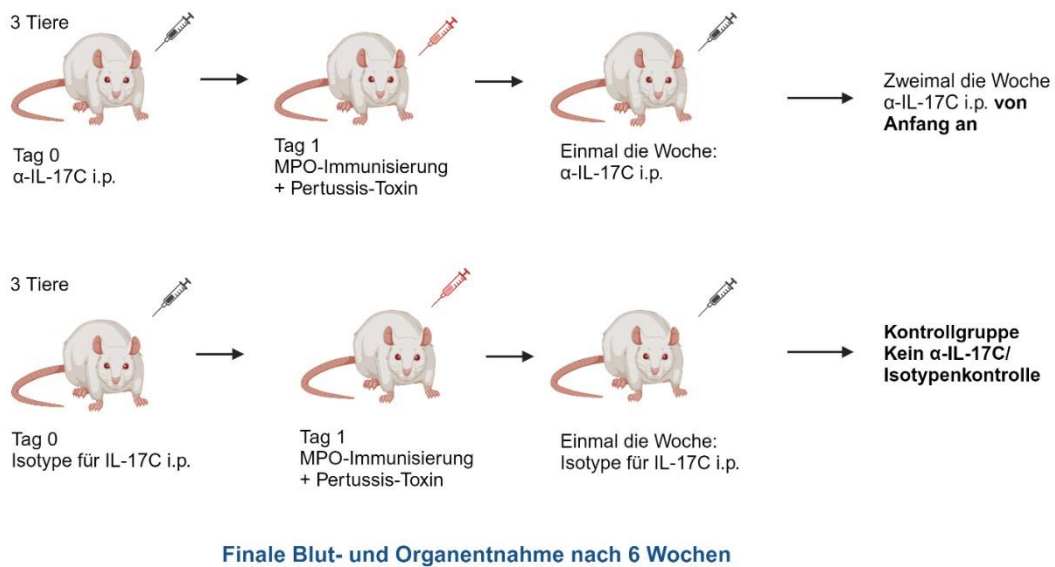


Abbildung 3: IL-17C Blockade im MPO-Vaskulitis Modell.

Drei Tiere erhielten vor MPO-Immunsierung und Pertussis-Boost den IL-17C Antikörper wöchentlich und die anderen drei Tiere erhielten stattdessen die Isotype wöchentlich intraperitoneal. Nach sechs Wochen fand die finale Blut- und Organentnahme statt. Created with BioRender.com

2.6.2 Quantifizierung von Anti-MPO und Albuminurie mittels ELISA

Für die Bestimmung von Anti-MPO Titern wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Verfahren verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden mit 100µl eines Coating Puffers beschichtet, dem humane Myeloperoxidase in einer Konzentration von 2µg/ml zugegeben wurde. Nach Beschichtung mit dem Puffer wurden die Platten über Nacht bei vier Grad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten zunächst dreimal mit Wasch Puffer gewaschen. Danach wurde jeweils 150µl Blocking Puffer je well hinzugefügt. Die Platten wurden danach abgedeckt bei 37 Grad für eine Stunde inkubiert. Nach Inkubation wurden die Platten viermal mit Wasch Puffer gewaschen. Die zu untersuchenden Proben wurden in Wasch Puffer von 1:100 bis 1:1 638 400 verdünnt und 100µl wurden je well appliziert. Dies erfolgte in doppelter Ausführung. Zwei Wells wurden dabei ausgelassen und dienten als Leerwert. Danach wurden die Platten bedeckt und bei 37 Grad inkubiert. Nach Inkubation wurden die Platten wieder dreimal mit Wasch

Puffer gewaschen. Nachfolgend wurde der Sekundärantikörper anti-Ratte IgG, welcher mit 1:20 000 in Wasch Puffer verdünnt wurde, mit jeweils 100µl pro well hinzugegeben. Darauf folgte die Bedeckung der Platten und Inkubation bei 37 Grad. Nach Waschung wurde 100µl je well von Tetramethylbenzidin Substrat hinzugefügt und bei Raumtemperatur für fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 100µl von 1N HCL je well hinzugefügt und die Absorption bei 450nm gemessen. Für die Bestimmung der Titer wurde dann die dreifache Leerwertmenge von den gemessenen Werten abgezogen. Für die Bestimmung der Albumin-Konzentration aus dem Urin wurde ein ELISA Kit von ALPCO verwendet.

2.6.3 Histologische Aufbereitung

Nach erfolgter Einbettung der Organe in Paraffin wurden 2µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, die in Hämatoxylin-Eosin (HE) und Periodic Acid Schiff (PAS) gefärbt wurden. Dafür wurden die Schnitte zuerst in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylol, 100%-, 96%-, 70% Ethanol) bis zu destilliertem Wasser entparaffiniert. Für die HEFärbung wurden die Schnitte dann für fünf Minuten in Hämalaun inkubiert und kurz mit destilliertem Wasser abgewaschen. Danach erfolgte für fünf Minuten eine Inkubation mit Scott'scher Lösung und wurden dann für zehn Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Hiernach wurden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser abgewaschen und in 1% Eosin-Lösung für eine Minute gefärbt und danach kurz mit destilliertem Wasser abgewaschen. Abschließend wurden die Schnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zum Xylol zugeführt und mit Vitro-Clud eingedeckt. Für die PAS-Färbung wurden die Schnitte für zehn Minuten in Perjodsäure inkubiert und dann kurz mit destilliertem Wasser abgewaschen. Danach erfolgte für zehn Minuten eine Inkubation mit Schiffs Reagenz und dann eine für zehn Minuten eine fließende Wässerung. Hiernach wurden die Schnitte für fünf Minuten in Hämalaun inkubiert und mit destilliertem Wasser abgewaschen. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit Scott'scher Lösung für fünf Minuten gefolgt von einer zehnmütigen Wässerung unter fließendem Wasser. Abschließend wurden die Schnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zum Xylol zugeführt und mit Vitro-Clud eingedeckt.

2.6.4 Glomerulärer Nierenschaden

Die Quantifizierung des glomerulären Nierenschadens erfolgte durch zwei geblindete unabhängige Beobachter. Dabei wurden jeweils 100 Glomeruli pro Schnitt und Versuchstier ausgezählt und zwischen abnormal und normal unterschieden. Daraus wurde dann ein prozentualer Schaden berechnet. Als abnormale Glomeruli wurden solche

gewertet, welche eine intra- und extraglomeruläre Proliferation, Halbmondbildung und fibrinoide Nekrosen aufwiesen.

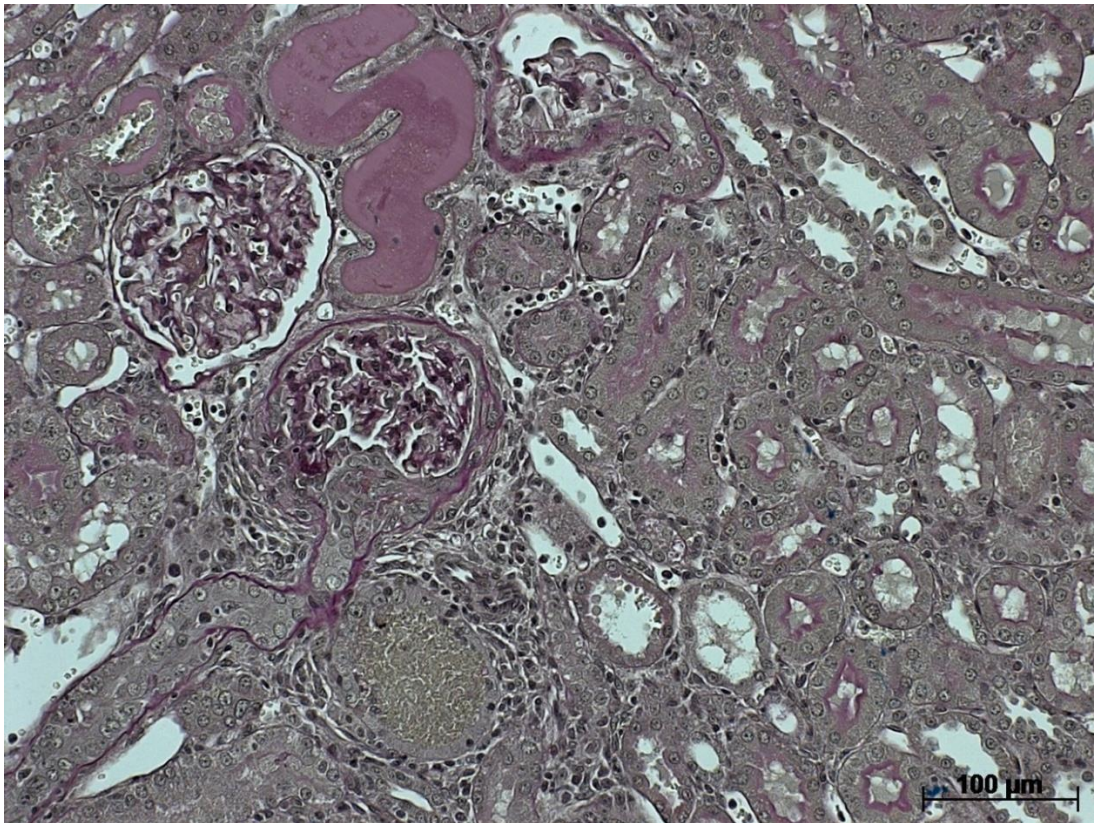


Abbildung 4: Histologisches Bild eines abnormalen Glomerulums in der Niere.

Zu sehen ist ein histologischer Ausschnitt von einer Niere mit PAS gefärbt. Darauf sieht man ein Glomerulum mit einem periglomerulärem Entzündungsinfiltrat sowie Proliferat der BowmanKapsel.

2.6.5 Petechiale Lungenblutungen

Die Petechien an der Lungenoberfläche wurden makroskopisch quantifiziert, indem die Petechien einzeln gezählt wurden. Dazu wurde die Lunge nach Organentnahme mit Formalin perfundiert und somit fixiert.

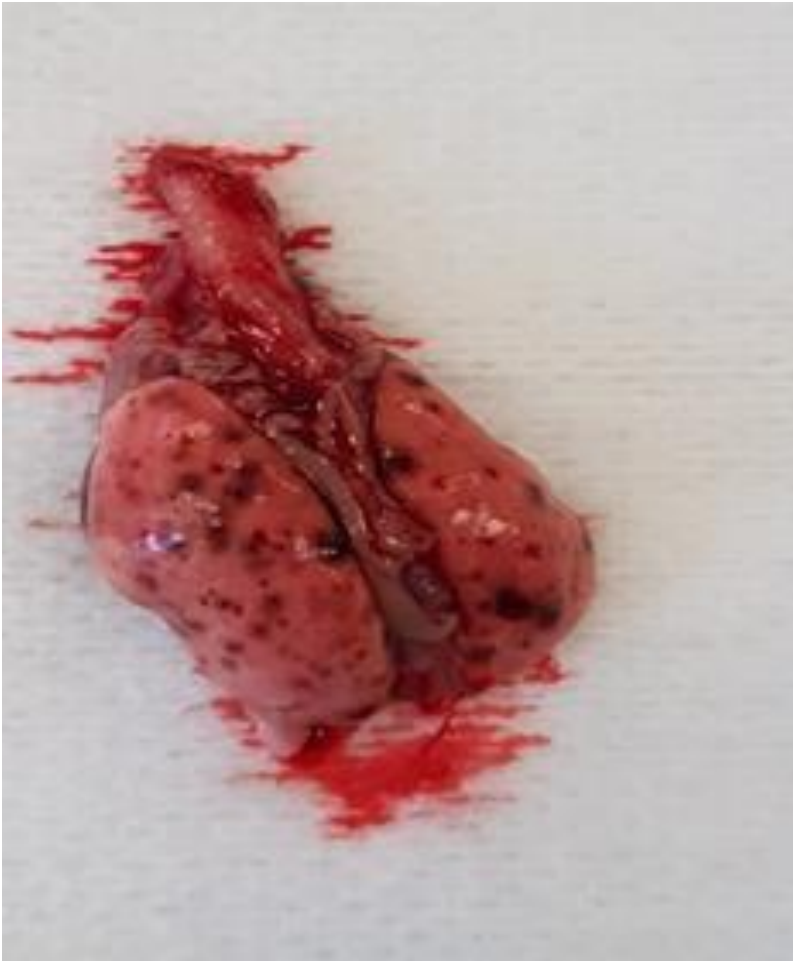


Abbildung 5: Petechiale Einblutungen an der Lungenoberfläche.

Exemplarisch ein makroskopisches Bild einer Lunge nach Organentnahme. Darauf sind viele kleine Petechien zu sehen.

2.6.6 Prozentualer Lungenschaden

Die histologischen Schnitte der Lungen wurden mit der Bearbeitungssoftware Aperio Image Scope Version 12.4.0.5043 von 2018 eingescannt und ausgewertet. Dabei wurde jeweils der Lungenflügel verwendet, der bei der Organentnahme manuell belüftet wurde, von dem anderen wurde Material für die RNA-Isolierung entnommen. Für die Auswertung wurde die Gesamtlungenfläche, sowie die Fläche der Infiltrate bestimmt und anhand dessen ein prozentualer Anteil berechnet.

2.6.7 Isolierung von RNA und Bestimmung der Genexpression mittels qPCR und der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode

Für die Aufbereitung der RNA bei Lungen von zwei, vier und sechs Wochen alten Tieren (MPO Tiere) wurde in Paraffin fixiertes Material verwendet. Die Isolation der RNA

erfolgte mittels Quick-RNA FFPE Kit von Zymo. Für die Aufbereitung der RNA wurde bei Nieren und Milzen sowie bei den Lungen aus Gruppen mit der Antikörper-Blockade unfixiertes Material verwendet. Die RNA Isolierung aus Nieren und Milzen wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Die Isolierung der RNA aus den Lungen erfolgte anhand der Trizol Methode. Dafür wurde das Lungengewebe mit einem Skalpell in kleine Stückchen geteilt und auf zwei SafeLock Cups verteilt. In jedem Cup befand sich außerdem eine Stahlperle und 1ml Trizol mit 10µl beta-mercaptoethanol. Nach 30minütiger Homogenisierung mit dem Tissue Lyser bei 50/s wurde 200µl Rnase freies Chloroform hinzugefügt und kurz durch Schwenken gemischt. Nach zwei bis drei Minuten wurden die Cups für fünfzehn Minuten bei 12000xg bei vier Grad zentrifugiert und die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach folgte die Hinzugabe von 5µl Glykogen (5mg/ul) und 600µl Isopropanol. Dies wurde dann durch Schwenken gemischt und bei -20 Grad für eine Stunde inkubiert. Daraufhin wurde für 30 Minuten bei 12000xg bei vier Grad zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde 1000µl von fünfundsiebzigprozentigem Ethanol hinzugefügt und für weitere dreißig Minuten bei vier Grad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Cups für fünf Minuten bei 12000 xg bei vier Grad zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Schritt mit dem Ethanol wurde noch einmal wiederholt und danach wurden die Cups für zehn bis 20 Minuten offengelassen, damit überschüssiges Ethanol verdampfen kann. Daraufhin wurde 20µl Wasser hinzugegeben und die Konzentration gemessen. Die Konzentrationen sowie die Absorptionen bei 260/280nm und 260/230nm der RNA wurden mittels Nanodrop Spectrophotometer gemessen. Danach wurde die RNA in allen Proben auf 125 ng/µl eingestellt und bei -80 Grad gelagert. Die Synthese von cDNA aus RNA wurde mit dem Reverse Transcription Kit von Qiagen durchgeführt und die fertige cDNA bei -20 Grad gelagert. Für die Durchführung der RealTime Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) wurde pro Reaktion ein MasterMix zusammengesetzt bestehend aus 1µl des jeweiligen TaqMan Primers, 10µl 2xMasterMix und 7µl Wasser. Je Well wurden danach 18µl MasterMix und 2µl der cDNA Probe pipettiert. Jede probe wurde dreifach bestimmt. Außerdem wurde für jeden Primer eine Kontrolle durchgeführt, bei der anstelle von cDNA, Wasser hinzugegeben wurde. Die delta delta cycle threshold (CT) Methode erlaubt Unterschiede in der Genexpression zwischen einer behandelten und unbehandelten Gruppe zu berechnen. Die unbehandelte Gruppe bestand aus Wistar-Kyoto Ratten, denen nur Natrium Chlorid verabreicht wurde. Dem gegenüber stehen die behandelten Tiere, die entweder nur MPO oder zusätzlich auch eine Antikörperblockade

erhielten. Der CT-Wert ist dabei definiert als die Nummer an PCR-Zyklen, die benötigt wird, damit das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert übertritt. Dafür werden die CT-Werte des jeweiligen Gens und eines Referenzgenes (beta-Actin benötigt) in behandelten und unbehandelten Gruppen. Der CT-Wert des Referenzgenes wird dann von dem des untersuchten Genes subtrahiert. Dies entspricht dem delta CT Wert. Für den delta delta CT-Wert wird der delta CT-Wert der Kontrollgruppe von dem delta CT-Wert der behandelten Gruppe subtrahiert. Um daraus den fold change zu berechnen, wird der delta delta CT-Wert potenziert. Dieser gibt Aufschluss darüber, ob ein Gen hoch- oder herunterreguliert ist.

2.6.8 Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antikörper und Zielstrukturen

Von den in Paraffin eingebetteten Lungen wurden Serienschnitte von eins bis zehn angefertigt. Dabei wurde immer die Lunge verwendet, von der kein Gewebe für die RNA bereitgestellt wurde.

	Färbung/Antikörper	Zielstruktur
1. Schnitt	HE	
2. Schnitt	PAS	
3. Schnitt	Anti-CD3	T-Zellen
4. Schnitt	Anti-FoxP3	Untergruppe der regulatorischen T-Helferzellen
5. Schnitt	Anti-CD45R	B-Zellen
6. Schnitt	Anti-CD68	Makrophagen
7. Schnitt	Anti-MPO	Neutrophile Granulozyten

Für die jeweiligen Färbungen wurden die Schnitte zuerst in einer absteigenden Alkoholreihe (100%-, 96%-, 70% Ethanol) bis zu destilliertem Wasser entparaffiniert. Anschließend wurde das zu färbende Gewebe mit PapPen umrandet. Für die Färbung von FoxP3 und CD3 wurde noch eine Zellpermeabilisierung mit 0,5% beziehungsweise 0,2% Triton X Lösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Hinterher erfolgte

eine dreifache Waschung mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS). Danach wurde ein Peroxidase Block durchgeführt mit 5mL 30% H₂O₂ und 45mL Methanol für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Hiernach wurde eine Hitzedemaskierung mit Citratpuffer oder mit Tris/EDTA für 45 Minuten in einem Wasserbad bei 95° durchgeführt. Bei der Färbung mit CD3 wurden die Schnitte danach mit einem Protein Block aus 5% normalem Ziegenserum für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für Färbungen mit einem biotingebundenen Sekundärantikörper wurde noch ein Avidin/Biotin Block durchgeführt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper beziehungsweise der Isotypenkontrolle (bei 4° über Nacht oder für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur). Hiernach wurde der Sekundärantikörper appliziert und anschließend mit DAB inkubiert. Zum Schluss wurden die Schnitte kurz mit Hämatoxylin gefärbt und mit Scott'schem Puffer und fließendem Wasser gebläut und nach Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe mit Vitro-Clud eingedeckelt.

2.6.9 Statistik

Die folgenden Ergebnisse wurden mittels der Software GraphPadPrism 8.0.1 analysiert. Als statistische Verfahren wurden dabei der Kruskal-Wallis und der Mann-Whitney U-Test verwendet. Der Kruskal-Wallis Test ist ein nichtparametrisches Testverfahren, welcher verwendet wird, um zu überprüfen, ob es signifikante Unterschiede zwischen den Medians von drei oder mehr unabhängigen Gruppen gibt. Der Mann-Whitney-U-Test ist ein nichtparametrischer Test, welcher überprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen zwei unabhängigen Gruppen vorliegt. Die bereitgestellten Daten werden als Median präsentiert, einschließlich der Angabe des 25. und 75. Perzentils. Eine statistische Signifikanz wird bei einem p-Wert <0,05 angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Unterschiede in Parametern für Krankheitsaktivität

3.1.1 Quantifizierung des Nierenschadens unter IL-17A und IL-17C

Blockade

Um die Krankheitsaktivität näher zu definieren, eignet sich für die Betrachtung des Nierenschadens das Ausmaß der Albuminurie. Es wurden Tiere, die keine IL-17A-Blockade erhielten, mit Tieren verglichen, die sich einer drei- oder sechswöchigen IL17A-Blockade (α -IL-17A 3W bzw. α -IL-17A 6W) unterzogen. Die Ergebnisse werden als Median dargestellt, einschließlich der 25. und 75. Perzentile zur besseren

Einschätzung der Verteilung. Hinsichtlich der IL-17A Blockade zeigten die Tiere von Woche eins bis sechs durchweg keine Verminderung der Albuminurie verglichen mit unbehandelten Tieren (Albuminurie in mg pro 24 Stunden; Woche 1: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 0,11mg (0,09; 0,15) vs. 0,17mg (0,13; 0,26), $p=0,31$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 0,15mg (0,10; 0,22) vs. 0,17mg (0,13; 0,26), $p>0,99$; Woche 2: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 0,17mg (0,13; 0,27) vs. 0,24mg (0,16; 0,36), $p=0,45$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 0,23mg (0,19; 0,25) vs. 0,24mg (0,16; 0,36), $p>0,99$; Woche 3: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 0,34mg (0,31; 1,15) vs. 1,64mg (0,51; 7,21), $p=0,55$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 3,89mg (0,53; 9,75) vs. 1,64mg (0,51; 7,21), $p>0,99$; Woche 4: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 3,96mg (0,86; 8,85) vs. 13,93mg (1,97; 29,40), $p=0,75$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 12,79mg (3,94; 29,28) vs. 13,93mg (1,97; 29,40), $p>0,99$; Woche 5: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 4,19mg (1,50; 24,02) vs. 24,59mg (5,51; 33,09), $p>0,99$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 18,16mg (3,95; 67,69) vs. 24,59mg (5,51; 33,09), $p>0,99$; Woche 6: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 4,71mg (1,65; 33,64) vs. 21,03mg (3,91; 50,37), $p=0,84$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 14,05mg (4,07; 38,77) vs. 21,03mg (3,91; 50,37), $p>0,99$). Ratten, welche die Isotypenkontrolle für IL-17A über sechs Wochen erhielten, zeigten eine in der Tendenz erhöhte Proteinausscheidung von Woche drei an, die bis Woche sechs stetig zunahm. In den ersten zwei Wochen war die Albuminurie auf einem ähnlichen Niveau verglichen mit unbehandelten Tieren (Woche 1: Isotype für IL-17A vs. Unbehandelt: 0,13mg (0,11; 0,32) vs. 0,17mg (0,13; 0,26), $p>0,99$; Woche 2: Isotype für IL-17A vs. Unbehandelt: 1,07mg (0,15; 12,85) vs. 0,24mg (0,16; 0,36), $p>0,99$; Woche 3: Isotype für IL-17A vs. Unbehandelt: 47,69mg (25,68; 57,04) vs. 1,64mg (0,51; 7,21), $p=0,08$; Woche 4: Isotype für IL-17A vs. Unbehandelt: 67,85mg (24,27; 98,23) vs. 13,93mg (1,97; 29,40), $p=0,37$; Woche 5: Isotype für IL-17A vs. Unbehandelt: 62,25mg (32,76; 122,9) vs. 24,59mg (5,51; 33,09), $p=0,38$; Woche 6: Isotype für IL-17A vs. Unbehandelt: 90,19mg (35,41; 188,69) vs. 21,03mg (3,91; 50,37), $p=0,32$). Bei der Gabe des Antikörpers gegen IL-17A zeigte sich ab Woche drei nach Krankheitsinduktion eine signifikante Reduktion der Albuminurie im Vergleich mit der Isotype für IL-17A (Woche 4: α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 3,96mg (0,86; 8,85) vs. 67,85mg (24,27; 98,23), $p=0,02$; Woche 5: α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 4,19mg (1,50; 24,02) vs. 62,25mg (32,76; 122,9), $p=0,04$; Woche 6: α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 4,71mg (1,65; 33,64) vs. 90,19mg (35,41; 188,69), $p=0,02$). Die sechswöchige Blockade von IL-17A bewirkte keine Reduktion der Albuminurie im Vergleich zur Isotypenkontrolle (Woche 1: α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 0,15mg (0,10; 0,22) vs. 0,13mg (0,11; 0,32), $p>0,99$; Woche 2: α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-

17A: 0,23mg (0,19; 0,25) vs. 1,07mg (0,15; 12,85), $p > 0,99$; Woche 3: α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 3,89mg (0,53; 9,75) vs. 47,69mg (25,68; 57,04), $p = 0,24$; Woche 4: α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 12,79mg (3,94; 29,28) vs. 67,85mg (24,27; 98,23), $p = 0,60$; Woche 5: α -IL17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 18,16mg (3,95; 67,69) vs. 62,25mg (32,76; 122,9), $p > 0,99$; Woche 6: α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 14,05mg (4,07; 38,77) vs. 90,19mg (35,41; 188,69), $p = 0,34$). Mit einer höheren anti-IL-17A Dosis war lediglich in der ersten Beobachtungswoche eine signifikante Reduktion der Albuminurie zu erzielen verglichen mit unbehandelten Tieren (Woche 1: α -IL-17A (5x) vs. Unbehandelt: 0,08mg (0,06; 0,09) vs. 0,17mg (0,13; 0,26), $p = 0,0029$). Bei Betrachtung der Albuminurie von Ratten mit der höheren anti-IL-17A Dosis, sowie der höheren Dosis für die Isotype für IL-17A zeigte sich keine signifikante Änderung der Albuminurie. Die Behandlung mit anti-IL-17C sowie deren Isotype führte in den ersten beiden Beobachtungswochen zu einer signifikanten Reduktion der Albuminurie verglichen mit unbehandelten Tieren (Woche 1: α -IL-17C vs. Unbehandelt: 0,06mg (0,04; 0,10) vs. 0,17mg (0,13; 0,26), $p = 0,03$; Isotype für IL-17C vs. Unbehandelt: 0,07mg (0,05; 0,10) vs. 0,17mg (0,13; 0,26), $p = 0,046$; Woche 2: α -IL-17C vs. Unbehandelt: 0,08mg (0,05; 0,11) vs. 0,24mg (0,16; 0,36), $p = 0,0088$; Isotype für IL-17C vs. Unbehandelt: 0,10mg (0,09; 0,14) vs. 0,24mg (0,16; 0,36), $p = 0,04$). Zwischen den Wochen drei und sechs war kein Unterschied in der Proteinausscheidung zwischen Tieren zu verzeichnen, die mit anti-IL-17C behandelt wurden und unbehandelten Tieren. Die Albuminurie zwischen der dritten und sechsten Beobachtungswoche war bei der Isotype für IL-17C tendenziell höher als die Albuminurie bei unbehandelten Tieren (Woche 3: α -IL-17C vs. Unbehandelt: 5,71mg (1,60; 28,92) vs. 1,64mg (0,51; 7,22), $p = 0,54$; Isotype für IL-17C vs. Unbehandelt: 3,08mg (2,23; 36,06) vs. 1,64mg (0,51; 7,22), $p = 0,46$; Woche 4: α -IL-17C vs. Unbehandelt: 35,63mg (2,26; 65,14) vs. 13,93mg (1,97; 29,40), $p = 0,75$; Isotype für IL-17C vs. Unbehandelt: 35,88mg (26,92; 79,18) vs. 13,93mg (1,97; 29,40), $p = 0,14$; Woche 5: α -IL-17C vs. Unbehandelt: 40,25mg (16,80; 71,20) vs. 24,59mg (5,51; 33,09), $p = 0,68$; Isotype für IL-17C vs. Unbehandelt: 88,93mg (28,14; 108,2) vs. 24,59mg (5,51; 33,09), $p = 0,06$; Woche 6: α -IL-17C vs. Unbehandelt: 59,95mg (18,84; 64,11) vs. 21,03mg (3,91; 50,37), $p = 0,77$; Isotype für IL-17C vs. Unbehandelt: 73,01mg (36,23; 102,4) vs. 21,03mg (3,91; 50,37), $p = 0,18$). Die Behandlung mit anti-IL-17C führte im Vergleich zur Isotypenkontrolle für IL-17C nicht zu einer geringeren Eiweißausscheidung (Woche 1: α -IL-17C vs. Isotype für IL-17C: 0,06mg (0,04; 0,10) vs. 0,07mg (0,05; 0,10), $p > 0,99$; Woche 2: α IL-17C vs. Isotype für IL-17C: 0,08mg (0,05; 0,11) vs. 0,10mg (0,09; 0,14), $p > 0,99$; Woche 3: α IL-17C vs. Isotype für IL-17C: 5,71mg (1,60; 28,92) vs.

3,08mg (2,23; 36,06), $p > 0,99$; Woche 4: α -IL-17C vs. Isotype für IL-17C: 35,63mg (2,26; 65,14) vs. 35,88mg (26,92; 79,18), $p = 0,94$; Woche 5: α -IL-17C vs. Isotype für IL-17C: 40,25mg (16,80; 71,20) vs. 88,93mg (28,14; 108,21), $p = 0,69$; Woche 6: α -IL-17C vs. Isotype für IL-17C: 59,85mg (18,84; 64,11) vs. 73,01mg (26,23; 102,37), $p > 0,99$.

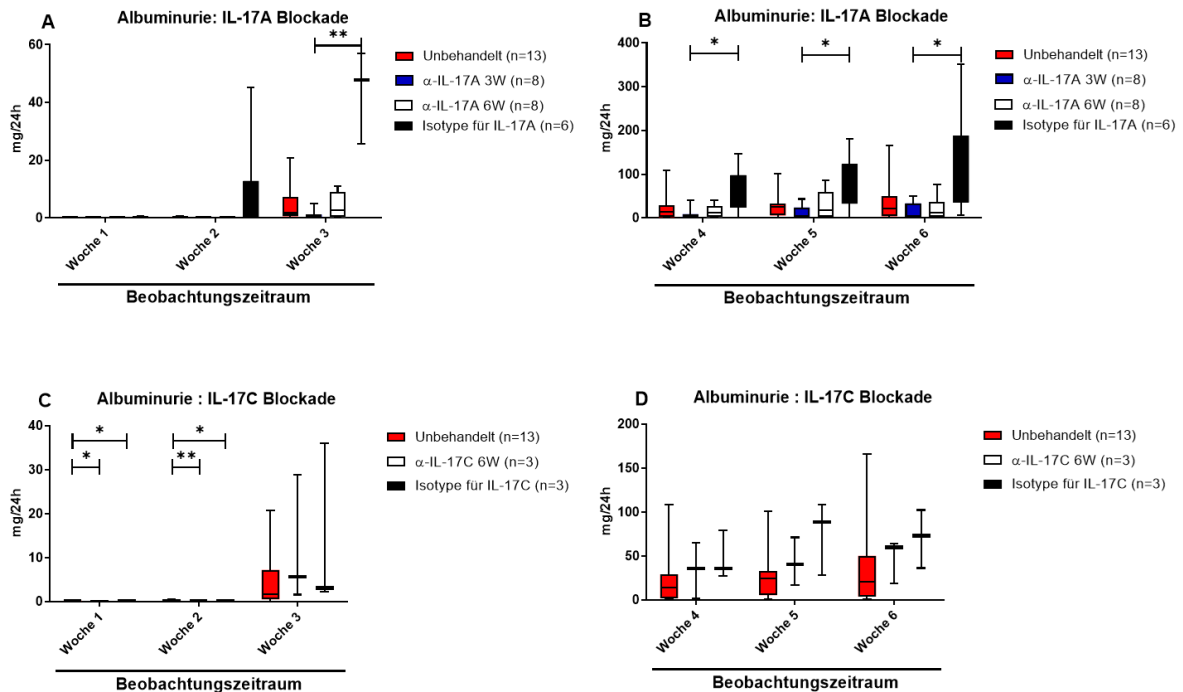


Abbildung 6: Albuminurie unter Behandlung mit dem anti-IL-17A und anti-IL-17C Antikörper.

(A) Ratten, welche drei Wochen mit anti-IL-17A behandelt wurden, zeigten in der dritten Beobachtungswoche eine signifikant niedrigere Albuminurie verglichen mit der Isotype. Die sechswöchige Blockade von IL-17A führte zu keiner signifikanten Änderung verglichen mit Isotypenkontrollen.

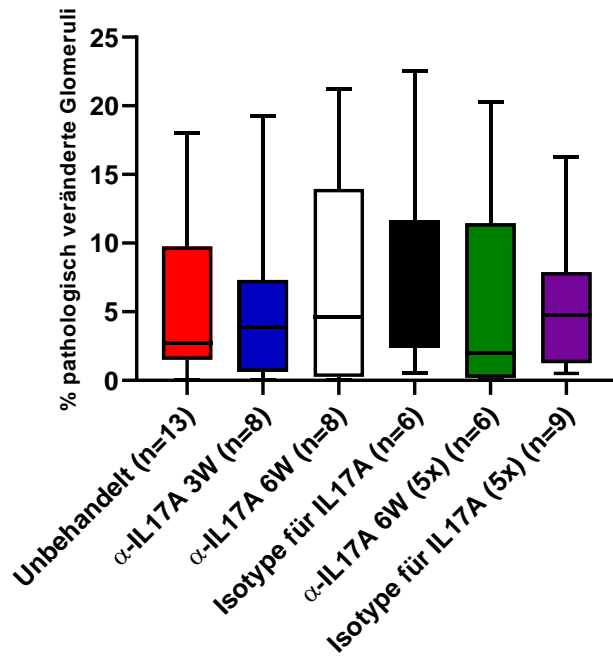
(B) Dreiwöchig behandelte anti-IL-17A Tiere zeigten zwischen der vierten und sechsten Beobachtungswoche eine signifikant niedrigere Albuminurie verglichen mit Isotypen. (C) In den ersten drei Beobachtungswochen bewirkte die IL-17C Blockade keine Reduktion der Eiweißausscheidung verglichen mit der Isotype. In den ersten beiden Behandlungswochen zeigt sich eine signifikante Reduktion der Albuminurie von anti-IL-17C behandelten Tieren, sowie Tieren bei denen die Isotype für IL-17C verwendet wurde im Vergleich zu unbehandelten Tieren. (D) Die Blockade von IL-17C führte zu keiner Änderung zwischen der vierten und sechsten Behandlungswoche.

Der p-Wert wurde durch den Kruskal-Wallis Test berechnet. Das Signifikanzniveau beträgt für * 5% und für ** 1%.

Als weiterer Parameter für die Quantifizierung des Nierenschadens eignet sich die histologische Betrachtung der Glomeruli der Nieren hinsichtlich pathologischer

Veränderungen. Dabei bewirkte die Blockade von IL-17A in den verschiedenen Konditionen keine wesentlichen Änderung des glomerulären Nierenschadens im Vergleich zu unbehandelten Tieren und den Isotypenkontrollen (glomerulärer Nierenschaden in % pathologisch veränderter Glomeruli: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 3,88% (0,63; 7,31) vs. 2,75% (1,50; 9,75), $p=0,77$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 4,63% (0,25; 13,94) vs. 2,75% (1,50; 9,75), $p=0,93$; Isotype für IL-17A vs. Unbehandelt: 5,88% (2,38; 11,63) vs. 2,75% (1,50; 9,75), $p=0,64$; α -IL-17A 6W (5x) vs. Unbehandelt: 2,00% (0,19; 11,44) vs. 2,75% (1,50; 9,75), $p=0,62$; Isotype für IL-17A (5x) vs. Unbehandelt: 4,75% (1,25; 7,88) vs. 2,75% (1,50; 9,75), $p>0,99$; α -IL17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 3,88% (0,62; 7,31) vs. 5,88% (2,38; 11,63), $p=0,43$; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 4,63% (0,25; 13,94) vs. 5,88% (2,38; 11,63), $p=0,60$; α -IL-17A 6W (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 2,00% (0,19; 11,44) vs. 4,75% (1,25; 7,88), $p=0,55$). Die Blockade von IL17C bewirkte ebenfalls keine Reduktion des glomerulären Nierenschadens verglichen mit unbehandelten Tieren und Isotypenkontrollen (α -IL-17C vs. Unbehandelt: 9,25% (3,50; 14,75) vs. 2,75% (1,50; 9,75), $p=0,30$; α -IL-17C vs. Isotype für IL-17C 9,25% (3,50; 14,75) vs. 20,00% (10,75; 24,75), $p=0,20$). Lediglich die Isotype für IL-17C wies einen erhöhten Anteil pathologisch veränderter Glomeruli auf, wenn man diese mit den unbehandelten Tieren verglich (20,00% (10,75; 24,75) vs. 2,75% (1,50; 9,75), $p=0,014$).

A Glomerulärer Nierenschaden: IL-17A Blockade



B Glomerulärer Nierenschaden: IL-17C Blockade

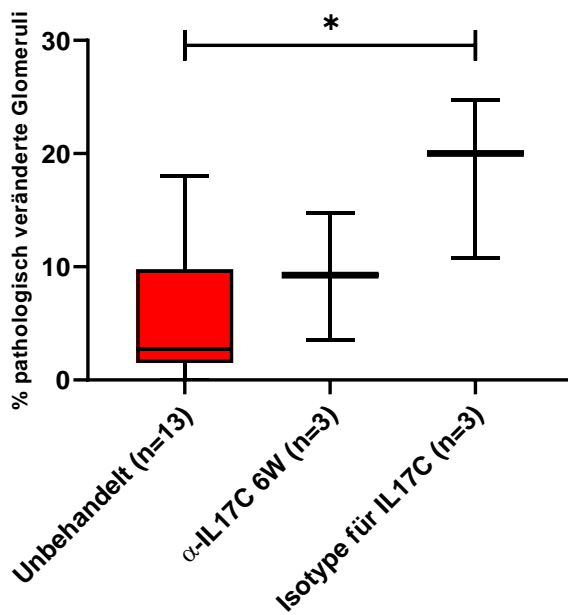


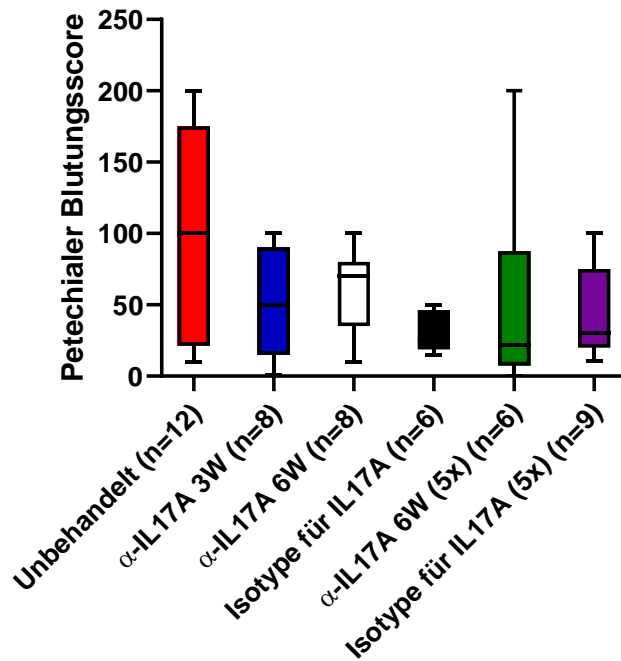
Abbildung 7: Histologisch quantifizierter glomerulärer Nierenschaden bei IL-17A und IL-17C Blockade.

- (A) Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen anti-IL-17A behandelten Tieren und Kontrollen.
- (B) Die Isotype für IL-17C wies einen höheren glomerulären Nierenschaden auf im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Zwischen der IL-17C Blockade und der Isotypenkontrolle war kein Unterschied zu verzeichnen. Der p-Wert wurde durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet.

3.1.2. Ausmaß der Lungendestruktion unter IL-17A und IL-17C Blockade

Für die Beurteilung der Lungendestruktion eignet sich die Betrachtung der Anzahl an petechialen Blutungen auf der Lungenoberfläche. Unter der Behandlung mit anti-IL-17A ließ sich keine signifikante Reduktion der Lungeneinblutungen im Vergleich zu unbehandelten Tieren und Isotypenkontrollen erzielen. Ebenso erbrachte eine Dosissteigerung von anti-IL-17A keine Minderung der petechialen Einblutungen verglichen mit der erhöhten Dosis der Isotype für IL-17A (Anzahl an petechialen Blutungen an der Lungenoberfläche: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 50,00 Blutungen (15,00; 90,00) vs. 100,00 Blutungen (21,25; 175,00), $p=0,306$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 70,00 Blutungen (35,00; 80,00) vs. 100,00 Blutungen (21,25; 175,00), $p=0,430$; α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 50,00 Blutungen (15,00; 90,00) vs. 25,00 Blutungen (18,75; 46,25), $p=0,29$; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 70,00 Blutungen (35,00; 80,00) vs. 25,00 Blutungen (18,75; 46,25), $p=0,053$; α -IL17A (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 21,50 Blutungen (7,50; 87,50) vs. 30,00 Blutungen (20,00; 75,00), $p=0,51$). Bei Betrachtung der petechialen Blutungen von anti-IL-17C behandelten Ratten zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Tieren und der Isotypenkontrolle ebenfalls kein signifikanter Unterschied (α -IL-17C vs. Unbehandelt: 50,00 Blutungen (25,00; 200,00) vs. 100 Blutungen (21,25; 175,00), $p=0,85$; α -IL-17C vs. Isotype für IL-17C: 50,00 Blutungen (25,00; 200,00) vs. 100 Blutungen (50,00; 100,00), $p=0,90$).

A Petechiale Lungenblutungen: IL-17A Blockade



B Petechiale Lungenblutungen: IL-17C Blockade

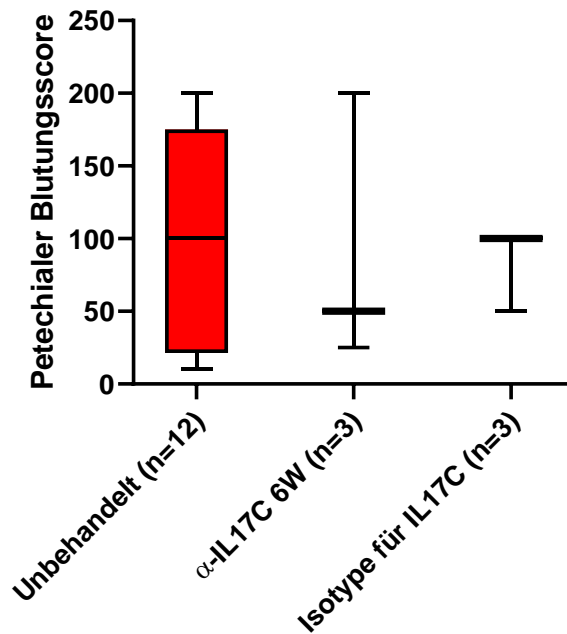


Abbildung 8: Pulmonale Vaskulitis unter IL-17A und IL-17C Blockade

(A) Die Behandlung mit anti-IL-17A, sowie die fünffache Dosis davon, zeigten keine Reduktion der petechialen Blutungen verglichen mit Isotypenkontrollen.

(B) Die Behandlung mit anti-IL-17C bewirkte keine Änderung der Anzahl der Lungenblutungen. Der p-Wert wurde durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet.

Als weiterer Parameter für den Lungenschaden dient der histologisch quantifizierte Anteil destrukturierter Lungenareale. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der dreiwöchigen Behandlung mit anti-IL-17A und unbehandelten Tieren (Prozentualer Anteil von Infiltraten in Lungenschnitten: 0,65% (0,10; 1,90) vs. 1,11% (0,21; 2,30), $p=0,859$). Ebenso war durch die sechswöchige Blockade von IL-17A kein Unterschied zu verzeichnen (1,40% (0,61; 2,02) vs. 1,11% (0,21; 2,30), $p=0,937$).

Anteil Infiltrate von Gesamtfläche in Lungen: IL-17A Blockade

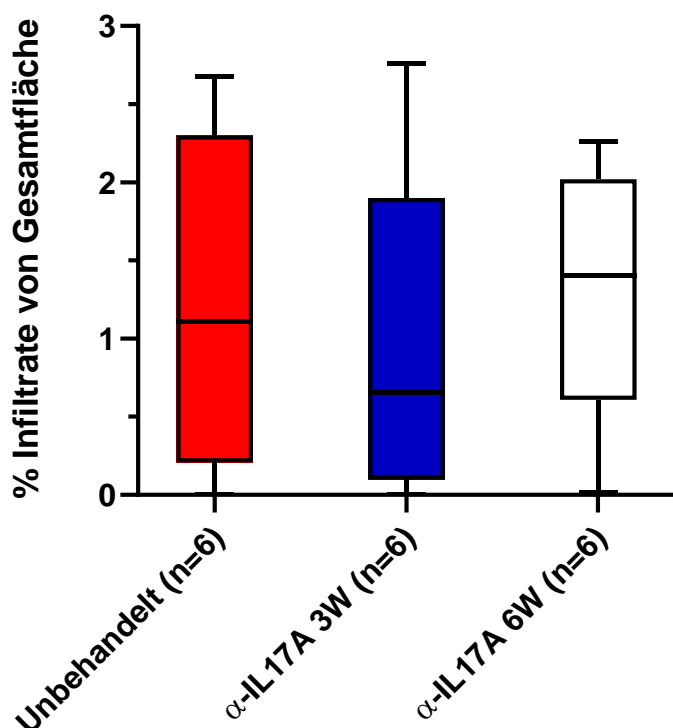


Abbildung 9: Prozentualer Anteil infiltrierter Lungenareale unter IL-17A Blockade.

Bei der Behandlung mit anti-IL-17A zeigte sich keine Änderung befallener Lungenareale verglichen mit unbehandelten Tieren. Der p-Wert wurde durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet.

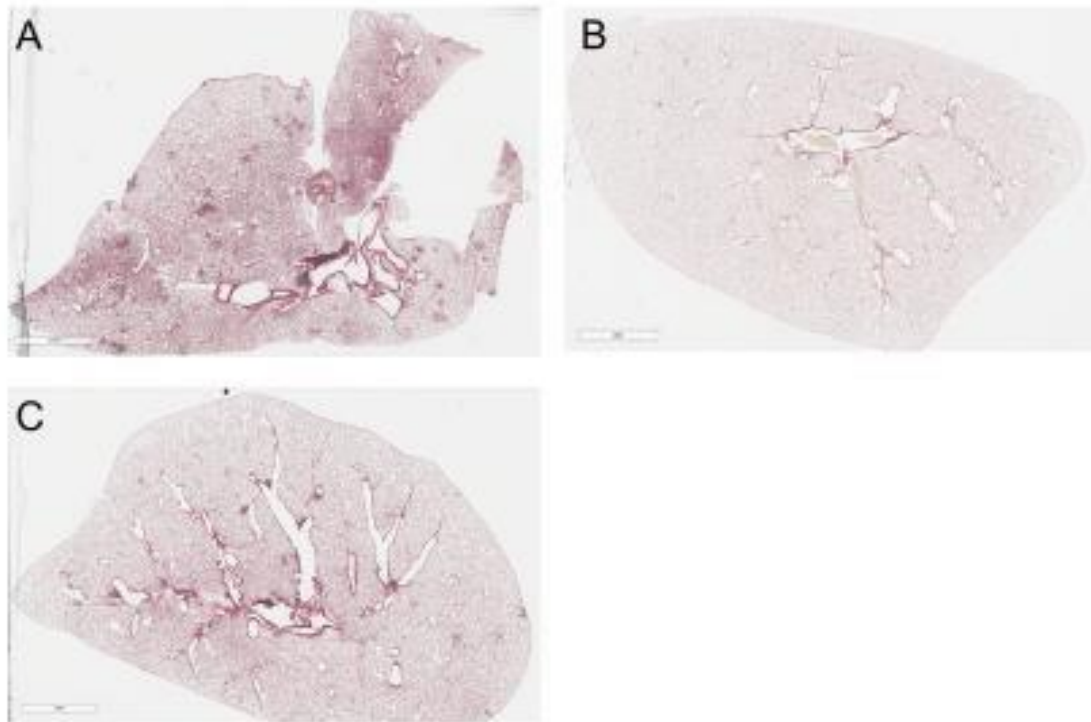


Abbildung 10: Histologische Übersichtsaufnahmen von Lungen.

Der Tötungszeitpunkt war bei allen Tieren nach sechs Wochen. (A) Lungenschnitt einer Ratte, welche nur mit MPO immunisiert wurde. (B) Lungenschnitt eines Kontrolltieres, welchem nur NaCl verabreicht wurde. (C) Lungenschnitt einer Ratte unter sechswöchiger IL-17A Blockade.

3.2. Beteiligte Zelltypen an der Lungendestruktion bei unbehandelten und mit anti-IL-17A behandelten Tieren

Für die Darstellung der verschiedenen Zelltypen in den Lungeninfiltraten eignete sich die immunhistochemische Anfärbung von Oberflächenstrukturen und Transkriptionsfaktoren. Zudem wurden die Färbungen exemplarisch zwischen unbehandelten und mit drei bzw. sechs Wochen mit anti-IL-17A behandelten Individuen verglichen. Dabei war bei dem unbehandelten Tier (Abbildungen 11) ein hoher Anteil der Zellen CD3 und CD68 positiv. Ein geringerer Anteil der Zellen war positiv für MPO. Zellen, die eine Positivität für FoxP3 und CD45RA zeigten, fanden sich nur vereinzelt.

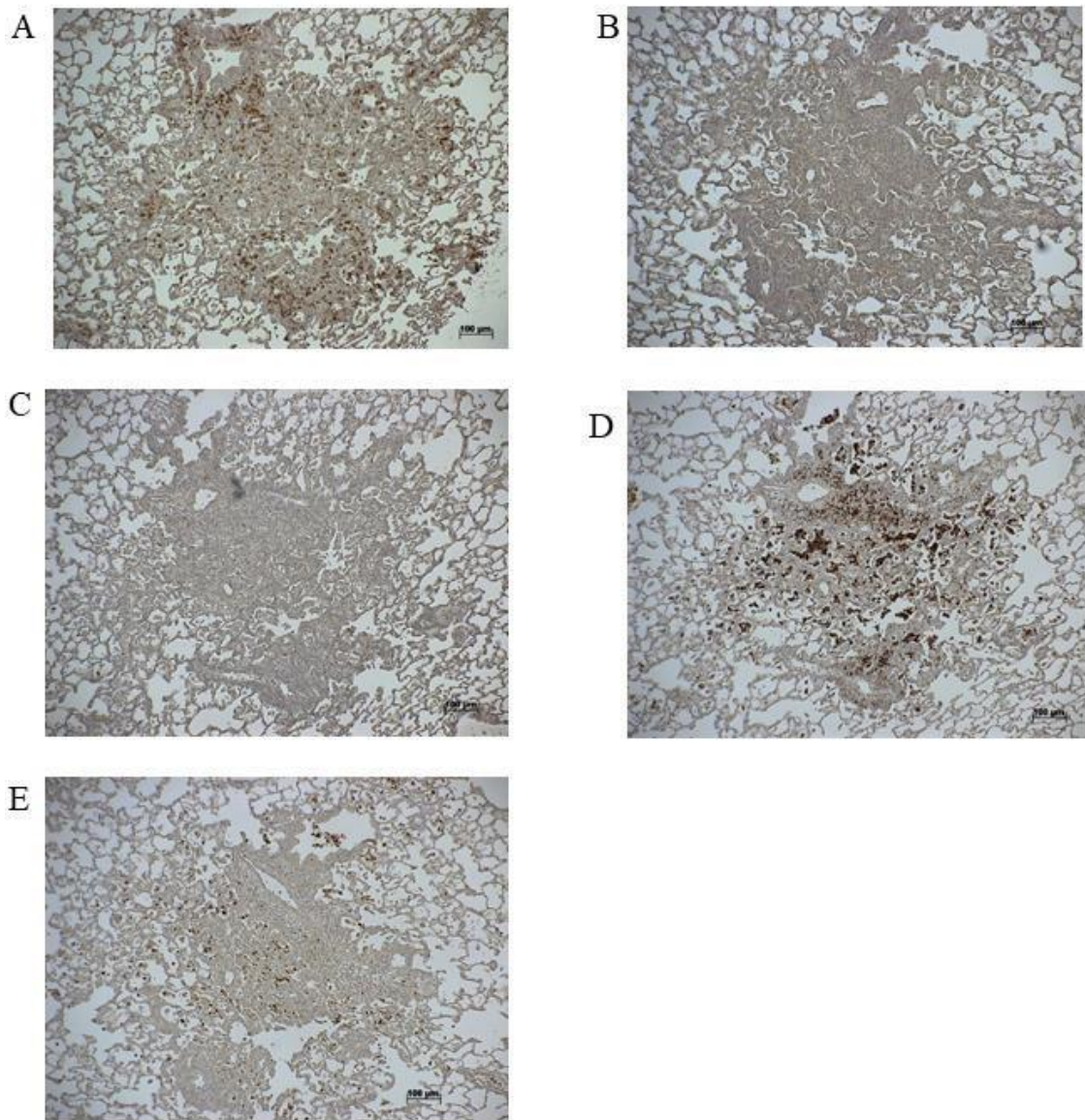


Abbildung 11: Bilderreihe lichtmikroskopischer Aufnahmen von immunhistochemischen Lungenschnitten eines unbehandelten Tieres.

Dargestellt sind die Färbungen für anti-CD3 (A), für anti-FoxP3 (B), für anti-CD45RA (C), sowie für anti-CD68 (D) und für anti-MPO (E).

Viele Zellen zeigten sich positiv für CD3 und nur wenige Zellen für FoxP3. Vereinzelt Zellen waren positiv für CD45RA. Eine große Menge an Zellen zeigten Positivität für CD68 und für MPO.

Bei dem Tier welches drei Wochen lang mit anti-IL-17A behandelt wurde (Abbildung 12), zeigten sich ebenfalls viele CD3 und CD68 positive Zellen. Vereinzelt ließen sich FoxP3 positive Zellen finden. Positive Zellen für MPO waren in einem geringeren Umfang enthalten. Zellen mit einer Positivität für CD45RA waren wiederum kaum enthalten.

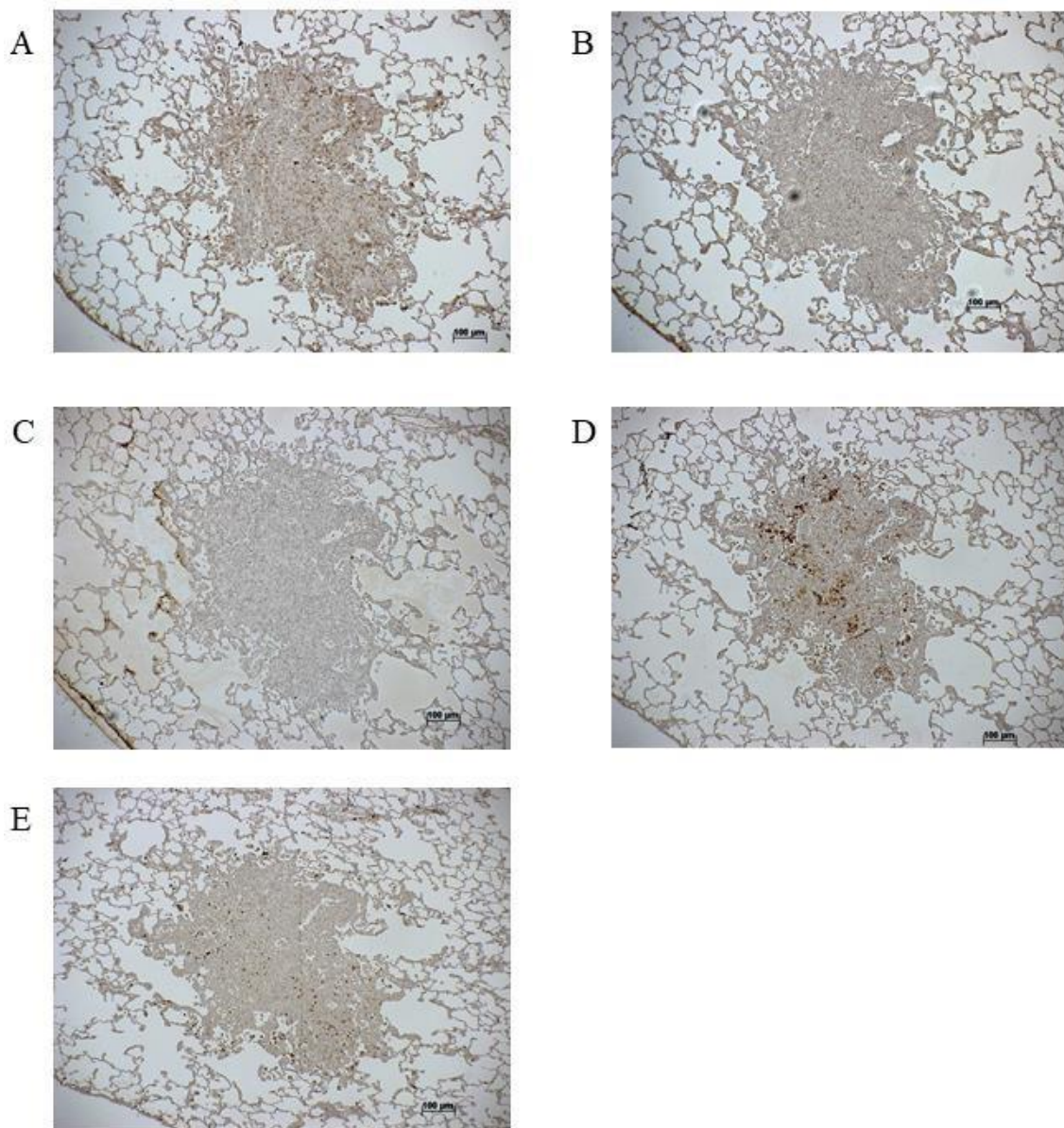


Abbildung 12: Bilderreihe lichtmikroskopischer Aufnahmen von immunhistochemischen Lungenschnitten von einem Tier mit dreiwöchiger anti-IL-17A Behandlung.

Dargestellt sind die Färbung für CD3 (A), für FoxP3 (B), für CD45RA (C), sowie für CD68 (D) und für MPO (E). Ebenso zeigte sich ein hoher Anteil von CD3 und CD68 positiven Zellen. Geringerer Anteil von MPO-positiven Zellen war zu sehen. Lediglich einzelne FoxP3 positive Zellen und kaum CD45RA positive Zellen waren zu sehen.

Bei den Lungeninfiltraten eines sechs Wochen lang mit anti-IL-17A behandelten Tieres (Abbildung 13) waren ebenso viele CD3 und CD68 positive Zellen. Ein kleinerer Anteil der Zellen zeigte Positivität für MPO. FoxP3 und CD45RA positive Zellen waren nur vereinzelt vorhanden.

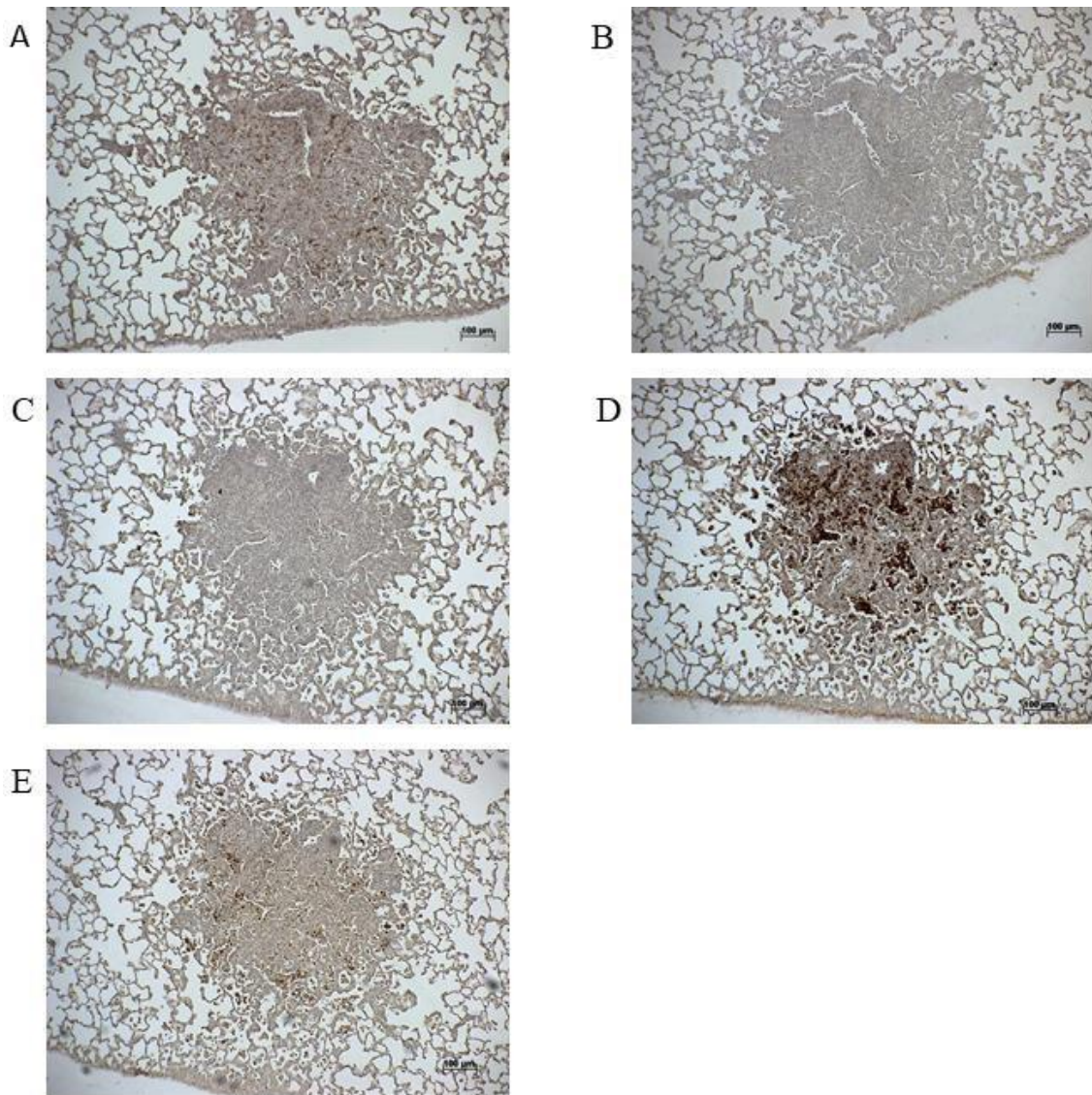


Abbildung 13: Bilderreihe lichtmikroskopischer Aufnahmen von immunhistochemischen Lungenschnitten von einem Tier mit sechswöchiger anti-IL-17A Behandlung.

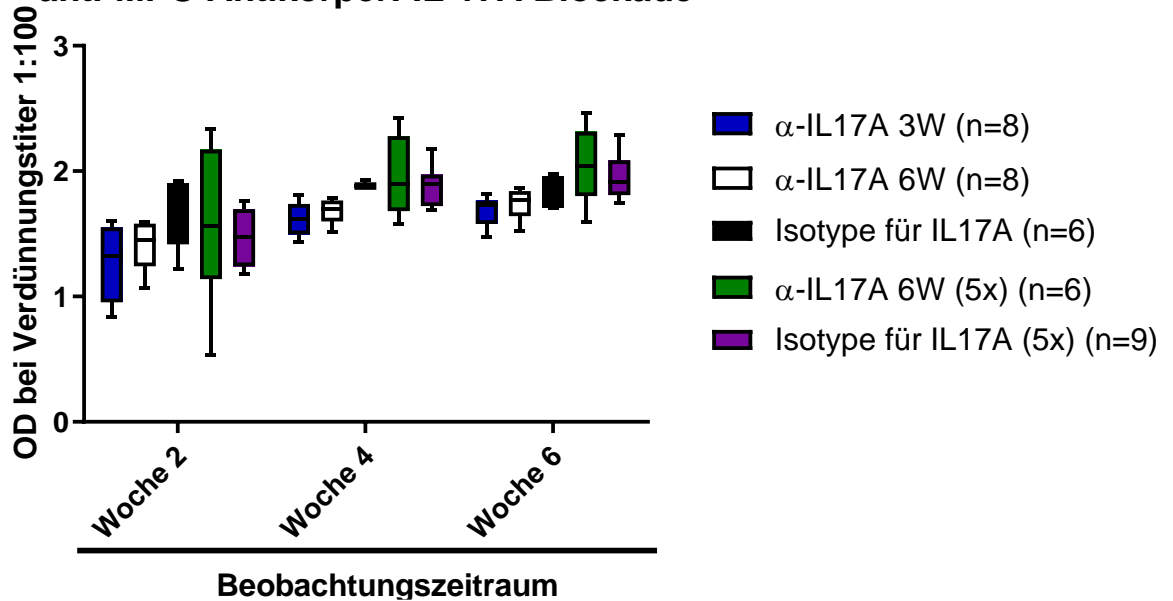
Dargestellt sind die Färbung für CD3 (A), für FoxP3 (B), für CD45RA (C), sowie für CD68 (D) und für MPO (E). Es zeigte sich ein hoher Anteil an CD3 und CD68 positiven Zellen, sowie ein kleinerer Anteil an MPO positiven Zellen. FoxP3 positive Zellen fanden sich vereinzelt und CD45RA positive Zellen waren kaum zu finden.

3.3. Höhe des anti-MPO Verdünnungstiters

Neben der Quantifizierung des Organschadens eignet sich auch die Höhe und der Verlauf der optischen Dichte der MPO-Photometrie bei einem Verdünnungstiter von 1:100 als Marker für die Krankheitsaktivität. Nach der zweiten Beobachtungswoche (Abb. 14A) war der Verdünnungstiter unter anti-IL-17A Behandlung ähnlich hoch ausgeprägt wie der bei Isotypenkontrollen (Höhe der optischen Dichte bei einem Verdünnungstiter von 1:100: α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 1,33 OD (0,95; 1,55) vs. 1,67 OD (1,42;

1,90), $p=0,208$; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 1,45 OD (1,24; 1,58) vs. 1,67 OD (1,42; 1,90), $p=0,746$). Die Erhöhung der anti-IL-17A Dosis zeigte ebenso wie die Behandlung mit der einfachen Dosis keine Reduktion des Verdünnungstiters in Referenz zu dem Titer von Isotypenkontrollen (α -IL-17A 6W (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 1,56 OD (1,14; 2,17) vs. 1,47 OD (1,24; 1,70), $p>0,999$). Nach der vierten Beobachtungswoche war der Titer unter IL17A Blockade unverändert gegenüber dem der Kontrolltiere (α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 1,62 OD (1,50; 1,74) vs. 1,88 OD (1,87; 1,93), $p=0,100$; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 1,70 OD (1,60; 1,77) vs. 1,88 OD (1,87; 1,93), $p=0,339$). Die Dosiserhöhung von anti-IL-17A führte zu keiner Reduktion der Titerstufe im Vergleich zur Isotypenkontrolle (α -IL17A 6W (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 1,90 OD (1,68; 2,28) vs. 1,90 OD (1,72; 1,97), $p>0,999$). Nach sechs Wochen zeigte sich unter IL-17A Blockade im Vergleich zu Ratten, welche die Isotypenkontrolle erhielten, kein signifikanter Unterschied (α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 1,73 OD (1,58; 1,76) vs. 1,86 OD (1,71; 1,96), $p=0,425$; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 1,77 OD (1,64; 1,84) vs. 1,86 OD (1,71; 1,96), $p>0,999$). Gleichermaßen ließ sich auch keine Minderung der Titerhöhe unter der Blockade von IL-17A mit der Dosiserhöhung erzielen im Vergleich zur Isotypenkontrolle (α -IL-17A 6W (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 2,04 OD (1,80; 2,31) vs. 1,92 OD (1,81; 2,09), $p>0,999$). Zwischen anti-IL-17C behandelten Tieren und Isotypenkontrollen war in der zweiten Beobachtungswoche kein signifikanter Unterschied festzustellen (2,16 OD (1,89; 2,25) vs. 1,93 OD (1,68; 2,09), $p>0,999$). Ebenso zeigte sich keine Änderung der Titerhöhe nach vier Wochen zwischen anti-IL-17C behandelten Tieren und Isotypenkontrollen (2,21 OD (1,97; 2,27) vs. 2,13 OD (1,95; 2,16), $p>0,999$). Auch nach sechs Wochen Beobachtungsdauer fand sich kein Unterschied des Autoantikörpertiters bei Tieren mit IL-17C Blockade und Kontrollen (2,32 OD (2,01; 2,33) vs. 2,16 OD (1,99; 2,25), $p>0,999$).

A anti-MPO Antikörper: IL-17A Blockade



B anti-MPO Antikörper: IL-17C Blockade

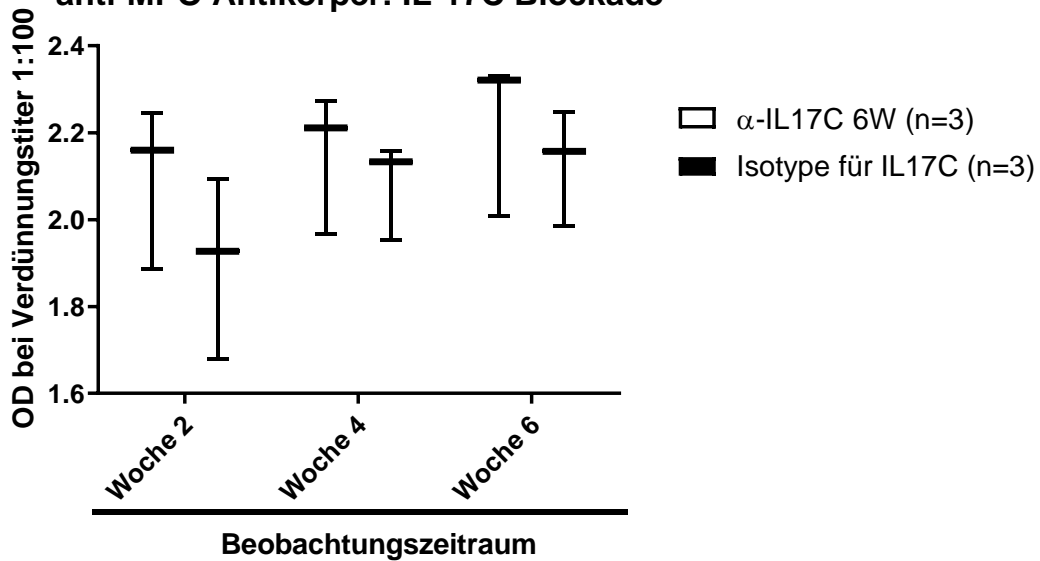


Abbildung 14: Anti-MPO Verdünnungstiter von Tieren mit anti-IL-17A und anti-IL-17C Behandlung.

- (A) Unter der Behandlung mit anti-IL-17A zeigten sich keine wesentlichen Titerveränderungen.
- (B) Ebenso war kein Unterschied zwischen anti-IL-17C behandelten Tieren und Isotypenkontrollen zu verzeichnen. Der p-Wert wurde durch den Kruskal-Wallis-Test berechnet.

3.4. Genexpression immunmodulatorischer Gene unter IL-17A und IL17C Blockade

3.4.1 Unterschiede der Genexpression bei den blockierten Zielgenen IL-17A und IL-17C

Tabelle 7: Übersicht der Genexpression von IL-17A und IL-17C unter Antikörpertherapie

	α -IL-17A 3W	α -IL-17A 6W	α -IL-17A 6W (5x)	α -IL-17C 6W
Lunge: IL-17A	↘	↓	↔	↗
Niere: IL-17C	↔	↔	↔	↔
Milz: IL-17C	↔	↔	↔	↔
Lunge: IL-17C	↑	↑	↔	↘

Als Referenzwert für die Pfeilrichtung gilt dabei die zugehörige Isotypenkontrolle (Isotype für IL-17A und 5x Isotype für IL-17A, sowie die Isotype für IL-17C). ↑ erhöhte Genexpression, ↓ erniedrigtes Expressionsniveau, ↔ unverändertes Expressionsniveau, ↗ tendenzielle Erhöhung der Expression ohne statistische Signifikanz, ↘ tendenzielle Minderung der Expression ohne statistische Signifikanz

Die Behandlung bei Tieren mit anti-IL-17A führte zu einer tendenziell verminderten Genexpression von IL-17A in der Lunge im Gegensatz zu unbehandelten Tieren (Fold Change über Kontrolle: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 2,43 fold change (fc) (0,46; 3,78) vs. 7,00 fc (0,50; 9,39), $p=0,26$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 0,77 fc (0,39; 3,91) vs. 7,00 fc (0,50; 9,39), $p=0,33$). Verglichen mit der Isotype für IL-17A zeigten sechswöchig anti-IL-17A behandelte Ratten eine geringere pulmonale IL-17A Expression (α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 2,43 fc (0,46; 3,78) vs. 6,48 fc (2,92; 12,11), $p=0,07$; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 0,77 fc (0,39; 3,91) vs. 6,48 fc (2,92; 12,11), $p=0,04$). Die Erhöhung der Dosis von IL-17A führte zu keinem Unterschied der Genexpression verglichen mit unbehandelten Tieren und der Dosissteigerung der Isotype für IL-17A (α -IL-17A 6W (5x) vs. Unbehandelt: 4,09 fc (0,58; 9,89) vs. 7,00 fc (0,50; 9,39), $p=0,776$; α -IL-17A 6W (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 4,09 fc (0,58; 9,89) vs. 2,79 fc (0,96; 6,54), $p=0,78$). Die Blockade von IL-17C führte zu einer erhöhten Genexpression von IL-17A in der Lunge verglichen mit unbehandelten Ratten (45,25 fc (14,51; 124,50) vs. 7,00 fc (0,50; 9,39), $p=0,009$). Im Vergleich zur Isotypenkontrolle ergab sich eine tendenzielle Erhöhung (45,25 fc (14,51; 124,50) vs. 16,51 fc (0,92; 50,58), $p=0,70$).

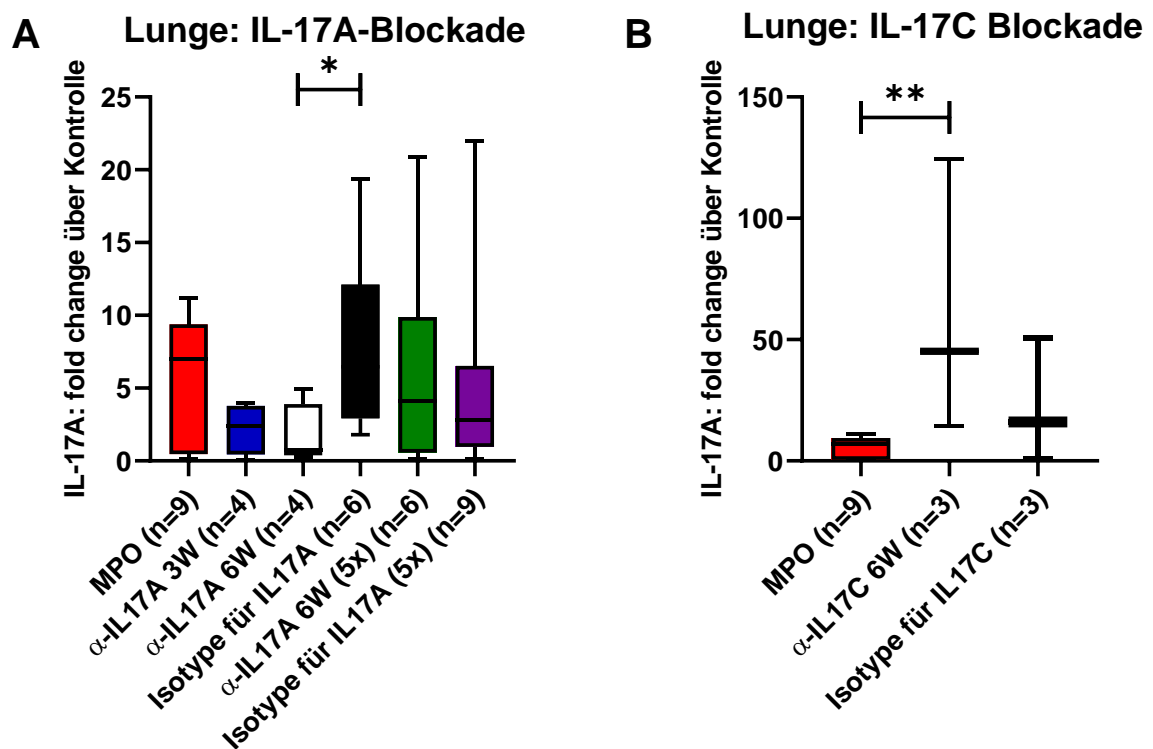


Abbildung 15: pulmonale Genexpression von IL-17A unter anti-IL-17A Behandlung und anti-IL-17C Behandlung.

(A) Bei der sechswöchigen Blockade von IL-17A zeigte sich eine Erniedrigung der Genexpression verglichen mit der Isotypenkontrolle. Die Dosissteigerung von anti-IL-17A ergab wiederum keinen Unterschied im Vergleich zur Isotypenkontrolle.

(B) Die Blockade von IL-17C führte zu einer tendenziellen Erhöhung der pulmonalen IL-17A Expression verglichen mit den Kontrolltieren. Der p-Wert wurde durch den Mann-Whitney-U Test berechnet. Das Signifikanzniveau beträgt für * 5% und für ** 1%. Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

Die Genexpressionshöhe von IL-17C in der Niere war bei unbehandelten Tieren nach zwei (fold change über Kontrolle: 0,84 fc (0,75; 1,04)) und vier Wochen (1,14 fc (0,59; 1,29)) Beobachtungsdauer unverändert. Nach sechs Wochen stieg die Höhe der Expression von IL-17C tendenziell an (0,89 fc (0,61; 1,57)). In der Milz war die Expression von IL-17C zwei Wochen nach Krankheitsinduktion herunterreguliert (0,49 fc (0,38; 0,75)) und stieg nach vier Wochen stark an (0,88 fc (0,65; 9,40)). Nach sechs Wochen fiel die Genexpressionshöhe wieder leicht ab (1,30 fc (0,65; 2,55)), verglichen mit den vier Wochen Tieren. In der Lunge war die Expressionshöhe von IL-17C zum Zeitpunkt von zwei Wochen deutlich vermindert (0,23 fc (0,11; 0,52)) und stieg nach vier

Wochen nur leicht an (0,81 fc (0,47; 1,23)). Nach sechs Wochen war die Expressionshöhe von IL-17C tendenziell erhöht (0,87 fc (0,59; 1,78)).

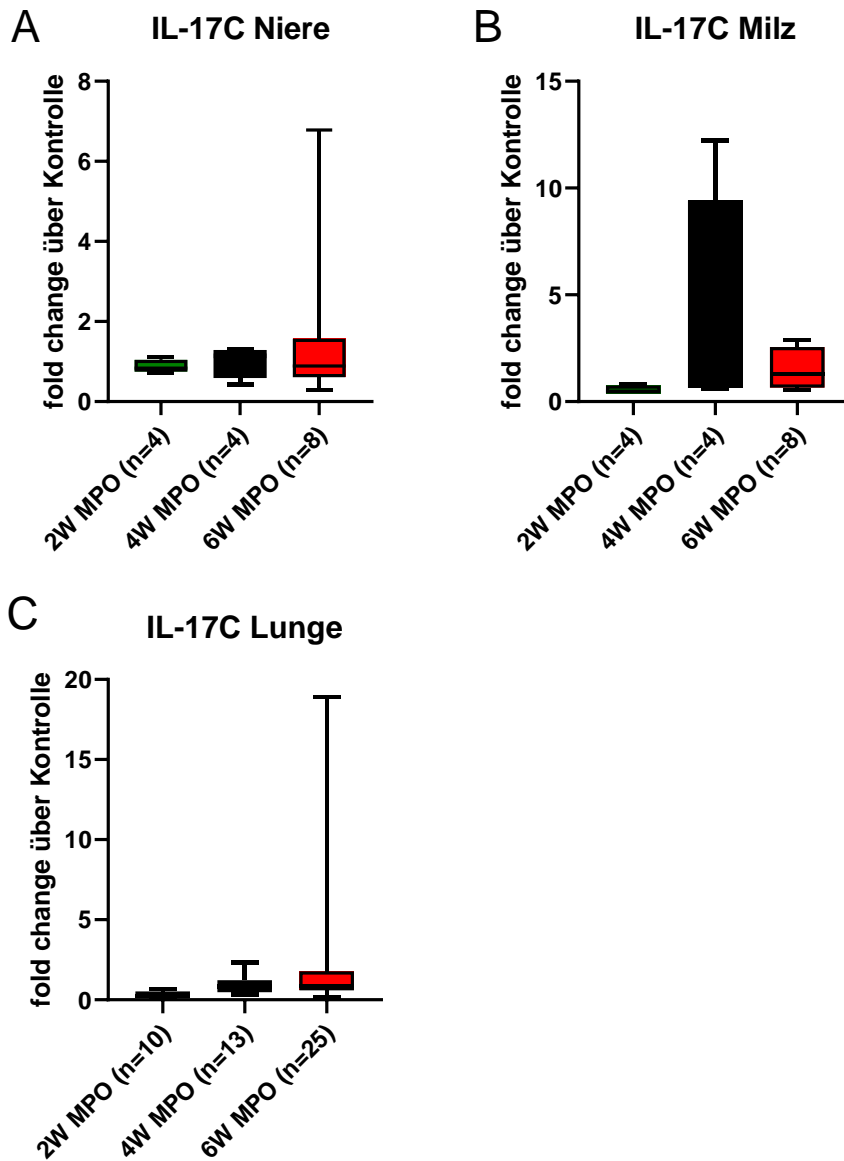


Abbildung 16: Verlauf der Genexpression von IL-17C bei zwei-, vier- und sechs Wochen unbehandelten Tieren in Niere, Milz und Lunge.

Dargestellt sind die Verläufe der Genexpression von IL-17C bei unbehandelten Tieren zwischen Woche zwei und sechs in der Niere (A), der Milz (B) und der Lunge (C).

In der Niere zeigte sich nach zwei und vier Wochen keine Änderung der Expressionshöhe und nach sechs Wochen war ein leichter Anstieg von IL-17C zu bemerken.

In der Milz waren die Genexpressionswerte nach vier Wochen deutlich erhöht und fielen dann nach sechs Wochen wieder ab. In der Lunge zeigte sich von Woche zwei bis sechs ein leichter Anstieg von IL-17C. Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

Unter anti-IL-17A Behandlung zeigte sich keine Veränderung der Genexpression von IL17C in der Niere verglichen mit unbehandelten Tieren und Isotypenkontrollen (fold change über Kontrolle: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 0,82 fc (0,55; 1,28) vs. 0,74 fc (0,35; 1,12), $p=0,49$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 0,73 fc (0,49; 1,22) vs. 0,74 fc (0,35; 1,12) $\pm 1,39$ fc, $p=0,76$; α -IL17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 0,82 fc (0,55; 1,28) vs. 0,68 fc (0,52; 0,80), $p=0,41$; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 0,73 fc (0,49; 1,22) vs. 0,68 fc (0,52; 0,80), $p=0,75$). Währenddessen war bei der Dosissteigerung von anti-IL-17A im Vergleich zu unbehandelten Tieren eine erniedrigte Genexpression zu verzeichnen (0,32 fc (0,26; 0,39) vs. 0,74 fc (0,35; 1,12), $p=0,036$). Ebenso zeigte die Dosissteigerung der Isotype für IL-17A eine erniedrigte renale Expression verglichen mit unbehandelten Tieren (0,29 fc (9,25; 0,72) vs. 0,74 fc (0,35; 1,12), $p=0,045$). Zwischen der erhöhten Dosis von anti-IL-17A und der Isotypenkontrolle

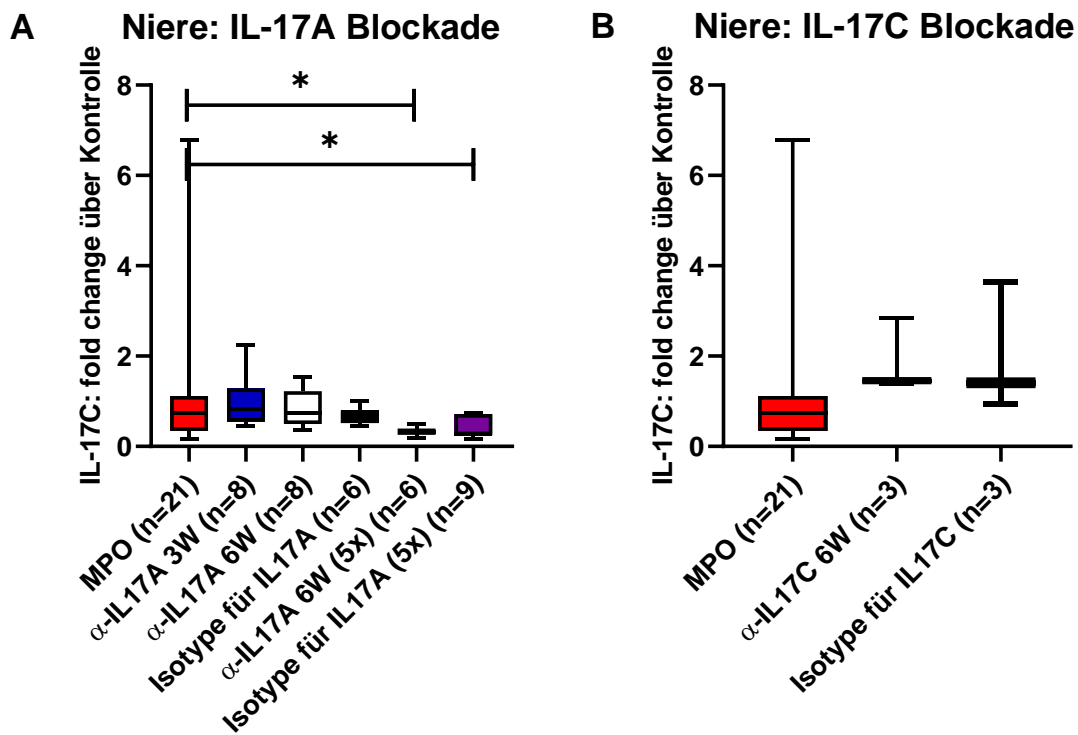


Abbildung 17: Renale Genexpression von IL-17C unter IL-17A und IL-17C Blockade.

(A) Die renale IL-17C Genexpression war unter drei und sechs Wochen IL-17A Blockade unverändert. Die Dosissteigerung von anti-IL-17A führte zu einer reduzierten Genexpression im Vergleich zu unbehandelten Tieren.

(B) Die Blockade von IL-17C führte zu keiner veränderten renalen IL-17C Expression. Der p-Wert wurde durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet. Das Signifikanzniveau beträgt für * 5%. Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

befand sich kein signifikanter Unterschied (α -IL-17A (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 0,32 fc (0,26; 0,39) vs. 0,29 fc (9,25; 0,72), $p=0,95$). Die Blockade von IL-17C erbrachte keine Änderung der renalen Expressionshöhe von IL-17C vergleichen mit unbehandelten Tieren und Isotypenkontrolle (α -IL-17C vs. Unbehandelt: 1,46 fc (1,39; 2,84) vs. 0,74 fc (0,35; 1,12), $p=0,05$; α -IL-17C vs. Isotype für IL-17C: 1,46 fc (1,39; 2,84) vs. 2,41 fc (0,95; 3,65), $p>0,99$). Die Behandlung mit dem Antikörper für anti-IL-17A führte zu keiner Reduktion der Genexpression von IL-17C in der Milz verglichen mit unbehandelten Tieren und Kontrolltieren. (fold change über Kontrolle: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 0,46 fc (0,29; 0,56) vs. 0,56 fc (0,27; 1,03), $p=0,55$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 0,29 fc (0,22; 0,49) vs. 0,56 fc (0,27; 1,03), $p=0,18$; α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 0,46 fc (0,29; 0,56) vs. 0,34 fc (0,29; 0,51), $p=0,66$; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 0,29 fc (0,22; 0,49) vs. 0,34 fc (0,29; 0,51), $p=0,49$). Die Blockade von IL-17A mit der erhöhten Dosis zeigte wiederum eine signifikante Reduktion der Genexpression von IL-17A, im Vergleich zu unbehandelten Tieren, jedoch

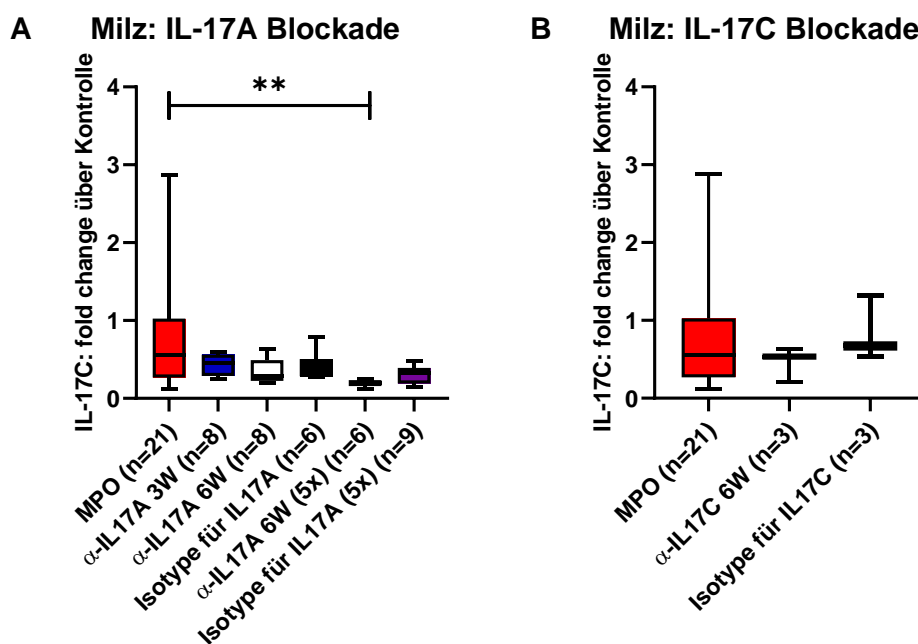


Abbildung 18: Genexpression von IL-17C in der Milz bei Neutralisation von IL-17A und IL-17C.

- (A) Die Expression von IL-17C zeigte sich in der Milz unverändert unter IL-17A Blockade verglichen mit der Isotypenkontrolle. Die Dosissteigerung führte zu einer signifikanten Minderung der Expressionshöhe gegenüber unbehandelten Tieren.
- (B) Bei Blockade von IL-17C ließ sich keine Änderung des Expressionsniveaus von IL-17C in der Milz erzielen. Das Signifikanzniveau beträgt für **1%. Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

nicht im Vergleich zur erhöhten Dosis der Isotype (α -IL-17A (5x) vs. Unbehandelt: 0,20 fc (0,16; 0,24) vs. 0,56 fc (0,27; 1,03), $p=0,008$; α -IL-17A (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 0,20 fc (0,16; 0,24) vs. 0,33 fc (0,19; 0,39), $p=0,14$). Die Blockade von IL-17C wies keine Minderung der Genexpression von IL-17C in der Milz auf, verglichen mit unbehandelten Tieren (0,53 fc (0,21; 0,63) vs. 0,56 fc (0,27; 1,03), $p=0,870$). Zwischen den anti-IL-17C behandelten Tieren und den Kontrolltieren ergab sich kein Unterschied (0,53 fc (0,21; 0,63) vs. 0,67 fc (0,53; 1,32), $p=0,40$).

Unter Blockade von IL-17A zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung der Genexpression von IL-17C in der Lunge verglichen mit unbehandelten Tieren (fold change über Kontrolle: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 4,55 fc (2,72; 6,81) vs. 2,08 fc (0,76; 4,86), $p=0,06$; α -IL17A 6W vs. Unbehandelt: 4,68 fc (3,25; 5,90) vs. 2,08 fc (0,76; 4,86), $p=0,13$). Zwischen anti-IL17A behandelten Tieren und der Isotypenkontrolle ergab sich eine signifikante Steigerung der pulmonalen IL-17C Expressionshöhe (α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 4,55 fc (2,72; 6,81) vs. 1,32 fc (0,94; 1,64), $p=0,0095$; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 4,68 fc (3,25; 5,90) vs. 1,32 fc (0,94; 1,64), $p=0,0095$). Die Erhöhung der Dosis von anti-IL-17A bewirkte keine signifikante Änderung der Expression verglichen mit unbehandelten Tieren und Kontrolltieren (α -IL-17A (5x) vs. Unbehandelt: 0,83 fc (0,59; 1,12) vs. 2,08 fc (0,76; 4,86), $p=0,10$; α -IL-17A (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 0,89 \pm 0,39 fc vs. 1,17 fc (0,80; 1,72), $p=0,27$). Des Weiteren bewirkte die Blockade von IL-17C eine tendenzielle Erhöhung der pulmonalen IL-17C Expression im Vergleich zu unbehandelten Tieren und eine tendenzielle Minderung verglichen mit den Kontrolltieren (α -IL-17C vs. Unbehandelt: 5,24 fc (2,23; 28,30) vs. 2,08 fc (0,76; 4,86), $p=0,23$; α -IL-17C vs. Isotype für IL-17C: 5,24 fc (2,23; 28,30) vs. 41,59 fc (37,66; 55,55), $p=0,100$). Die Behandlung mit der Isotype für IL-17C ergab ein signifikant höheres Expressionslevel verglichen mit unbehandelten Tieren (41,59 fc (37,66; 55,55) vs. 2,08 fc (0,76; 4,86), $p=0,004$).

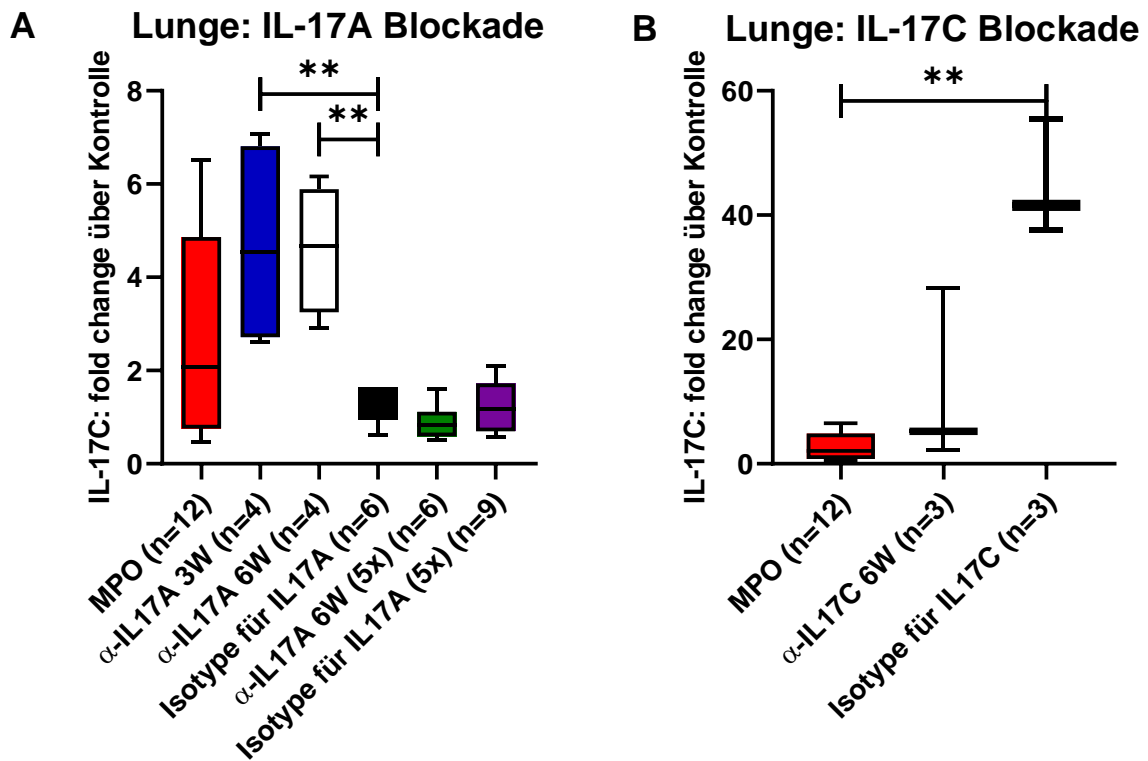


Abbildung 19: Pulmonale Genexpression von IL-17C unter Behandlung mit anti-IL-17A und anti-IL-17C Antikörper.

(A) Die Behandlung mit anti-IL-17A führte zu einer signifikant höheren Genexpression von IL-17C im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Dosissteigerung von IL-17A erbrachte keine Änderung.

(B) Durch die Blockade von IL-17C ließ sich eine tendenzielle Reduktion der Genexpression verzeichnen verglichen mit der Isotypenkontrolle. Der p-Wert wurde durch den MannWhitney-U-Test berechnet. Das Signifikanzniveau beträgt für ** 1%. Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

3.4.2 Unterschiede der Genexpression bei den von IL-17A und IL-17C beeinflussten Genen

Ein weiteres bedeutendes Gen ist CCL20, welches unter inflammatorischen Bedingungen in der Niere freigesetzt wird und Th17-Zellen stimuliert. Diese exprimieren daraufhin unter anderem IL-17A welches über den IL-17 Rezeptor zur Freisetzung weiterer Gene führt (z.B. CXCL1) und die Inflammation in der Niere weiter verstärkt. Demnach kann

die Genexpression von CCL20 anzeigen, ob die entzündliche Aktivität unter IL-17 Blockade verändert ist.

Tabelle 8: Übersicht der Genexpression von CCL20 und CXCL1 unter Antikörpertherapie

	α -IL-17A 3W	α -IL-17A 6W	α -IL-17A 6W (5x)	α -IL-17C 6W
Niere: CCL20	↔	↔	↔	↔
Milz: CCL20	↔	↔	↔	↘
Lunge: CCL20	↔	↔	↔	↗
CXCL1: Niere	↔	↗	↔	↔
CXCL1: Milz	↑	↗	↔	↔
CXCL1: Lunge	↔	↔	↔	↗

Als Referenzwert für die Pfeilrichtung gilt dabei die zugehörige Isotypenkontrolle (Isotype für IL-17A und 5x Isotype für IL-17A, sowie die Isotype für IL-17C). ↑ erhöhte Genexpression, ↓ erniedrigtes Expressionsniveau, ↔ unverändertes Expressionsniveau, ↗ tendenzielle Erhöhung der Expression ohne statistische Signifikanz, ↘ tendenzielle Minderung der Expression ohne statistische Signifikanz

Vorher bietet es sich jedoch an, den Verlauf der Genexpression von CCL20 in den Organen bei unbehandelten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten näher zu betrachten. Dabei fiel auf, dass die Genexpression bei unbehandelten Tieren nach vier Wochen in der Niere am höchsten ist (fold change über Kontrolle: 1,81 fc (0,40; 4,14)), verglichen mit zwei (0,43 fc (0,15; 1,04)) und sechs Wochen (1,29 fc (0,52; 1,61)) unbehandelten Tieren. Dagegen zeigte sich in der Milz ein ansteigender Verlauf der Expressionshöhe von CCL20 mit einem Maximum bei sechs Wochen (4,68 fc (2,23; 7,94)). Bei zwei Wochen zeigten sich deutlich niedrigere Werte (0,47 fc (0,38; 0,67)). Nach vier Wochen stieg die Expression von CCL20 an (1,06; 10,54)). In der Lunge waren nach zwei und nach vier Wochen keine Veränderung der Expressionshöhe zu sehen (0,84 fc (0,57; 2,50); 1,03 fc (0,39; 3,00)). Nach sechs Wochen zeigte sich dagegen ein erniedrigter Genexpressionsspiegel (0,33 fc (0,14; 12,0)).

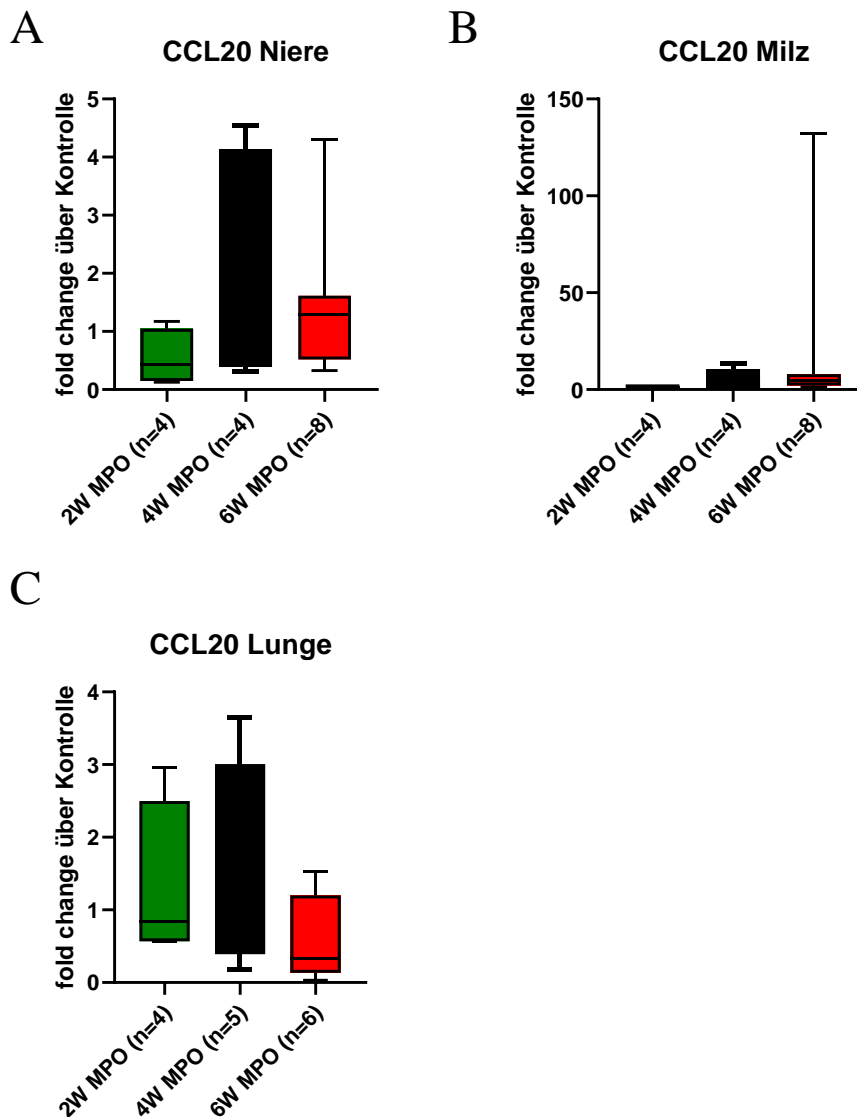


Abbildung 20: Verlauf der Genexpression von CCL20 bei zwei-, vier- und sechs Wochen unbehandelten Tieren in Niere, Milz und Lunge.

Dargestellt sind die Verläufe von CCL20 bei unbehandelten Tieren zwischen Woche zwei und sechs in der Niere (A), der Milz (B) und der Lunge (C).

In der Niere zeigte sich nach zwei Wochen eine verminderte Genexpression von CCL20, welche nach vier Wochen deutlich anstieg und nach sechs Wochen wieder etwas abfiel. In der Milz waren die Genexpressionswerte nach zwei Wochen deutlich vermindert und stiegen nach vier Wochen an. Nach sechs Wochen war die Expression von CCL20 stark erhöht im Vergleich zu zwei und vier Wochen Tieren. In der Lunge zeigte sich von Woche zwei bis vier ein unveränderter Stand von CCL20. Dieser fiel nach sechs Wochen noch leicht ab.

Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

Unter Blockade von IL-17A ergab sich keine Minderung der renalen Expressionshöhe von CCL20 verglichen mit unbehandelten Tieren und Isotypenkontrollen (fold change über Kontrolle: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 0,89 fc (0,35; 2,50) vs. 1,45 fc (1,21; 1,72), $p=0,34$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 1,58 fc (0,56; 3,95) vs. 1,45 fc (1,21; 1,72), $p=0,97$; α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 0,89 fc (0,35; 2,50) vs. 1,00 fc (0,77; 1,44), $p=0,85$; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 1,58 fc (0,56; 3,95) vs. 1,00 fc (0,77; 1,44), $p=0,85$). Vergleichbares zeigte sich bei der Verwendung der Isotype für IL-17A (1,00 fc (0,77; 1,44) vs. 1,45 fc (1,21; 1,72), $p=0,127$). Die Erhöhung der Dosis von anti-IL-17A bewirkte keine Änderung der Genexpression im Vergleich zu unbehandelten Tieren und Kontrolltieren (α -IL-17A (5x) vs. Unbehandelt 1,40 fc (1,05; 2,64) vs. 1,45 fc (1,21; 1,72), $p=0,90$; α -IL-17A (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 1,40 fc (1,05; 2,64) vs. 1,41 fc (1,05; 2,35), $p=0,95$). Dagegen führte die Blockade von IL-17C zu einer Verminderung der Genexpression von CCL20 im Vergleich zu unbehandelten Tieren (0,26 fc (0,25; 0,81) vs. 1,45 fc (1,21; 1,72), $p=0,01$). Verglichen mit der

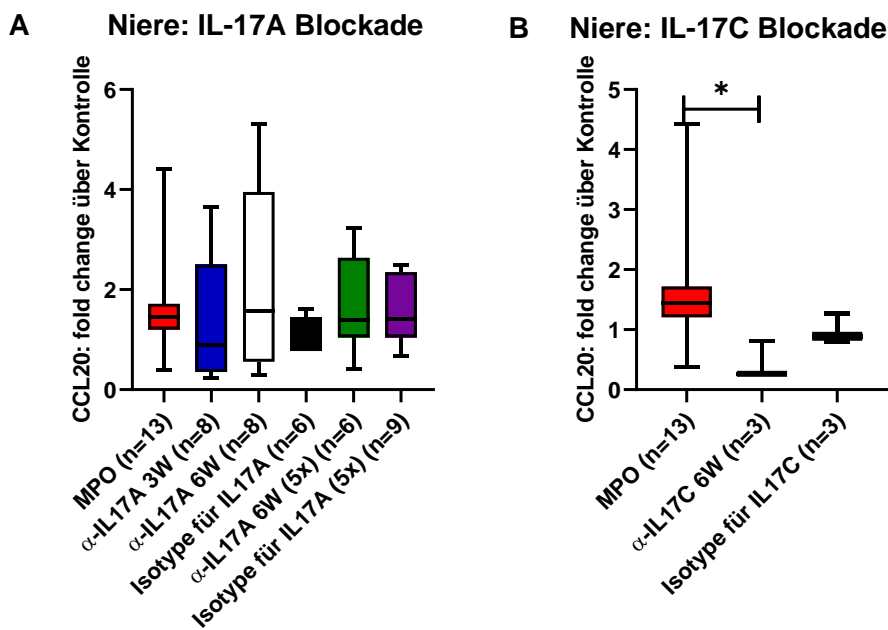


Abbildung 21: Renale Genexpression von CCL20 unter IL-17A und IL-17C Blockade.

- (A) Die Behandlung mit anti-IL-17A führte zu keiner signifikanten Änderung der Expressionshöhe von CCL20.
- (B) Durch Die Behandlung mit anti-IL-17C ließ sich eine Reduktion der Genexpressionshöhe erzielen im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Der p-Wert wurde durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet. Das Signifikanzniveau beträgt für * 5%. Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

Isotype für IL-17C zeigten anti-IL-17C behandelte Tiere keine signifikante Reduktion der Expressionshöhe (α -IL-17C vs. Isotype für IL-17C: 0,26 fc (0,25; 0,81) vs. 0,89 fc (0,81; 1,28), $p=0,20$).

In der Milz war die Genexpression von CCL20 unter anti-IL-17A Behandlung unverändert gegenüber unbehandelten Tieren und Kontrolltieren (fold change über Kontrolle: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 0,36 fc (0,25; 0,50) vs. 0,30 fc (0,20; 0,80), $p=0,92$; α -IL17A 6W vs. Unbehandelt: 0,38 fc (0,21; 1,01) vs. 0,30 fc (0,20; 0,80), $p=0,92$; α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 0,36 fc (0,25; 0,50) vs. 0,29 fc (0,25; 0,40), $p=0,35$; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 0,38 fc (0,21; 1,01) vs. 0,29 fc (0,25; 0,40), $p=0,75$). Ebenso bewirkte die Dosissteigerung von anti-IL-17A keine Minderung der Expressionshöhe verglichen mit unbehandelten Tieren und Tieren, welche die höhere Dosis der Isotype für IL-17A erhielten (α -IL-17A (5x) vs. Unbehandelt: 0,54 fc (0,23; 0,82) vs. 0,30 fc (0,20; 0,80), $p=0,70$; α -IL-17A (5x) vs. Isotype

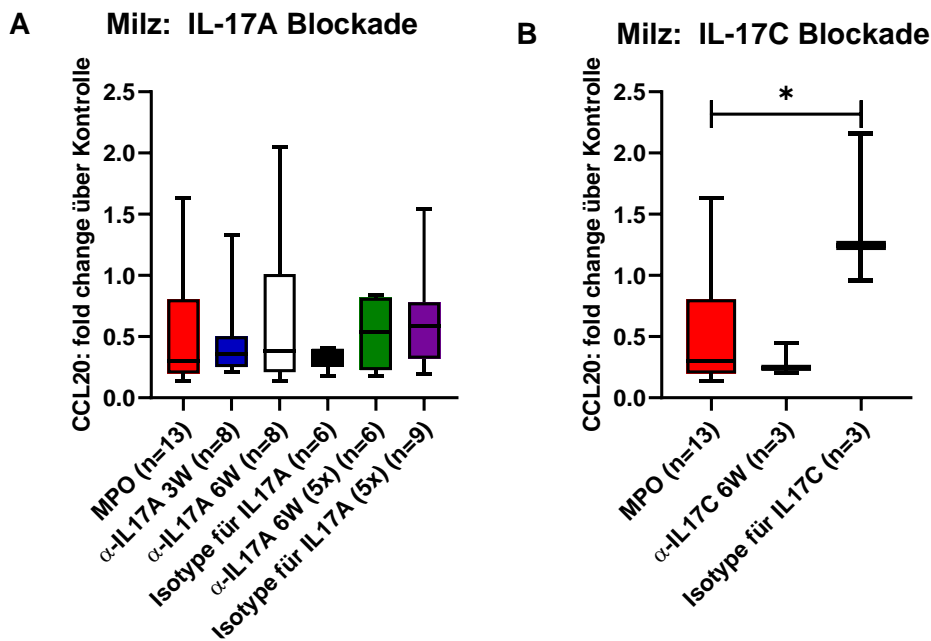


Abbildung 22: Genexpression von CCL20 in der Milz unter Neutralisation von IL-17A und IL-17C.

(A) Die Applikation von anti-IL-17A führte zu keiner signifikanten Änderung der Expression von CCL20 in der Milz.

(B) Durch die Blockade von IL-17C war eine tendenzielle Reduktion der Genexpressionshöhe im Vergleich zu unbehandelten Tieren und Kontrollen zu verzeichnen. Der p-Wert wurde durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet. Das Signifikanzniveau beträgt für * 5%. Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

für IL-17A (5x): 0,54 fc (0,23; 0,82) vs. 0,59 fc (0,32; 0,78), p=0,86). Die Behandlung mit anti-IL17C führte zu einer leichten Minderung der Genexpression von CCL20 verglichen mit unbehandelten Tieren und Kontrolltieren (α -IL-17C vs. Unbehandelt: 0,25 fc (0,20; 0,45) vs. 0,30 fc (0,20; 0,80), p=0,44; α -IL-17C vs. Isotype für IL-17C: 0,25 fc (0,20; 0,45) vs. 1,25 fc (0,96; 2,16), p=0,100). Dagegen führte die Applikation von der Isotype für IL-17C zu einer erhöhten Expression von CCL20 im Vergleich zu unbehandelten Tieren (1,25 fc (0,96; 2,16) vs. 0,30 fc (0,20; 0,80), p=0,025).

In der Lunge war die Genexpression von CCL20 unverändert gegenüber der von unbehandelten Tieren und Isotypenkontrollen (fold change über Kontrolle: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 0,84 fc (0,34; 1,08) vs. 1,21 fc (0,80; 1,47), p=0,15; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 0,77 fc (0,35; 1,50) vs. 1,21 fc (0,80; 1,47), p=0,33; α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 0,84 fc (0,34; 1,08) vs. 1,47 fc (1,00; 2,15), p=0,11; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 0,77 fc (0,35; 1,50) vs. 1,47 fc (1,00; 2,15), p=0,17). Durch die Erhöhung der anti-IL-17A Dosis war keine Änderung der Genexpression zu verzeichnen im Vergleich zu unbehandelten Tieren und Kontrollen (α IL-17A 6W (5x) vs. Unbehandelt: 1,64 fc (0,82; 4,12) vs. 1,21 fc (0,80; 1,47), p=0,27; α -IL-17A 6W (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 1,64 fc (0,82; 4,12) vs. 1,02 fc (0,67; 1,55), p=0,39). Demgegenüber stehen die Ergebnisse bei der Blockade von IL-17C, dort zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Genexpression von CCL20 verglichen mit unbehandelten Tieren (α -IL-17C vs. Unbehandelt: 8,17 fc (3,55; 35,90) vs. 1,21 fc (0,80; 1,47), p=0,009). Zwischen anti-IL-17C behandelten Tieren und Isotypenkontrollen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (α IL-17C vs. Isotype für IL-17C: 8,17 fc (3,55; 35,90) vs. 2,57fc (0,76; 8,85), p=0,40).

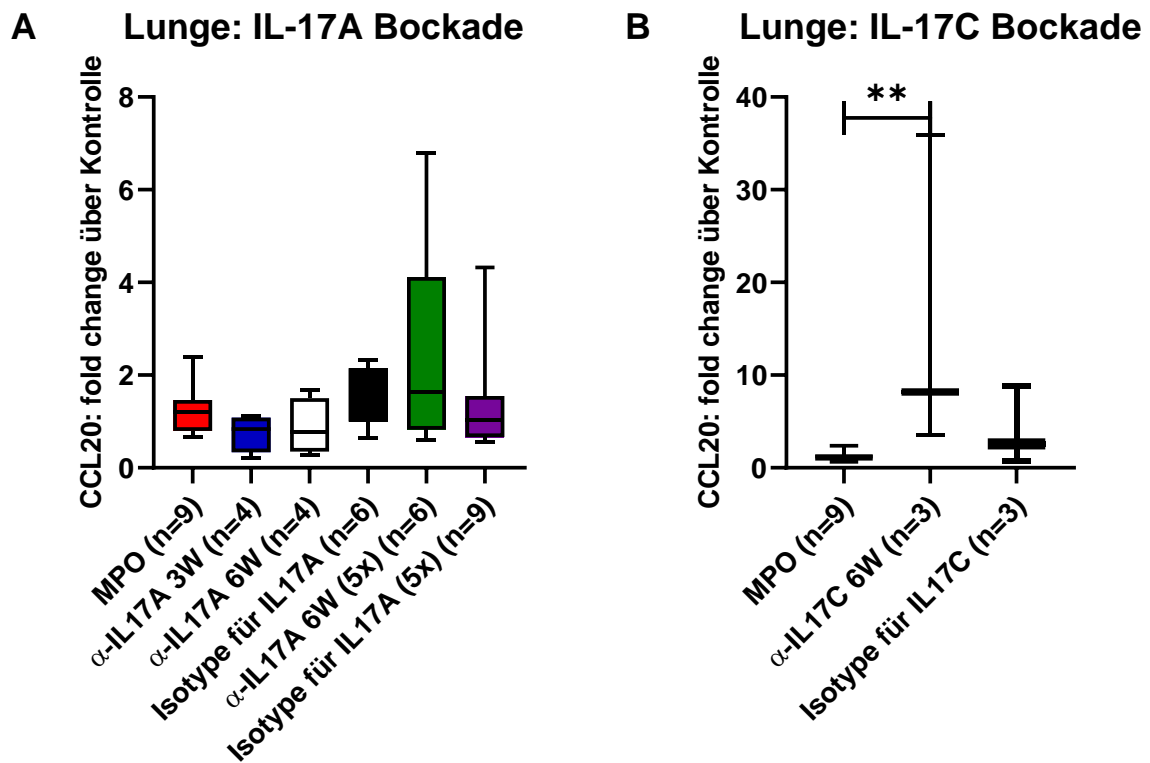


Abbildung 23: Pulmonale Genexpression von CCL20 unter anti-IL-17A Antikörper und anti-IL-17C Antikörper Behandlung.

(A) Die Behandlung mit anti-IL-17A führte zu ähnlichen Genexpressionswerten, wie bei unbehandelten Tieren und Kontrolltieren. Durch Erhöhung der anti-IL-17A Dosis ließ sich keine Minderung der Expressionswerte verzeichnen.

(B) Die Blockade von IL-17C führte zu einer starken Zunahme der Expression von CCL20 in der Lunge verglichen mit unbehandelten Tieren. Verglichen mit Kontrolltieren ergab sich keine signifikante Erhöhung. Der p-Wert wurde durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet. Das Signifikanzniveau beträgt für ** 1%. Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

Als proinflammatorisches Gen bewirkt CXCL1 eine Inflammation insbesondere der Niere und wird direkt stimuliert durch die Anwesenheit von IL-17A. Demnach könnte die Blockade von IL-17A und indirekt auch durch die Blockade von IL-17C eine Minderung der entzündlichen Aktivität bewirken, durch die Herabsetzung der Ausschüttung von CXCL1.

Bei unbehandelten Tieren zeigte sich nach einem Beobachtungszeitraum von zwei Wochen ein leicht erhöhter Genexpressionsspiegel von CXCL1 in der Niere (fold change

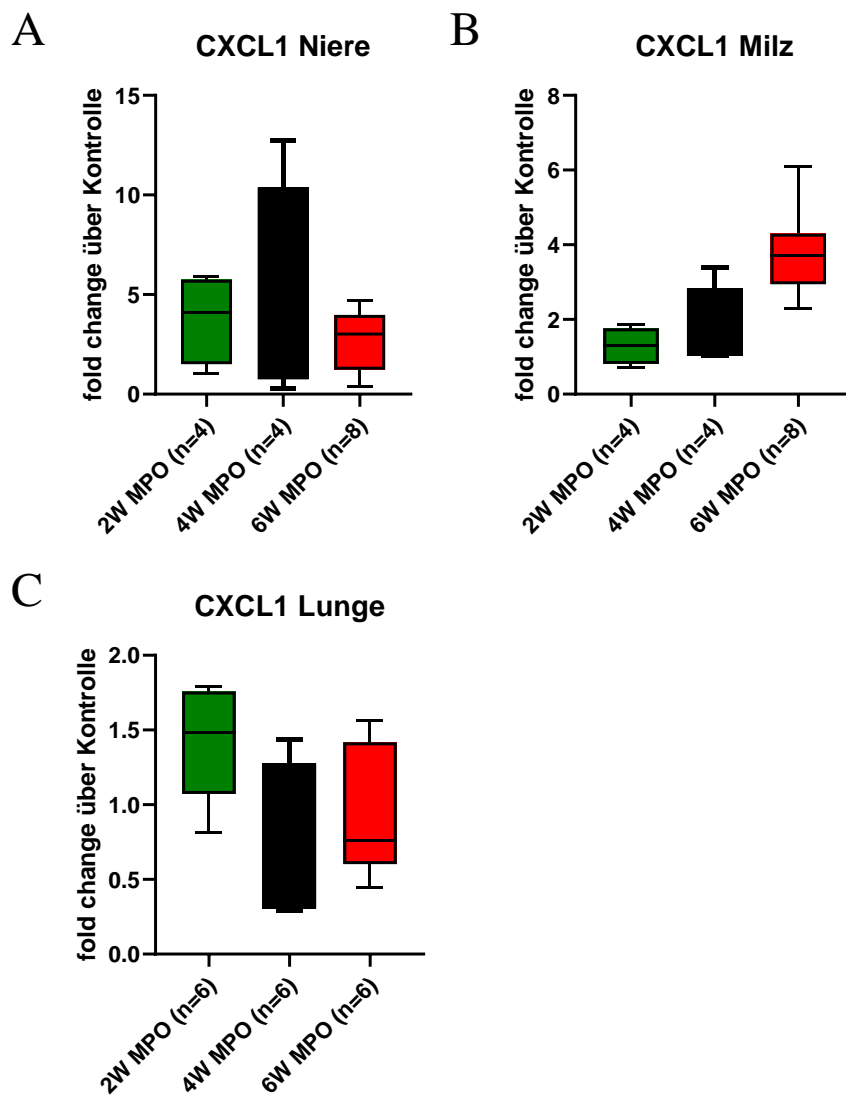


Abbildung 24: Verlauf der Genexpression von CXCL1 bei zwei-, vier- und sechs Wochen unbehandelten Tieren in Niere, Milz und Lunge.

Dargestellt sind die Verläufe von CXCL1 bei unbehandelten Tieren zwischen Woche zwei und sechs in der Niere (A), der Milz (B) und der Lunge (C).

In der Niere zeigt sich nach zwei Wochen und vier Wochen eine leichte erhöhte Expression von CXCL1, welche nach sechs Wochen gering abfällt.

In der Milz sind die Genexpressionswerte nach zwei Wochen und vier Wochen unverändert und steigen nach sechs Wochen an. In der Lunge zeigt sich bei Woche zwei eine tendenziell erhöhte Genexpression von CXCL1, welche über die Wochen vier und sechs geringfügig abfällt.

Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

über Kontrolle: 4,10 fc (1,51; 5,74)). Dieser stieg nach vier Wochen weiter leicht an (2,71 fc (0,74; 10,38)) und fiel nach sechs Wochen wiederum geringfügig ab (3,02 fc (1,23; 3,98)). In der Milz zeigte sich von Woche zwei (1,30 fc (0,81; 1,76)) bis Woche vier ein ähnlicher Stand der Expressionshöhe (1,08 fc (1,03; 2,83)). Nach sechs Wochen (3,71 fc (2,94; 4,30)) war ein Anstieg der Expressionshöhe von CXCL1 bei unbehandelten Tieren verglichen mit den Wochen zwei und vier zu verzeichnen. In der Lunge zeigten sich die höchsten Genexpressionswerte bei zwei Wochen unbehandelten Tieren (1,48 fc (1,07; 1,76)). Diese nahmen über Woche vier (0,65 fc (0,31; 1,28)) bis sechs (0,76 fc (0,60; 1,42)) leicht ab.

Unter der Blockade von IL-17A war die Genexpression von CXCL1 in der Niere unverändert zu der von unbehandelten Tieren und Isotypenkontrollen (fold change über Kontrolle: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 1,56 fc (1,43; 2,65) vs. 3,05 fc (1,74; 3,91), $p=0,19$; α -IL17A 6W vs. Unbehandelt: 2,52 fc (1,82; 3,87) vs. 3,05 fc (1,74; 3,91), $p=0,70$; α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 1,56 fc (1,43; 2,65) vs. 1,83 fc (1,03; 2,09), $p>0,999$; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 2,52 fc (1,82; 3,87) vs. 1,83 fc (1,03; 2,09), $p=0,059$). Durch die Verwendung der Isotype für IL-17A ließ sich die Expression von CXCL1, gegenüber der Gruppe der Unbehandelten, senken (1,83 fc (1,03; 2,09) vs. 3,05 fc (1,74; 3,91), $p=0,046$). Die Behandlung mit der höheren Dosis von anti-IL-17A bewirkte keine Änderung der Expressionhöhe verglichen mit der Gruppe der Unbehandelten und Isotypen (α -IL-17A 6W (5x) vs. Unbehandelt: 2,06 fc (0,88; 3,30) vs. 3,05 fc (1,74; 3,91), $p=0,244$; α -IL-17A 6W (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 2,06 fc (0,88; 3,30) vs. 2,60 fc (1,49; 3,58), $p=0,39$). Ebenso bewirkte die Blockade von IL-17C keine Änderung der renalen Genexpression von CXCL1 im Vergleich zu unbehandelten Tieren und Kontrolltieren (α -IL-17C 6W vs. Unbehandelt: 2,46 fc (2,42; 5,47) vs. 3,05 fc (1,74; 3,91), $p>0,99$; α -IL-17C 6W vs. Isotype für IL-17C: 2,46 fc (2,42; 5,47) vs. 5,18 fc (3,51; 10,81), $p=0,40$).

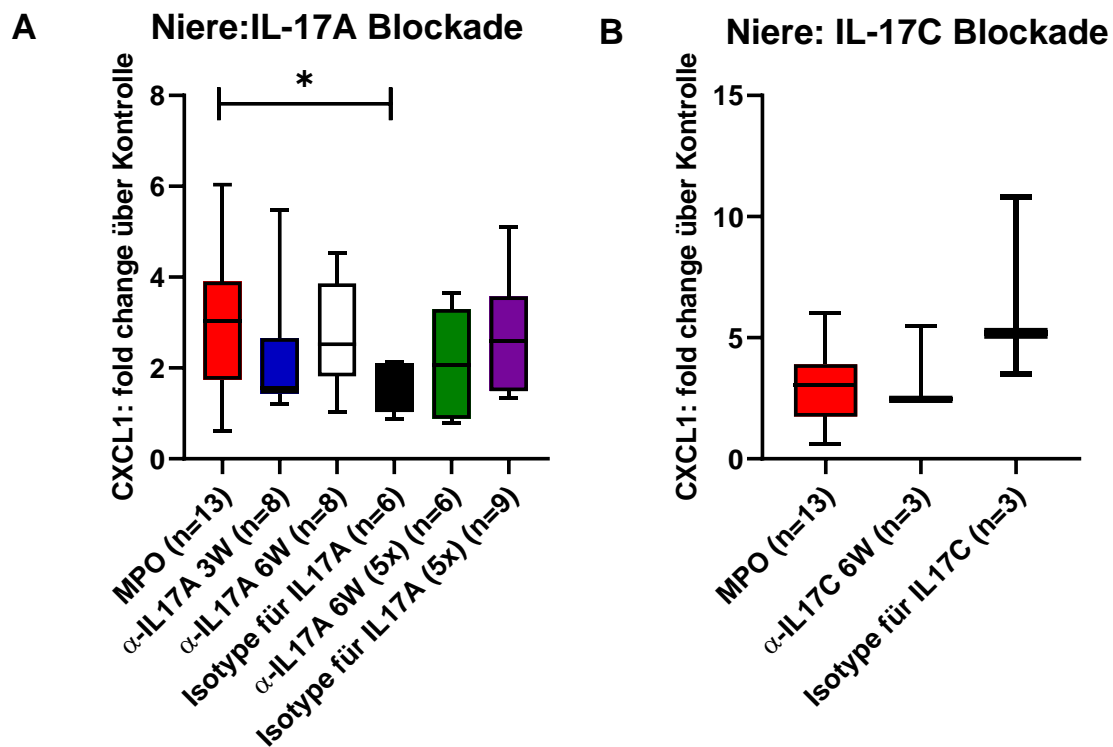


Abbildung 25: Renale Genexpression von CXCL1 in der Niere bei Blockade von IL-17A und IL-17C.

- (A) Die Blockade von IL-17A führte in der Niere zu keiner signifikanten Änderung der Expressionshöhe von CXCL1.
- (B) Ebenso bewirkte die Blockade von IL-17C keine Änderung der Genexpression von CXCL1. Der p-Wert wurde durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet. Das Signifikanzniveau beträgt für * 5%. Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

Die Expression von CXCL1 in der Milz war unter IL-17A Blockade ähnlich derer unbehandelter Tiere (fold change über Kontrolle: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 1,66 fc (1,32; 2,47) vs. 1,35 fc (1,09; 2,05), $p=0,456$; α -IL-17A 6W vs. Unbehandelt: 2,04 fc (0,75; 2,95) vs. 1,35 fc (1,09; 2,05), $p=0,595$). Ratten, welche drei Wochen mit anti-IL-17A behandelt wurden, zeigten eine signifikant höhere Expression von CXCL1 verglichen mit den Kontrolltieren (1,66 fc (1,32; 2,47) vs. 0,94 fc (0,72; 1,34), $p=0,008$). Sechs Wochen anti-IL-17A behandelte Tiere zeigten nur eine tendenzielle Erhöhung der Expressionshöhe im Vergleich zu den Kontrollen (2,04 fc (0,75; 2,95) vs. 0,94 fc (0,72; 1,34), $p=0,228$). Die Applikation der höheren Dosis von anti-IL-17A bewirkte keine Änderung der Genexpression gegenüber unbehandelten Tieren und Isotypenkontrollen (α -IL-17A (5x) vs. Unbehandelt: 1,43 fc (0,84; 2,65) vs. 1,35 fc (1,09; 2,05), $p=0,966$; α -IL-17A (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 1,43 fc (0,84; 2,65) vs. 2,56 fc (1,34; 3,84),

p=0,114). Die Blockade von IL-17C bewirkte keine veränderte Expressionshöhe von CXCL1 gegenüber unbehandelten Tieren und Kontrollen (α -IL-17C 6W vs. Unbehandelt: 1,55 fc (1,15; 4,06) vs. 1,35 fc (1,09; 2,05), p=0,52; α -IL-17C 6W vs. Isotype für IL17C: 1,55 fc (1,15; 4,06) vs. 3,50 fc (0,94; 3,51), p>0,999).

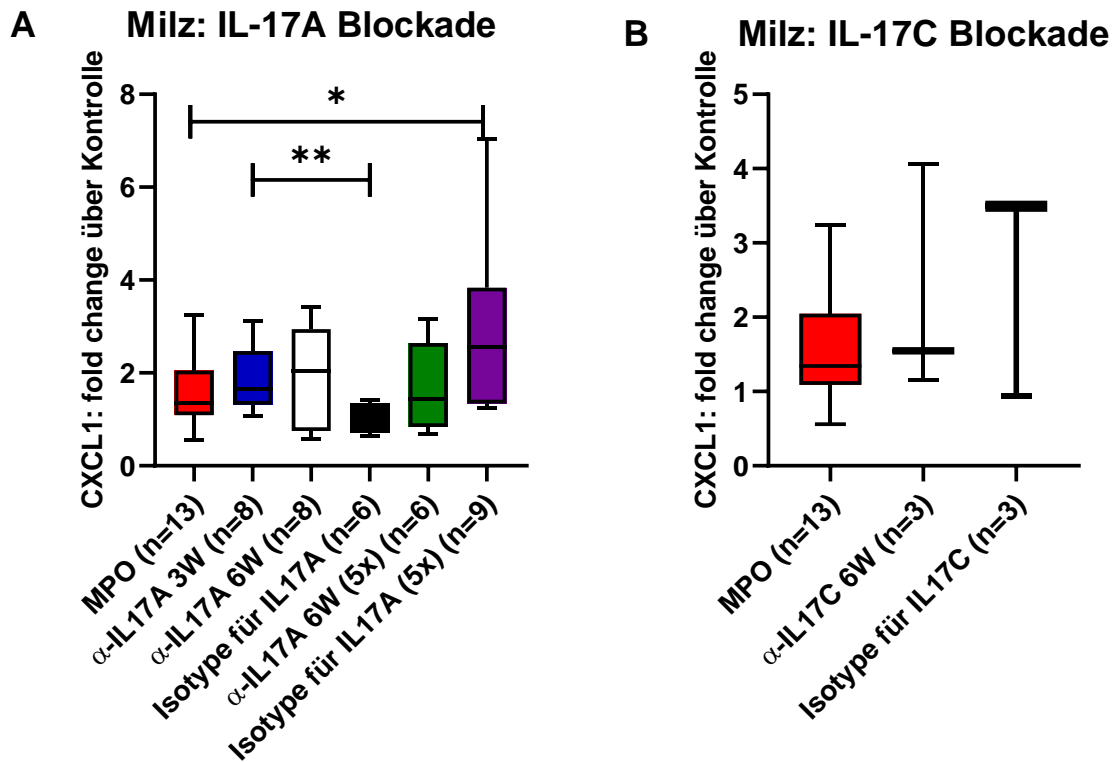


Abbildung 26: Genexpression von CXCL1 in der Milz unter IL-17A und IL-17C Blockade.

(A) Durch die dreiwöchige Behandlung mit anti-IL-17A war eine Erhöhung der Genexpressionhöhe von CXCL1 im Vergleich zur Isotype zu verzeichnen. Die Verwendung der höheren Dosis von anti-IL-17A bewirkte keine Änderung der Expressionshöhe.

(B) Durch die Blockade von IL-17C ließ sich keine Reduktion der Expressionshöhe erzielen. Der p-Wert wurde durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet. Das Signifikanzniveau beträgt für * 5% und für ** 1%. Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

Die Blockade von IL-17A bewirkte keine Änderung der pulmonalen Expressionshöhe von CXCL1 verglichen mit unbehandelten Tieren und Kontrollen (fold change über Kontrolle: α -IL-17A 3W vs. Unbehandelt: 1,29 fc (0,76; 1,75) vs. 1,21 fc (0,99; 1,83), p=0,60; α -IL17A 6W vs. Unbehandelt: 1,32 fc (0,99; 1,65) vs. 1,21 fc (0,99; 1,83), p=0,825; α -IL-17A 3W vs. Isotype für IL-17A: 1,29 fc (0,76; 1,75) vs. 0,99 fc (0,54; 1,32), p=0,352; α -IL-17A 6W vs. Isotype für IL-17A: 1,32 fc (0,99; 1,65) vs. 0,99 fc

(0,54; 1,32), $p=0,171$). Bei der Erhöhung der anti-IL-17A Dosis zeigten sich ähnliche Werte wie bei den unbehandelten Tieren und Isotypen (α -IL17A 6W (5x) vs. Unbehandelt: 1,53 fc (0,63; 2,52) vs. 1,21 fc (0,99; 1,83), $p=0,955$; α -IL-17A 6W (5x) vs. Isotype für IL-17A (5x): 1,53 fc (0,63; 2,52) vs. 1,00 fc (0,71; 1,49), $p=0,456$). Im Gegensatz dazu war die Genexpression von CXCL1 durch anti-IL-17C Behandlung deutlich erhöht gegenüber der von unbehandelten Tieren (3,39 fc (3,37; 14,15) vs. 1,21 fc (0,99; 1,83), $p=0,009$). Gegenüber der Isotypenkontrolle war keine signifikante Erhöhung zu verzeichnen (α -IL17C 6W vs. Isotype für IL-17C: 3,39 fc (3,37; 14,15) vs. 2,11 fc (1,98; 3,81), $p=0,400$). Bei der Verwendung der Isotype für IL-17C zeigten sich erhöhte Werte für die Expression von CXCL1 verglichen mit unbehandelten Tieren (22,11 fc (1,98; 3,81) vs. 1,21 fc (0,99; 1,83), $p=0,036$).

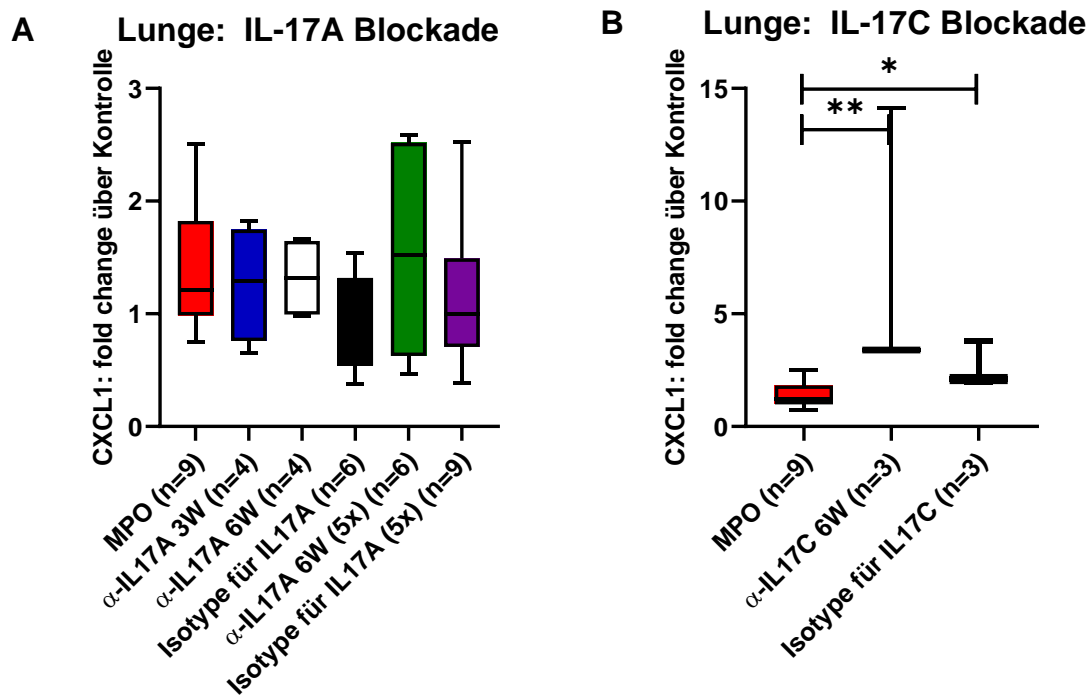


Abbildung 27: Pulmonale Expression von CXCL1 von Ratten mit anti-IL-17A und anti-IL-17C Antikörper Behandlung.

(A) Unter IL-17A Blockade waren ähnliche Genexpressionswerte wie bei unbehandelten Tieren und Isotypen zu verzeichnen.

(B) Die Behandlung mit anti-IL-17C führte zu einem deutlichen Anstieg der Expression von CXCL1 verglichen mit unbehandelten Tieren. Der p-Wert wurde durch den Mann-WhitneyU-Test berechnet. Das Signifikanzniveau beträgt für * 5% und für ** 1%. Kontrolltiere haben nur Freund's Adjuvans erhalten.

4. Diskussion

Die Intention dieser Dissertation liegt in der näheren Beleuchtung der therapeutischen Blockade von IL-17 in einem Rattenmodell der ANCA-assoziierten Vaskulitis. Dabei zeigte die dreiwöchige Blockade von IL-17A eine erniedrigte Proteinausscheidung, jedoch keine Minderung des Organschadens in der Lunge, sowie keine Reduktion der Höhe von anti-MPO Autoantikörper Titern. Die Neutralisation von IL-17C ergab eine unveränderte Albuminurie und anti-MPO Antikörper Titerhöhe im Vergleich zu der Isotypenkontrolle. Auf Ebene der Genexpression bewirkte die sechswöchige Behandlung mit anti-IL-17A eine signifikant niedrigere pulmonale Expression von IL-17A. Die pulmonale Expression von IL-17C war dagegen unter Blockade von IL-17A signifikant erhöht. Bei der Blockade von IL-17C ergaben sich keine signifikanten Änderungen des Expressionsniveaus.

Bei der Analyse des Nierenschadens zeigte sich unter dreiwöchiger Behandlung mit anti-IL-17A eine signifikant niedrigere Albuminurie ab der dritten Behandlungswoche verglichen mit der Isotypenkontrolle für IL-17A. Dagegen führte eine sechswöchige Behandlung, sowie eine fünffache Dosissteigerung von anti-IL-17A zu keiner Minderung der Proteinausscheidung, verglichen mit den Kontrolltieren. Im Vergleich zu unbehandelten Tieren zeigte sich in der ersten Behandlungswoche eine erniedrigte Ausscheidung von Albumin bei Ratten welche mit der fünffachen anti-IL-17A Dosis behandelt wurden. Der histologisch quantifizierte glomeruläre Nierenschaden war unter Blockade von IL-17A unverändert. Die Forschungsgruppe von Gan et al. beschäftigte sich mit einem Mausmodell zur fokal nekrotisierenden Glomerulonephritis bei IL-17A defizienten Mäusen. Die Erkrankung wurde dabei induziert durch Injektion von murinem MPO und anti-Maus Globulin der glomerulären Basalmembran. Dabei wiesen IL-17A defiziente Mäuse nach zwanzig Tagen eine deutlich abgeschwächte renale Schädigung, hinsichtlich der histologisch quantifizieren glomerulären Schädigung und der Höhe der Albuminurie auf (Gan et al., 2010). Des Weiteren befasste sich die Forschungsgruppe von Paust et al. mit einem Mausmodell zur nephrotoxischen Nephritis (NTN), bei dem die Krankheit durch Injektion von nephrotoxischem Schaf-Serum ausgelöst wurde. Dabei zeigten IL-17A defiziente Mäuse sechs Tage nach Krankheitsinduktion einen teilweisen Schutz vor Nierenschäden, welche charakterisiert waren durch eine reduzierte glomeruläre und interstitielle Schädigung und einem erniedrigten Harnstoff-Stickstoff

Level im Serum verglichen mit den Wildtyp-Mäusen. Eine Reduktion des glomerulären Nierenschadens war auch durch die Applikation eines anti-IL-17A Antikörpers nach sechs Tagen zu verzeichnen. Hingegen führte eine Antikörperbehandlung mit anti-IL17A zwischen dem zehnten und zwanzigsten Tag zu keiner reduzierten renalen Beteiligung. Dies war auch bei IL-17A defizienten Mäusen zwanzig Tage nach Krankheitsinduktion zu verzeichnen gewesen (Paust et al., 2012). Dies könnte auf eine vornehmlich frühe Beteiligung von IL-17A im Krankheitsprozess hinweisen. Odobasic et al. führte eine Studie mit Induktion einer Glomerulonephritis durch Injektion von Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran (anti-GBM Globulin) durch, bei dem IL-17A defiziente Mäuse nach sechs Tagen eine verringerte histologische Nierenschädigung aufwiesen. Dies kehrte sich jedoch um, sodass Mäuse mit Defizienz für IL-17A eine verstärkte renale Beteiligung nach einundzwanzig Tagen aufwiesen (Odobasic et al., 2011). Zusammengefasst ist eine frühe Beteiligung der Th17 Immunantwort, sowie der Rolle von IL-17A bei Formen der Glomerulonephritis möglich. Diese konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit bei Betrachtung der Albuminurie nicht eindeutig festgestellt werden. Vielmehr zeigte sich im Rahmen dieser Dissertation ein späterer Vorteil der IL-17A Neutralisation bei nur dreiwöchig behandelten Tieren. Überraschenderweise zeigte sich bereits in der dritten Beobachtungswoche mit anti-IL-17A eine Reduktion der Albuminurie im Vergleich zur Isotype. Die Applikation des anti-IL-17A Antikörpers erfolgte dabei jedoch erst ab dem einundzwanzigsten Tag. Aller Wahrscheinlichkeit nach hatten diese Tiere von Beginn an eine etwas niedrigere Proteinausscheidung. Ein Grund für die verschiedenen Ergebnisse der dargestellten Studien und diesen Ergebnissen könnte an den unterschiedlichen Modellen für die Induktion der Glomerulonephritis liegen. Bei Verwendung von anti-GBM Globulin kommt es zur Nierenschädigung durch Ablagerungen von Immunkomplexen in der Niere. Dagegen liegt bei der ANCAassozierten Vaskulitis eine pauci-immune Glomerulonephritis vor ohne Ablagerungen von Immunkomplexen. Außerdem wurde eine andere Spezies verwendet. Die Behandlung mit anti-IL-17C und der zugehörigen Isotype zeigte in den ersten beiden Behandlungswochen eine signifikant niedrigere Albuminurie verglichen mit unbehandelten Tieren. Bei dem Vergleich der Proteinausscheidung zwischen anti-IL-17C behandelten Tieren und denjenigen welche mit der passenden Isotype behandelt wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die Höhe des glomerulären Schadens war

jedoch erhöht unter der Isotypenkontrolle und unverändert bei der IL-17C Blockade verglichen mit unbehandelten Tieren. Zwischen Tieren mit IL-17C Blockade und Isotypenkontrollen war kein Unterschied zu verzeichnen. Die Arbeitsgruppe von Krohn et al. beschäftigte sich ebenso mit dem bereits erwähnten NTN-Modell. Dort war bei IL17C defizitären Mäusen nach zehn Tagen ein geringerer histologischer Nierenschaden und Harnstoff-Stickstoff Level zu verzeichnen. Außerdem wurden die Knockout- und Wildtypmäuse mit einem anti-IL-17A Antikörper behandelt, woraufhin die Unterschiede der Nierenschädigung zwischen IL-17C defizienten- und Wildtyp Mäusen verringert wurden (Krohn et al., 2018). Im Rahmen dieser Dissertation konnte dagegen keine abgeschwächte Nierenbeteiligung unter Neutralisation von IL-17C nachgewiesen werden. Grund dafür könnte wie bereits erwähnt die unterschiedlichen Krankheitsmodelle, sowie die Wahl der untersuchten Spezies sein. Außerdem wurde ein deutlich früherer Zeitpunkt untersucht. Möglicherweise wären die protektiven Eigenschaften der IL-17C Defizienz in späteren Krankheitsstadien nicht mehr nachzuweisen.

Ein weiterer Fokus dieser Dissertation lag bei der pulmonalen Vaskulitis. Die Anzahl an petechialen Lungenblutungen wies keinen Unterschied auf zwischen unbehandelten Ratten und denen mit Neutralisation von IL-17A oder IL-17C. Bei dem Vergleich des Anteils an Infiltraten in den Lungen fand sich keine Differenz zwischen den unbehandelten und den drei bis sechs Wochen mit dem anti-IL-17A Antikörper behandelten Tieren. Mithilfe von weiteren immunhistochemischen Untersuchungen ließen sich die beteiligten Zelltypen der Infiltrate näher charakterisieren. Dabei fand sich dort prinzipiell ein hoher Anteil von T-Zellen, sowie Makrophagen vornehmlich im Alveolarraum. Außerdem ließen sich einige Neutrophile nachweisen. Lediglich vereinzelt fanden sich B-Zellen und regulatorische T-Zellen. Die Bedeutung von IL-17A wurde bereits bei anderen Lungenerkrankungen untersucht. Patienten mit Asthma bronchiale hatten erhöhte IL-17A Werte im Sputum, Serum, bronchialen und nasalen Biopsien. Weiterhin korreliert das Expressionsniveau von IL-17A in bronchialen Biopsien mit dem Grad der Neutrophilen in den Atemwegen und waren ausgeprägter bei Patienten mit mittlerem- bis schwerem- oder Exazerbations-geneigtem Asthma als bei Patienten mit milderem Asthma Verläufen (Ritzmann et al., 2022). In einer Studie von Ivanov et al. wurde die Rolle von IL-17A hinsichtlich der chemotaktischen Wirkung untersucht. Dort

wurden Mäuse intranasal mit LPS oder IL-23 stimuliert und die Versuchstiere erhielten vorher systemisch eine Isotypenkontrolle oder eine Blockade von IL-17A. Diejenigen Tiere, welche eine anti-IL-17A Behandlung erhielten zeigten nach drei Tagen eine niedrigere Anzahl von Neutrophilen und Makrophagen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) im Vergleich zur Isotypenkontrolle (Ivanov et al., 2007). In einer weiteren Studie von Ferretti et al. wurde die Lipopolysaccharid (LPS) induzierte Lungeninflammation bezüglich der Rolle von IL17A untersucht. Mäuse wurden intranasal mit LPS oder PBS stimuliert und zeigten in der BAL nach einem Tag die höchsten IL-17 Werte, sowie einen Influx von Neutrophilen nach einem Tag. Makrophagen und Lymphozyten waren nach zwei Tagen ansteigend nachzuweisen. Ein Tag nach intranasaler Stimulierung erhielt eine Versuchsgruppe intranasal einen anti-IL-17A Antikörper, wodurch sich der Einstrom von Neutrophilen in der BAL um 50% nach zwei Tagen reduzierte (Ferretti et al., 2003). Park et al. führte Versuche mit transgenen Mäusen durch, welche IL-17A in epithelialen Lungenzellen exprimierten durch Gebrauch des CC10 Promotors. Nach drei Monaten generierten Mäuse ein hypertrophiertes Lungenepithel sowie Infiltrationen von Eosinophilen und Makrophagen im Lungenparenchym im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen. Zwischen fünf und zehn Monaten entwickelten transgene Mäuse fokale Akkumulationen und Infiltrationen von mononukleären Zellen, inklusive CD4 Lymphozyten. Neutrophile ließen sich nicht vermehrt nachweisen (Park et al., 2005). Insgesamt legen diese Studien nahe, dass IL-17A zu einem frühen Anstieg von Neutrophilen in den Atemwegen führt. Deswegen wäre es möglich, dass in der vorliegenden Dissertation kein Unterschied unter IL-17A Blockade zu verzeichnen war, weil Veränderungen zu einem viel früheren Zeitpunkt zu sehen wären. Weitere Untersuchungen, insbesondere zur pulmonalen Vaskulitis, sind notwendig, um diese These näher zu beleuchten.

Bei näherer Betrachtung der anti-MPO Autoantikörper Titer stellte sich unter IL-17A Blockade keine Reduktion des Autoantikörper Titers im Vergleich zur Isotypenkontrolle dar. Lediglich nach sechs Wochen zeigte sich eine Reduktion des Autoantikörpertiters bei dreiwöchiger Behandlung mit anti-IL-17A im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Ebenso bewirkte die Blockade von IL-17C keine Reduktion des anti-MPO Titers zwischen der zweiten und sechsten Behandlungswoche verglichen mit der Isotypenkontrolle. Im Vergleich zu unbehandelten Tieren bewirkte die Behandlung mit anti-IL-17C signifikant höhere anti-MPO Titerwerte. In dem bereits erwähnten Versuch mit IL-17A defizienten

Mäusen zeigten sich keine Unterschiede der Autoantikörpertiter im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bei den IL-17A knockout Mäusen wurde die Titeranalyse zwanzig Tage nach Krankheitsinduktion durchgeführt, bei der kein signifikanter Unterschied in der Höhe von anti-MPO IgG festzustellen war (Gan et al., 2010). Ebenso zeigte sich im Rahmen dieser Dissertation zwischen zwei und sechs Behandlungswochen keine Differenz zwischen mit anti-IL-17A behandelten Ratten und Kontrolltieren. Dies könnte bedeuten, dass die Autoantikörperhöhe unabhängig von IL-17A reguliert wird. Wen et al. zeigte in einem Lupus-Modell, dass eine Neutralisation von IL-17A zu erniedrigten Autoantikörpern führt. Die Erkrankung wurde in dem Mausmodell induziert durch subkutane Applikation von aktivierter Lymphozyten-abgeleiteten DNA (ALD-DNA) in PBS und einem äquivalenten Volumen von komplettem Freund's Adjuvans. Weiterhin wurden zwei Booster Immunisierungen mit ALD-DNA mit inkompletten Freund's Adjuvans in Woche zwei und vier durchgeführt. Die Blockade von IL-17A wurde erzielt durch einen neutralisierenden Antikörper gegen IL-17A vor der ADL-DNA Immunisierung, sowie danach in Intervallen von drei Tagen für insgesamt zehn Wochen. Mäuse, welche mit anti-IL-17A behandelt wurden, zeigten dabei zwischen Woche sechs und zehn deutlich niedrigere anti-doppelstrang DNA (dsDNA) Antikörperkonzentrationen im Vergleich zur Isotypenkontrolle (Wen et al., 2013). Im Pristaninduzierten Lupus Modell von Krohn et al. zeigten IL-17C defiziente Mäuse nach zwölf Monaten keine Reduktion von anti-dsDNA und anti-U1-snRNP Autoantikörpern (Krohn *et al.*, 2018). Diese Ergebnisse sind jedoch nicht eindeutig vergleichbar zu denen dieser Dissertation. Zum einen wurde die Autoimmunität gegen andere Zielstrukturen induziert und zum anderen wurde die Analyse der Autoantikörperhöhe bei Krohn et al. zu einem deutlich späteren Zeitpunkt durchgeführt. Die Forschungsgruppe von Xiao et al. beschäftigte sich ausgiebig mit der Fragestellung, inwiefern anti-MPO Antikörper an der Krankheitsentstehung der ANCA-assoziierten Vaskulitis beteiligt sind. In einem Mausmodell erhielten die MPO-knockout Tiere eine Stimulation mit murinem MPO. Danach wurden Splenozyten von Kontroll- und MPO-immunisierten Tieren isoliert. Diese Milzzellen wurden Rag2 defizienten Mäusen (Mäuse denen funktionierende B- und T Lymphozyten fehlen) injiziert. Dabei zeigten die Versuchstiere, welche anti-MPO Splenozyten erhielten, ansteigende anti-MPO Titer ab dem dritten bis zum fünfzehnten Tag. Dieser Effekt war abhängig von der Dosis der verabreichten anti-MPO Splenozyten. Rag2-knockout Mäuse mit höherer Dosis von anti-MPO Splenozyten entwickelten

Nierenschäden, gemessen am Serum-Kreatinin, sowie histologischen Schäden. Mäuse mit geringerer Dosis von anti-MPO Splenozyten, sowie Kontrolltiere entwickelten nur milde renale Schäden. In einer weiteren Versuchsreihe wurden Rag2-defizienten und Wildtyp-Mäusen anti-MPO Antikörper intravenös appliziert. Versuchstiere, welche den anti-MPO Antikörper erhielten, entwickelten nach drei Tagen eine deutlich höhere Hämaturie, Proteinurie und Leukozyturie im Vergleich zu Kontrolltieren. Weiterhin zeigten alle anti-MPO immunisierten Mäuse nach sechs Tagen eine fokal nekrotisierende Glomerulonephritis mit Halbmondbildung. Kontrolltiere entwickelten keine histologischen Läsionen. Außerdem zeigten zwei der sechs Wildtyp-Mäuse, welche antiMPO Antikörper erhielten, fokale pulmonale alveoläre Kapillaritis (Xiao et al., 2002). Ebenso wurde in dieser Dissertation ein Tiermodell verwendet, bei dem die Pathogenität von anti-MPO Antikörpern deutlich wurde. Wistar-Kyoto Ratten entwickelten nach Immunisierung mit humanem MPO deutliche anti-MPO Titer, sowie eine Albuminurie und pulmonale Vaskulitis. Des Weiteren wurde in einem Experiment von Nagao et al. die Wirkung von anti-MPO Antikörpern auf Neutrophile untersucht. Dort wurde Mäusen Kaninchen antiMPO Globulin intravenös appliziert. Die Akkumulation von Neutrophilen in Glomeruli wurde nach ein, drei und sechs Stunden beobachtet. Es zeigten sich signifikant höhere Infiltration von Neutrophilen bei MPO-immunisierten Tieren, vergleichen mit der Kontrollgruppe. Der Maximalwert wurde nach einer Stunde erreicht und war danach fallend (Nagao et al., 2011). Dies zeigt, dass anti-MPO Antikörper direkte Wirkungen auf Neutrophile ausüben. Es wurden jedoch nur sehr frühe Zeitpunkte analysiert. Welche Auswirkung eine längerfristige anti-MPO Antikörper Stimulierung ausübt (wie bei den ANCAassozierten Vaskulitiden), ist daraus nicht abzulesen. In einer Studie von Hoshino et al. konnte gezeigt werden, dass peritoneale Neutrophile IL-17A produzieren in Reaktion auf Stimulation mit MPO-ANCA (Hoshino et al., 2008).

Auf Ebene der Genexpression war unter sechswöchiger Blockade von IL-17A in der Lunge die Expression von IL-17A signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu zeigte sich unter Neutralisation von IL-17A eine signifikant höhere pulmonale Expression von IL17C verglichen mit den Kontrolltieren. Die Dosiserhöhung von anti-IL-17A führte zu keiner Änderung des Expressionsniveaus. Bei der Blockade von IL-17C zeigte sich in der Lunge eine tendenziell erhöhte IL-17A Expression und eine tendenziell niedrigere IL17C Expression verglichen mit der Isotypenkontrolle. In der Niere und Milz führte die Blockade von IL-17A und IL-17C zu keinen Veränderungen der Genexpression. Die

Höhe der Genexpression wurde bei den bereits beschriebenen Studien mit den knockout Tieren von IL-17A und IL-17C nicht untersucht. Allerdings fand sich bei IL-17C defizienten Mäusen eine signifikant erniedrigte Serumkonzentration von IL-17A (Krohn et al. 2018). Yamaguchi et al. untersuchte in einem Mausmodell eine LPS induzierte Lungeninflammation, welche nach 24 Stunden durch Neutrophile dominiert war. Dabei fand sich bei IL-17C defizienten Mäusen in der BAL-Flüssigkeit eine signifikant höhere Konzentration von IL-17A im Vergleich zu den Wildtyp Tieren nach 24 Stunden (Yamaguchi et al., 2018). Die Ergebnisse dieser Dissertation legen einen Rückkopplungsmechanismus zwischen IL-17A und IL-17C nahe, da unter Blockade von IL-17A die pulmonale IL-17C Expression erhöht war und unter IL-17C Blockade die IL-17A Expression tendenziell erhöht war. In der Niere und Milz zeigte sich ein solcher Mechanismus nicht. Zhang et al. befasste sich in einem Modell zur post-ischämischen Reperfusion unter IL-17C Blockade einen Effekt auf die akute Nierenschädigung ausübt. Dabei wurden Mäuse mit einem anti-IL-17C Antikörper oder einer IgG Kontrolle drei Stunden nach Reperfusion behandelt. Bei Neutralisation von IL-17C war die renale IL-17A Expression vierundzwanzig Stunden nach Reperfusion reduziert (Zhang et al., 2023). In einem murinen Lupus Nephritis Modell zeigten IL-17A knockout Mäuse keine veränderte renale IL-17C Expression nach 24 Wochen (Schmidt et al., 2015). Unter Blockade von IL-17A war die Höhe der Expression von CCL20 in der Niere, Milz und Lunge unverändert im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Behandlung mit dem anti-IL-17C Antikörper führte zu einer tendenziell niedrigeren renalen und lienalen CCL20 Expression. Dagegen führte die Blockade von IL-17C in der Lunge zu einer tendenziell höheren CCL20 Expression verglichen mit den Isotypenkontrollen. Die Behandlung mit dem anti-IL-17A und anti-IL-17C Antikörper führte in der Niere zu keiner veränderten Expression von CXCL1. In der Milz bewirkte die dreiwöchige anti-IL-17A Behandlung eine signifikant höhere Expression von CXCL1. In der Lunge bewirkte die Behandlung mit anti-IL-17C eine tendenziell höhere Expression von CXCL1. Bei dem bereits vorgestellten Mausmodell zur nephrotoxischen Nephritis erzielten IL-17C defiziente Mäuse nach zehn Tagen eine tendenzielle Reduktion der renalen Expression von CXCL1 und CCL20 (Krohn et al., 2018). Mäuse wiesen im Modell von Paust et al. zur NTN ein erhöhtes Expressionsniveau von CCL20 zwischen dem dritten und zehnten Tag auf. Des Weiteren war bei IL-17A defizienten Mäusen nach sechs Tagen eine erniedrigte renale CCL20 Expression nachzuweisen. Mäuse, welche zwischen dem zehnten und

zwanzigsten Tag mit einem anti-IL-17A Antikörper behandelt wurden, zeigten keinen Unterschied im Expressionsniveau von CCL20 verglichen mit Kontrolltieren (Paust et al., 2012). Im NTN-Modell wies Disteldorf et al. eine frühe Expression von CXCL1 nach drei Tagen in der Niere nach. Bei IL-17A defizitären Mäusen war das renale Expressionsniveau von CXCL1 nicht signifikant reduziert nach zehn Tagen im Vergleich zu Kontrolltieren. Außerdem wurden einige Mäuse nach Krankheitsinduktion mit einem anti-CXCL1 Antikörper behandelt, wodurch die renale Infiltration durch Neutrophile nach drei Tagen signifikant reduziert wurde. Dieser Unterschied war jedoch nach vierzehn Tagen nicht mehr zu verzeichnen (Disteldorf et al., 2015). In einem Mausmodell zur IgA Nephropathie wurde die Krankheit durch Applikation von LPS, Carbon tetrachlorid, sowie Rinderserumalbumin indiziert. Dabei zeigten immunisierte mit anti-CCL20 behandelte Mäuse geringere renale und pulmonale histologische Schäden nach elf Wochen (Meng et al., 2014). Das renale Expressionsniveau von CCL20 wurde bei IL-17A defizienten Mäusen sechs Tage nach Krankheitsinduktion analysiert. Dagegen erfolgt die Auswertung im vorliegenden Fall sechs Wochen nach Krankheitsinduktion. Die renale CXCL1 Expression zeigte bei Disteldorf et al. ebenso keine Beeinflussung durch Defizienz von IL-17A. Weiterhin ist aus dieser Studie ersichtlich, dass CXCL1 für eine frühe Rekrutierung von Neutrophilen verantwortlich ist. Bei Ausschaltung von IL-17C konnte Krohn et al. lediglich eine tendenzielle Reduktion des renalen Expressionsniveaus von CCL20 und CXCL1 nach zehn Tagen erzielen. Unklar ist, inwiefern die Expression dieser Effektorzytokine im weiteren Krankheitsverlauf durch IL-17A oder IL-17C beeinflusst werden würde. Eine weitere experimentelle Arbeit befasste sich mit Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und dessen Neutralisierung. TNF- α existiert in frei löslicher Form und in membrangebundener Form, welches sich an Zelloberflächen befindet. Dabei können beide Formen durch Antikörper blockiert werden. Bei Bindung eines TNF- α Antikörpers an membrangebundenes TNF- α kann eine Komplement-abhängige Toxizität ausgelöst werden, welche die Lyse der Zelle zur Folge hat. Mitoma et al. verwendete in seinen Experimenten eine T-Zell Linie, welche transmembranöses TNF- α auf ihrer Zelloberfläche trägt. Diese T-Zellen wurden für vier Stunden mit drei unterschiedlichen TNF- α Antagonisten in humanem Serum inkubiert. Danach wurde der Anteil lysierter Immunzellen bestimmt, wobei einer der Antikörper signifikant weniger Zellen lysieren konnte. Bei Inaktivierung des Serums durch Hitze war dieser Effekt nicht nachzuweisen, sodass der zytotoxische Effekt höchstwahrscheinlich

5. Zusammenfassung

Die Anti-neutrophilen-zytoplasmatischen Antikörper (ANCA)-assoziierten Vaskulitiden stellen eine Gruppe seltener und lebensbedrohlicher Erkrankungen dar, bei der eine dysregulierte Immunantwort maßgeblich an der Krankheitsentstehung beteiligt ist. Gegenstand aktueller Forschung stellen dabei die T-Helfer-17 -Zellen (Th17) und die Gruppe der Interleukine-17 (IL-17) dar. Diese Dissertation soll dabei die Auswirkungen einer Blockade von IL-17A und IL-17C in einem Rattenmodell der ANCA-assoziierten Vaskulitis näher beleuchten. Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein experimentelles Rattenmodell zur ANCA-assoziierten Vaskulitis eingesetzt.

Hinsichtlich des Nierenschadens zeigte sich unter dreiwöchiger anti-IL-17A Antikörper Behandlung eine verminderte renale Albuminausscheidung. Dieser Effekt ließ sich nicht unter sechswöchiger Therapie, sowie Dosissteigerung von anti-IL-17A beobachten. Unter der Blockade von IL-17C kam es zu keiner veränderten Albuminurie. Der histologische glomeruläre Nierenschaden zeigte keine Reduktion unter Blockade von IL-17A oder IL-17C.

Weiterhin ergab die Auswertung der petechialen Lungenblutungen keinen Unterschied bei der Neutralisation der Interleukine. Immunhistochemisch ließ sich ein hoher Anteil an T-Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten bei den pulmonalen Infiltraten nachweisen.

Auf humoraler Ebene war die Höhe der Autoantikörper unverändert bei anti-IL-17A und anti-IL-17C Antikörper Behandlung.

Auf Genexpressionsniveau ergab die sechswöchige Blockade von IL-17A eine erniedrigte pulmonale IL-17A Expression und unter drei- und sechswöchiger Blockade eine erhöhte pulmonale IL-17C Expression. Die Neutralisation von IL-17C zeigte dagegen eine tendenziell niedrigere pulmonale IL-17C und tendenziell höhere IL-17A Expression. Das Expressionsniveau von Chemokin-ligand 20 (CCL20) und C-C-X Ligand 1 (CXCL1) ließ sich durch Blockade von IL-17A und IL-17C nicht signifikant ändern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Blockade von IL-17A oder IL-17C keine eindeutige Reduktion der Krankheitsaktivität bewirkt hat.

Summary

The anti-neutrophil-cytoplasmic-antibody (ANCA)-associated vasculitides represent a group of rare and life-threatening diseases in which a dysregulated immune response is crucially involved in the pathogenesis. Current research focuses on T-helper17 (Th17) cells and the group of Interleukins-17 (IL-17). This dissertation aims to elucidate the effects of blocking IL-17A and IL-17C in a rat model of ANCA-associated vasculitis. An experimental rat model of ANCA-associated vasculitis was used in this thesis.

Regarding renal damage, three weeks of anti-IL-17A antibody treatment showed decreased renal albumin excretion. This effect could not be observed under six weeks of therapy, as well as dose increase of anti-IL-17A. There was altered albuminuria under blockade of IL-17C. Histological glomerular renal damage showed no reduction under blockade of IL-17A or IL-17C.

Furthermore, evaluation of the petechial pulmonary bleedings revealed no difference by neutralization of interleukins. Immunohistochemically a high proportion of T cells, macrophages and neutrophil granulocytes could be detected in the pulmonary infiltrates.

Regarding humoral immunity, the level of autoantibodies was unchanged with anti-IL17A and anti-IL-17C antibody treatment.

At the gene expression level, six-week blockade of IL-17A resulted in decreased pulmonary IL-17A expression and increased pulmonary IL-17C expression under three- and six-week blockade. In contrast, neutralization of IL-17C tended to show lower pulmonary IL-17C and tended to show higher IL-17A expression. The gene expression levels of Chemokin-ligand 20 (CCL20) und C-C-X-motif-ligand 1 (CXCL1) could not be significantly altered by IL-17A and IL-17C blockade.

In conclusion, blockade of IL-17A or IL-17C did not unequivocally reduce disease activity.

6.Literaturverzeichnis

1. Abdulahad, W.H., Kallenberg, C.G., Limburg, P.C., and Stegeman, C.A. (2009). Urinary CD4+ effector memory T cells reflect renal disease activity in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 60, 2830-2838. 10.1002/art.24747.
2. Abdulahad, W.H., Stegeman, C.A., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G. (2008). Skewed distribution of Th17 lymphocytes in patients with Wegener's granulomatosis in remission. *Arthritis Rheum* 58, 2196-2205. 10.1002/art.23557.
3. Abdulahad, W.H., Stegeman, C.A., van der Geld, Y.M., Doornbos-van der Meer, B., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G. (2007). Functional defect of circulating regulatory CD4+ T cells in patients with Wegener's granulomatosis in remission. *Arthritis Rheum* 56, 2080-2091. 10.1002/art.22692.
4. Abdulahad, W.H., van der Geld, Y.M., Stegeman, C.A., and Kallenberg, C.G. (2006). Persistent expansion of CD4+ effector memory T cells in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int* 70, 938-947. 10.1038/sj.ki.5001670.
5. Alberts B, J.A., Lewis J, Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition (Garland Science).
6. Aloisi, F., and Pujol-Borrell, R. (2006). Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 6, 205-217. 10.1038/nri1786.
7. Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., Suda, W., Imaoka, A., Setoyama, H., Nagamori, T., Ishikawa, E., Shima, T., Hara, T., Kado, S., Jinnohara, T., Ohno, H., Kondo, T., Toyooka, K., Watanabe, E., Yokoyama, S., Tokoro, S., Mori, H., Noguchi, Y., Morita, H., Ivanov, II, Sugiyama, T., Nuñez, G., Camp, J.G., Hattori, M., Umesaki, Y., and Honda, K. (2015). Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* 163, 367-380. 10.1016/j.cell.2015.08.058.
8. Bouaziz, J.D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., and Musette, P. (2010). IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol* 40, 2686-2691. 10.1002/eji.201040673.
9. Brouwer, E., Tervaert, J.W., Horst, G., Huitema, M.G., van der Giessen, M., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G. (1991). Predominance of IgG1 and IgG4 subclasses of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in patients with Wegener's granulomatosis and clinically related disorders. *Clin Exp Immunol* 83, 379-386. 10.1111/j.1365-2249.1991.tb05647.x.
10. Chen, D.Y., Chen, Y.M., Wen, M.C., Hsieh, T.Y., Hung, W.T., and Lan, J.L. (2012). The potential role of Th17 cells and Th17-related cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis. *Lupus* 21, 1385-1396. 10.1177/0961203312457718.
11. Chiricozzi, A., and Krueger, J.G. (2013). IL-17 targeted therapies for psoriasis. *Expert Opin Investig Drugs* 22, 993-1005. 10.1517/13543784.2013.806483.

12. Cortvrindt, C., Speeckaert, R., Moerman, A., Delanghe, J.R., and Speeckaert, M.M. (2017). The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases. *Pathology* 49, 247-258. 10.1016/j.pathol.2017.01.003.
13. Csernok, E., Ai, M., Gross, W.L., Wicklein, D., Petersen, A., Lindner, B., Lamprecht, P., Holle, J.U., and Hellmich, B. (2006). Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood* 107, 4440-4448. 10.1182/blood-2005-05-1875.
14. Cui, Z., Zhao, M.H., Segelmark, M., and Hellmark, T. (2010). Natural autoantibodies to myeloperoxidase, proteinase 3, and the glomerular basement membrane are present in normal individuals. *Kidney Int* 78, 590-597. 10.1038/ki.2010.198.
15. Disteldorf, E.M., Krebs, C.F., Paust, H.J., Turner, J.E., Nouailles, G., Tittel, A., Meyer-Schwesinger, C., Stege, G., Brix, S., Velden, J., Wiech, T., Helmchen, U., Steinmetz, O.M., Peters, A., Bennstein, S.B., Kaffke, A., Llanto, C., Lira, S.A., Mittrücker, H.W., Stahl, R.A., Kurts, C., Kaufmann, S.H., and Panzer, U. (2015). CXCL5 drives neutrophil recruitment in TH17-mediated GN. *J Am Soc Nephrol* 26, 55-66. 10.1681/asn.2013101061.
16. Dolff, S., Quandt, D., Wilde, B., Feldkamp, T., Hua, F., Cai, X., Specker, C., Kribben, A., Kallenberg, C.G.M., and Witzke, O. (2010). Increased expression of costimulatory markers CD134 and CD80 on interleukin-17 producing T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* 12, R150. 10.1186/ar3100.
17. Dolff, S., Witzke, O., and Wilde, B. (2019). Th17 cells in renal inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 18, 129-136. 10.1016/j.autrev.2018.08.006.
18. Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G.R., Jones, C.E., and Trifilieff, A. (2003). IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* 170, 2106-2112. 10.4049/jimmunol.170.4.2106.
19. Flossmann, O., Bacon, P., de Groot, K., Jayne, D., Rasmussen, N., Seo, P., Westman, K., and Luqmani, R. (2007). Development of comprehensive disease assessment in systemic vasculitis. *Ann Rheum Dis* 66, 283-292. 10.1136/ard.2005.051078.
20. Flossmann, O., Berden, A., de Groot, K., Hagen, C., Harper, L., Heijl, C., Höglund, P., Jayne, D., Luqmani, R., Mahr, A., Mukhtyar, C., Pusey, C., Rasmussen, N., Stegeman, C., Walsh, M., and Westman, K. (2011). Long-term patient survival in ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 70, 488-494. 10.1136/ard.2010.137778.
21. Furuno, K., Yuge, T., Kusuhara, K., Takada, H., Nishio, H., Khajooe, V., Ohno, T., and Hara, T. (2004). CD25+CD4+ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease. *J Pediatr* 145, 385-390. 10.1016/j.jpeds.2004.05.048.
22. Gan, P.Y., Steinmetz, O.M., Tan, D.S., O'Sullivan, K.M., Ooi, J.D., Iwakura, Y., Kitching, A.R., and Holdsworth, S.R. (2010). Th17 cells promote autoimmune anti-

- myeloperoxidase glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 21, 925-931. 10.1681/asn.2009070763.
23. Gapud, E.J., Seo, P., and Antiochos, B. (2017). ANCA-Associated Vasculitis Pathogenesis: A Commentary. *Curr Rheumatol Rep* 19, 15. 10.1007/s11926-017-0641-0.
 24. Ghali, J.R., Holdsworth, S.R., and Kitching, A.R. (2015). Targeting IL-17 and IL-23 in Immune Mediated Renal Disease. *Curr Med Chem* 22, 4341-4365. 10.2174/0929867322666151030163022.
 25. Gómez-Puerta, J.A., Gedmintas, L., and Costenbader, K.H. (2013). The association between silica exposure and development of ANCA-associated vasculitis: systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 12, 1129-1135. 10.1016/j.autrev.2013.06.016.
 26. Harper, L., Cockwell, P., Adu, D., and Savage, C.O. (2001). Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Kidney Int* 59, 1729-1738. 10.1046/j.1523-1755.2001.0590051729.x.
 27. Hogan, S.L., Nachman, P.H., Wilkman, A.S., Jennette, J.C., and Falk, R.J. (1996). Prognostic markers in patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated microscopic polyangiitis and glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 7, 23-32. 10.1681/asn.V7123.
 28. Holden, N.J., Williams, J.M., Morgan, M.D., Challa, A., Gordon, J., Pepper, R.J., Salama, A.D., Harper, L., and Savage, C.O. (2011). ANCA-stimulated neutrophils release BlyS and promote B cell survival: a clinically relevant cellular process. *Ann Rheum Dis* 70, 2229-2233. 10.1136/ard.2011.153890.
 29. Hoshino, A., Nagao, T., Nagi-Miura, N., Ohno, N., Yasuhara, M., Yamamoto, K., Nakayama, T., and Suzuki, K. (2008). MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner. *J Autoimmun* 31, 79-89. 10.1016/j.jaut.2008.03.006.
 30. Hruskova, Z., Rihova, Z., Mareckova, H., Jancova, E., Rysava, R., Zavada, J., Merta, M., Löster, T., and Tesar, V. (2009). Intracellular cytokine production in ANCA-associated vasculitis: low levels of interleukin-10 in remission are associated with a higher relapse rate in the long-term follow-up. *Arch Med Res* 40, 276-284. 10.1016/j.arcmed.2009.04.001.
 31. Hu, N., Westra, J., and Kallenberg, C.G. (2011). Dysregulated neutrophil-endothelial interaction in antineutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA)-associated vasculitides: implications for pathogenesis and disease intervention. *Autoimmun Rev* 10, 536-543. 10.1016/j.autrev.2011.04.004.
 32. Ivanov, S., Bozinovski, S., Bossios, A., Valadi, H., Vlahos, R., Malmhäll, C., Sjöstrand, M., Kolls, J.K., Anderson, G.P., and Lindén, A. (2007). Functional relevance of the IL-

- 23-IL-17 axis in lungs in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 442-451. 10.1165/rcmb.2006-0020OC.
33. Janeway CA Jr, T.P., Walport M, Traver, P., Shlomchik, M., (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th Edition (Garland Science).
34. Jennette, C.J., Milling, D.M., and Falk, R.J. (1994). Vasculitis affecting the skin. A review. *Arch Dermatol* 130, 899-906.
35. Jennette, J.C., and Falk, R.J. (1997). Small-vessel vasculitis. *N Engl J Med* 337, 1512-1523. 10.1056/nejm199711203372106.
36. Kallenberg, C.G., Heeringa, P., and Stegeman, C.A. (2006). Mechanisms of Disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2, 661-670. 10.1038/ncprheum0355.
37. Kamesh, L., Harper, L., and Savage, C.O.S. (2002). ANCA-Positive Vasculitis. *Journal of the American Society of Nephrology* 13, 1953-1960. 10.1097/01.Asn.0000016442.33680.3e.
38. Kissel, J.T., and Mendell, J.R. (1992). Vasculitic neuropathy. *Neurol Clin* 10, 761-781.
39. Kolls, J.K., and Lindén, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467-476. 10.1016/j.immuni.2004.08.018.
40. Koselj-Kajtna, M., Koselj, M., Rott, T., Kandus, A., and Bren, A. (2002). Infectious complications of immunosuppressive treatment for anti-neutrophil cytoplasm antibody-related vasculitis. *Transplant Proc* 34, 3001-3002. 10.1016/s0041-1345(02)03514-5.
41. Krohn, S., Nies, J.F., Kapffer, S., Schmidt, T., Riedel, J.H., Kaffke, A., Peters, A., Borchers, A., Steinmetz, O.M., Krebs, C.F., Turner, J.E., Brix, S.R., Paust, H.J., Stahl, R.A.K., and Panzer, U. (2018). IL-17C/IL-17 Receptor E Signaling in CD4(+) T Cells Promotes T(H)17 Cell-Driven Glomerular Inflammation. *J Am Soc Nephrol* 29, 1210-1222. 10.1681/asn.2017090949.
42. Little, M.A., Nightingale, P., Verburgh, C.A., Hauser, T., De Groot, K., Savage, C., Jayne, D., and Harper, L. (2010). Early mortality in systemic vasculitis: relative contribution of adverse events and active vasculitis. *Ann Rheum Dis* 69, 1036-1043. 10.1136/ard.2009.109389.
43. Little, M.A., Smyth, L., Salama, A.D., Mukherjee, S., Smith, J., Haskard, D., Nourshargh, S., Cook, H.T., and Pusey, C.D. (2009). Experimental autoimmune vasculitis: an animal model of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis. *Am J Pathol* 174, 1212-1220. 10.2353/ajpath.2009.080458.
44. Meng, T., Li, X., Ao, X., Zhong, Y., Tang, R., Peng, W., Yang, J., Zou, M., and Zhou, Q. (2014). Hemolytic Streptococcus may exacerbate kidney damage in IgA nephropathy through CCL20 response to the effect of Th17 cells. *PLoS One* 9, e108723. 10.1371/journal.pone.0108723.

45. Merkel, P.A., Xie, G., Monach, P.A., Ji, X., Ciavatta, D.J., Byun, J., Pinder, B.D., Zhao, A., Zhang, J., Tadesse, Y., Qian, D., Weirauch, M., Nair, R., Tsoi, A., Pagnoux, C., Carette, S., Chung, S., Cuthbertson, D., Davis, J.C., Jr., Dellaripa, P.F., Forbess, L., Gewurz-Singer, O., Hoffman, G.S., Khalidi, N., Koenig, C., Langford, C.A., Mahr, A.D., McAlear, C., Moreland, L., Seo, E.P., Specks, U., Spiera, R.F., Sreih, A., St Clair, E.W., Stone, J.H., Ytterberg, S.R., Elder, J.T., Qu, J., Ochi, T., Hirano, N., Edberg, J.C., Falk, R.J., Amos, C.I., and Siminovitch, K.A. (2017). Identification of Functional and Expression Polymorphisms Associated With Risk for Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Vasculitis. *Arthritis Rheumatol* 69, 1054-1066. 10.1002/art.40034.
46. Mitoma, H., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., Tamimoto, Y., Kimoto, Y., Uchino, A., To, K., Harashima, S., Hatta, N., and Harada, M. (2008). Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab. *Arthritis Rheum* 58, 1248-1257. 10.1002/art.23447.
47. Morgan, M.D., Day, C.J., Piper, K.P., Khan, N., Harper, L., Moss, P.A., and Savage, C.O. (2010). Patients with Wegener's granulomatosis demonstrate a relative deficiency and functional impairment of T-regulatory cells. *Immunology* 130, 64-73. 10.1111/j.1365-2567.2009.03213.x.
48. Mueller, A., Holl-Ulrich, K., Lamprecht, P., and Gross, W.L. (2008). Germinal centre-like structures in Wegener's granuloma: the morphological basis for autoimmunity? *Rheumatology (Oxford)* 47, 1111-1113. 10.1093/rheumatology/ken202.
49. Müller, A., Trabandt, A., Gloeckner-Hofmann, K., Seitzer, U., Csernok, E., Schönermarck, U., Feller, A.C., and Gross, W.L. (2000). Localized Wegener's granulomatosis: predominance of CD26 and IFN-gamma expression. *J Pathol* 192, 113-120. 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::Aid-path656>3.0.Co;2-m.
50. Nagao, T., Suzuki, K., Utsunomiya, K., Matsumura, M., Saiga, K., Wang, P.-C., Minamitani, H., Aratani, Y., Nakayama, T., and Suzuki, K. (2011). Direct activation of glomerular endothelial cells by anti-moesin activity of anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrology Dialysis Transplantation* 26, 2752-2760. 10.1093/ndt/gfr032.
51. Nogueira, E., Hamour, S., Sawant, D., Henderson, S., Mansfield, N., Chavele, K.M., Pusey, C.D., and Salama, A.D. (2010). Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 25, 2209-2217. 10.1093/ndt/gfp783.
52. Odobasic, D., Gan, P.Y., Summers, S.A., Semple, T.J., Muljadi, R.C., Iwakura, Y., Kitching, A.R., and Holdsworth, S.R. (2011). Interleukin-17A promotes early but attenuates established disease in crescentic glomerulonephritis in mice. *Am J Pathol* 179, 1188-1198. 10.1016/j.ajpath.2011.05.039.
53. Ooi, J.D., Kitching, A.R., and Holdsworth, S.R. (2010). Review: T helper 17 cells: their role in glomerulonephritis. *Nephrology (Carlton)* 15, 513-521. 10.1111/j.1440-1797.2010.01343.x.

54. Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., and Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6, 1133-1141. 10.1038/ni1261.
55. Paust, H.J., Turner, J.E., Riedel, J.H., Disteldorf, E., Peters, A., Schmidt, T., Krebs, C., Velden, J., Mittrücker, H.W., Steinmetz, O.M., Stahl, R.A., and Panzer, U. (2012). Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 82, 72-83. 10.1038/ki.2012.101.
56. Pendergraft, W.F., 3rd, and Niles, J.L. (2014). Trojan horses: drug culprits associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA) vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 26, 42-49. 10.1097/bor.0000000000000014.
57. Pendergraft, W.F., 3rd, Preston, G.A., Shah, R.R., Tropsha, A., Carter, C.W., Jr., Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2004). Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat Med* 10, 72-79. 10.1038/nm968.
58. Rathmann, J., Jayne, D., Segelmark, M., Jönsson, G., and Mohammad, A.J. (2021). Incidence and predictors of severe infections in ANCA-associated vasculitis: a population-based cohort study. *Rheumatology (Oxford)* 60, 2745-2754. 10.1093/rheumatology/keaa699.
59. Ritzmann, F., Lunding, L.P., Bals, R., Wegmann, M., and Beisswenger, C. (2022). IL-17 Cytokines and Chronic Lung Diseases. *Cells* 11. 10.3390/cells11142132.
60. Robson, J., Doll, H., Suppiah, R., Flossmann, O., Harper, L., Höglund, P., Jayne, D., Mahr, A., Westman, K., and Luqmani, R. (2015). Damage in the anca-associated vasculitides: long-term data from the European vasculitis study group (EUVAS) therapeutic trials. *Ann Rheum Dis* 74, 177-184. 10.1136/annrheumdis-2013-203927.
61. Sakaguchi, S., Setoguchi, R., Yagi, H., and Nomura, T. (2006). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 305, 51-66. 10.1007/3-540-29714-6_3.
62. Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22, 745-763. 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.
63. Sanders, J.S., Huitma, M.G., Kallenberg, C.G., and Stegeman, C.A. (2006). Plasma levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD30, interleukin 10 and B cell activator of the tumour necrosis factor family during follow-up in vasculitis associated with proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibodies: associations with disease activity and relapse. *Ann Rheum Dis* 65, 1484-1489. 10.1136/ard.2005.046219.
64. Schirmer, J.H., Aries, P.M., de Groot, K., Hellmich, B., Holle, J.U., Kneitz, C., Kötter, I., Lamprecht, P., Müller-Ladner, U., Reinhold-Keller, E., Specker, C., Zänker, M., and

- Moosig, F. (2017). S1-Leitlinie Diagnostik und Therapie der ANCA-assoziierten Vaskulitiden. *Zeitschrift für Rheumatologie* 76, 77-104. 10.1007/s00393-017-0394-1.
65. Schmidt, T., Paust, H.J., Krebs, C.F., Turner, J.E., Kaffke, A., Bennstein, S.B., Koyro, T., Peters, A., Velden, J., Hünemörder, S., Haag, F., Steinmetz, O.M., Mittrücker, H.W., Stahl, R.A., and Panzer, U. (2015). Function of the Th17/interleukin-17A immune response in murine lupus nephritis. *Arthritis Rheumatol* 67, 475-487. 10.1002/art.38955.
 66. Schmitt, W.H., Heesen, C., Csernok, E., Rautmann, A., and Gross, W.L. (1992). Elevated serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with Wegener's granulomatosis. Association with disease activity. *Arthritis Rheum* 35, 1088-1096. 10.1002/art.1780350914.
 67. Schneeweis, C., Rafalowicz, M., Feist, E., Buttgereit, F., Rudolph, P.E., Burmester, G.R., and Egerer, K. (2010). Increased levels of BLYS and sVCAM-1 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides (AAV). *Clin Exp Rheumatol* 28, 62-66.
 68. Schreiber, A., and Kettritz, R. (2013). The neutrophil in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *J Leukoc Biol* 94, 623-631. 10.1189/jlb.1012525.
 69. Seo, P., Min, Y.I., Holbrook, J.T., Hoffman, G.S., Merkel, P.A., Spiera, R., Davis, J.C., Ytterberg, S.R., St Clair, E.W., McCune, W.J., Specks, U., Allen, N.B., Luqmani, R.A., and Stone, J.H. (2005). Damage caused by Wegener's granulomatosis and its treatment: prospective data from the Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial (WGET). *Arthritis Rheum* 52, 2168-2178. 10.1002/art.21117.
 70. Söderberg, D., and Segelmark, M. (2016). Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis. *Front Immunol* 7, 256. 10.3389/fimmu.2016.00256.
 71. Stegeman, C.A., Tervaert, J.W., Huitema, M.G., and Kallenberg, C.G. (1993). Serum markers of T cell activation in relapses of Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 91, 415-420. 10.1111/j.1365-2249.1993.tb05918.x.
 72. Tipping, P.G., and Holdsworth, S.R. (2006). T cells in crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 17, 1253-1263. 10.1681/asn.2005091013.
 73. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199, 971-979. 10.1084/jem.20031579.
 74. Voswinkel, J., Mueller, A., Kraemer, J.A., Lamprecht, P., Herlyn, K., Holl-Ulrich, K., Feller, A.C., Pitann, S., Gause, A., and Gross, W.L. (2006). B lymphocyte maturation in Wegener's granulomatosis: a comparative analysis of VH genes from endonasal lesions. *Ann Rheum Dis* 65, 859-864. 10.1136/ard.2005.044909.
 75. Voswinkel, J., Müller, A., and Lamprecht, P. (2005). Is PR3-ANCA formation initiated in Wegener's granulomatosis lesions? Granulomas as potential lymphoid tissue maintaining autoantibody production. *Ann N Y Acad Sci* 1051, 12-19. 10.1196/annals.1361.042.

76. Wen, Z., Xu, L., Xu, W., Yin, Z., Gao, X., and Xiong, S. (2013). Interleukin-17 expression positively correlates with disease severity of lupus nephritis by increasing anti-double-stranded DNA antibody production in a lupus model induced by activated lymphocyte derived DNA. *PLoS One* 8, e58161. 10.1371/journal.pone.0058161.
77. Wilde, B., Thewissen, M., Damoiseaux, J., Hilhorst, M., van Paassen, P., Witzke, O., and Cohen Tervaert, J.W. (2012). Th17 expansion in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): the role of disease activity, immune regulation and therapy. *Arthritis Res Ther* 14, R227. 10.1186/ar4066.
78. Wilde, B., Thewissen, M., Damoiseaux, J., Knippenberg, S., Hilhorst, M., van Paassen, P., Witzke, O., and Cohen Tervaert, J.W. (2013). Regulatory B cells in ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 72, 1416-1419. 10.1136/annrheumdis-2012-202986.
79. Wilde, B., Thewissen, M., Damoiseaux, J., van Paassen, P., Witzke, O., and Tervaert, J.W. (2010). T cells in ANCA-associated vasculitis: what can we learn from lesional versus circulating T cells? *Arthritis Res Ther* 12, 204. 10.1186/ar2923.
80. Xiao, H., Heeringa, P., Hu, P., Liu, Z., Zhao, M., Aratani, Y., Maeda, N., Falk, R.J., and Jennette, J.C. (2002). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest* 110, 955-963. 10.1172/jci15918.
81. Xu, P.C., Cui, Z., Chen, M., Hellmark, T., and Zhao, M.H. (2011). Comparison of characteristics of natural autoantibodies against myeloperoxidase and anti-myeloperoxidase autoantibodies from patients with microscopic polyangiitis. *Rheumatology (Oxford)* 50, 1236-1243. 10.1093/rheumatology/ker085.
82. Yamaguchi, S., Nambu, A., Numata, T., Yoshizaki, T., Narushima, S., Shimura, E., Hiraishi, Y., Arae, K., Morita, H., Matsumoto, K., Hisatome, I., Sudo, K., and Nakae, S. (2018). The roles of IL-17C in T cell-dependent and -independent inflammatory diseases. *Sci Rep* 8, 15750. 10.1038/s41598-018-34054-x.
83. Zhang, F., Yin, J., Liu, L., Liu, S., Zhang, G., Kong, Y., Wang, Y., Wang, N., Chen, X., and Wang, F. (2023). IL-17C neutralization protects the kidney against acute injury and chronic injury. *EBioMedicine* 92, 104607. 10.1016/j.ebiom.2023.104607.

7. Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitiden
ALD-DNA	aktivierte Lymphozyten-abgeleiteten DNA
ANCA	Anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BAFF	B-Zell aktivierender Faktor

BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Breg	Regulatorische B-Zellen
BVAS	Birmingham vasculitis activity score
CD	Cluster of differentiation
CT	Cycle threshold
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EGPA	Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAB	Fragment antigen binding
FC	Fragment crystallisable
fc	Fold Change
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GC	Glucocorticoide
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
HE	Hämatoxylin-Eosin

i.p.	intraperitoneal
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MPO	Myeloperoxidase
NET	Neutrophil extracellular traps
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NTN	Nephrotoxische Nephritis
PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PR-3	Proteinase-3
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
Teffs	CD4+ T-Effektorzellen
Tem	Effektor T-Gedächtniszellen
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TLO	Tertiäre lymphoide Organe
TNF	Tumornekrosefaktor
Tregs	Regulatorische T-Zellen

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IL-17 und deren Rolle bei renaler Entzündung.	15
Abbildung 2: IL-17A Blockade im MPO-Vaskulitis Modell.	27
Abbildung 3: IL-17C Blockade im MPO-Vaskulitis Modell.	28
Abbildung 4: Histologisches Bild eines abnormalen Glomerulums in der Niere.	30
Abbildung 5: Petechiale Einblutungen an der Lungenoberfläche.	31
Abbildung 6: Albuminurie unter Behandlung mit dem anti-IL-17A und anti-IL-17C Antikörper.	37
Abbildung 7: Histologisch quantifizierter glomerulärer Nierenschaden bei IL-17A und IL-17C Blockade.	39
Abbildung 8: Pulmonale Vaskulitis unter IL-17A und IL-17C Blockade.....	41
Abbildung 9: Prozentualer Anteil infiltrierter Lungenareale unter IL-17A Blockade. ..	42
Abbildung 10: Histologische Übersichtsaufnahmen von Lungen.	43
Abbildung 11: Bilderreihe lichtmikroskopischer Aufnahmen von immunhistochemischen Lungenschnitten eines unbehandelten Tieres.	44
Abbildung 12: Bilderreihe lichtmikroskopischer Aufnahmen von immunhistochemischen Lungenschnitten von einem Tier mit dreiwöchiger anti-IL-17A Behandlung.	45
Abbildung 13: Bilderreihe lichtmikroskopischer Aufnahmen von immunhistochemischen Lungenschnitten von einem Tier mit sechswöchiger anti-IL- 17A Behandlung.	46
Abbildung 14: Anti-MPO Verdünnungstitere von Tieren mit anti-IL-17A und anti-IL- 17C Behandlung.	48
Abbildung 15: pulmonale Genexpression von IL-17A unter anti-IL-17A Behandlung und anti-IL-17C Behandlung.	50
Abbildung 16: Verlauf der Genexpression von IL-17C bei zwei-, vier- und sechs Wochen unbehandelten Tieren in Niere, Milz und Lunge.	51
Abbildung 17: Renale Genexpression von IL-17C unter IL-17A und IL-17C Blockade.	52
Abbildung 18: Genexpression von IL-17C in der Milz bei Neutralisation von IL-17A und IL-17C.	53
Abbildung 19: Pulmonale Genexpression von IL-17C unter Behandlung mit anti-IL- 17A und anti-IL-17C Antikörper.	54

Abbildung 20: Verlauf der Genexpression von CCL20 bei zwei-, vier- und sechs Wochen unbehandelten Tieren in Niere, Milz und Lunge.	57
Abbildung 21: Renale Genexpression von CCL20 unter IL-17A und IL-17C Blockade.	59
Abbildung 22: Genexpression von CCL20 in der Milz unter Neutralisation von IL-17A und IL-17C.	59
Abbildung 23: Pulmonale Genexpression von CCL20 unter anti-IL-17A Antikörper und anti-IL-17C Antikörper Behandlung.	61
Abbildung 24: Verlauf der Genexpression von CXCL1 bei zwei-, vier- und sechs Wochen unbehandelten Tieren in Niere, Milz und Lunge.	62
Abbildung 25: Renale Genexpression von CXCL1 in der Niere bei Blockade von IL-17A und IL-17C.	64
Abbildung 26: Genexpression von CXCL1 in der Milz unter IL-17A und IL-17C Blockade.	65
Abbildung 27: Pulmonale Expression von CXCL1 von Ratten mit anti-IL-17A und anti-IL-17C Antikörper Behandlung.	66
Abbildung 28: Zusammenfassung der Ergebnisse der IL-17A und IL-17C Blockade ..	75

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterial	18
Tabelle 2: Antikörper Immunhistochemie	21
Tabelle 3: PCR-Primer	22
Tabelle 4: Tiermodell	23
Tabelle 5: Geräte	24
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antikörper und Zielstrukturen	33
Tabelle 7: Übersicht der Genexpression von IL-17A und IL-17C unter Antikörpertherapie	49
Tabelle 8: Übersicht der Genexpression von CCL20 und CXCL1 unter Antikörpertherapie	56

8. Anhang

8.1 Primersequenzen

Gen	Sequenz
Interferon, alpha 4	1 atggctagge tctgtcttt cctgatggtt ctgggtgga tgagctactg gtcacctgc 61 tgtctagat gtgacctgcc tcccactctc aatctcagga acaagagagc cttcacactc 121 ctggcacaaa tgaggagact ctcccctgtc tctgctcga aggacagaca ggactttgga 181 ttccccagg agaaggtgga tgcccagcag atccagaagg ctcaaaccat cctgttctg 241 catgagctgt cccagcaggt cctgaacatc ttcacatcaa aggactcatc tctgcttgg 301 aatgcaaccc tctagactc attctgcaat gacctccacc agcagctcag tgacctcaaa 361 gtctgtctga tgcagcaggt tggaatgcaa gaacctcccc taaccaaga agactccctg 421 ctggctgtgc gggaaactt ccacaggatc actgtgtacc tgacagagaa gaaacacagc 481 ccctgtgcct gggaaagtgt cagagcagaa gtgtggagag ccctgtcttc ctacgtctac 541 ttgtagcaa aactgagtga ggagaagtga
Actin, beta	1 gtcgagtccg cgtccaccg cgagtacaac ctctctcag ctctccctc gccggctccac 61 accgccacc agttcgccat ggatgacgat atcgctgcgc tctctctga caacggctcc 121 ggcatgtgca aggcgggtt cggggcgac gatgctccc gggcctctt cccctccatc 181 gtggggccc ctaggcacca ggggtgatg gtgggtatgg gtcagaagga ctctactctg 241 ggcgacgagg cccagagcaa gagaggcatc ctgacctga agtacctcat tgaacagggc 301 attgtacca actgggagca tatggagaag atttggcacc acacttcta caatgagctg 361 cgtgtggccc ctgaggagca cctgtgctg ctaccgagg cccctctgaa ccctaaggcc 421 aacctgaaa agatgacca gatcatgtt gagacctca acacccagc catgtacgta 481 gccatccagg ctgtgtgtc cctgtatgcc tctgtctgta ccactggcat tgtatggac 541 tccggagacg gggcaccca cactgtgcc atctatgagg gttacgcct cccctatgcc 601 atctctgctc tggacctggc tggccgggac ctgacagact acctcatgaa gatcctgacc 661 gagcgtggct acagcttacc caccacagct gagagggaaa tctgtcgtga caftaaagag 721 aagctgtgct atgttccct agactcag caagagatgg ccactgccgc atcctctcc
	781 tccctggaga agagctatga gctgcctgac ggtcaggta tcaatcctg caatgagcgg 841 ttccgatgcc ccgaggctct ctccagcct tctctctgg gtatggaatc ctgtggcac 901 catgaaacta caftcaatc catcatgaag tgtgacttg acatccgtaa agacctctat 961 gccaacacag tctgtctgg tggcaccacc atgtaccagc gattgctga caggatgag 1021 aaggagatta ctgcccctggc tctagcacc atgaagatca agatcattgc tctctctgag 1081 cgcaagtact ctgtgtgat tgggtgctct atctggcct cactgtcac ctccagcag 1141 atgtggatca gcaagcagga gtacgatgag tccggcccct ccactgtgca ccgcaatgc 1201 ttctagcggc actgttactg agctgcgtt tacaccttt cttgacaaa acctaactg 1261 cgcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa
Interferon beta 1, fibroblast	1 atggccaaca ggtggaccct ccacattgcg tctctgtgt gttctccac cactgccctc 61 tccatgact acaagcagct ccagttccga caaagcacta gcattggagc atgtcagaag 121 ctctgaggc agtgaatgg aaggtcaac ctacgtaca ggacggactt caagatccct 181 atggaggtga tgcaccctgc acagatggag aagagtaca ctgccccttc caftcaatg 241 atgtccaga atgtcttct tctctcaga agcaattct ccagcactgg gtggaatgag 301 actattgtt aaagtctct ggatgaacta catcagcaga cagagcttct ggagataata 361 ctaaaggaaa agcaagagga aagattgact tgggtgacat ccagactac ttaggcttg 421 aagagctatt actggagggt acaaggtac ctaaagaca agaagtaca cagctatgcc 481 tggatggtg tccagcaga agtcttcagg aactttcca ttattctaa actaataga 541 aactccaga actga
Interleukin-17C	1 atggccactg tcactgccac tgtgatgtg ctctctcctc tagcctggtt gcctactggg 61 ataaccacc aagatcccc attctggggg aaaccccga gccataagc gacattgagg 121 tctactcgg ctgaggagct ctctcagggc caggctcctc cgcacctgct aactggaat 181 gccaggtggg agcaggccct ccctgtggcc ctagtggcca gctgtggagg cacaggccgc 241 aggagacagc aagaaggacc tctacctgga acacagtgcc cgtgtctgcg gccagaggag 301 gtgctggaag ctgacacca cgagcgtctc atctaccat ggagatatc catcgacaca 361 gatgagaacc gctaccgca gaagctggca gtggcggaat gcttgtctg gggttgcatc 421 aacgccaaga cgggtcgcga gaccgtgcc ctgaactctg tgcagctgct gcagagccta 481 ctggtctga gacgacggc ctgctccaa gacggtgccg cagacctac accagatct 541 ttcacttcc acactgatt catccgctg cctgtcgtt gcacctgtg tcttccagg 601 tctacgagt ga

CD274	<p>1 atgaggatat ttgctgtct tatagtcaca gcctgcagtc acgtgctagc ggcattfacc 61 atcacagctc caaaggacct gtacgtggtg gagtatggca gcaatgtcac gatggaatgc 121 agattcccag tagaacagaa atfggacctg ctfgccttag tgggtgactg ggaagaaggaa 181 gacaaggaag ttatfcagtt tgtggaggga gaggaggacc tgaagcctca acacagcagc 241 ttacggggga gagccttctt gccaaaggac cagcttttga aggggaacgc ggtgcttcag 301 atcacagatg tcaagctgca ggacgcaggt gtctactgct gcatgatcag ctatggtgga 361 gcgactaca agegaatcac atgaaaagtc aacgctccat accgcaaat caaccaaaga 421 atttccatgg atccagccac ttctgagcat gaactaatgt gccaggctga gggftaccca 481 gaagccgaag tgatctggac aaacagtgac caccagtccc tgagtgggga aacaactgtc 541 accactccc agactgagga gaagcttctc aacgtgacca gcgttctgag ggtcaacgca 601 acagctaag atgttttcca ctgtactgtc tggagagtac actcagggga gaaccacag 661 gctgaactga tcatcccaga actgcctgta ccacgtctcc cacataacag gacacactgg 721 gtactctgg gatccgtct tttgtctc atcgtgggt taccgtctt ctctgctt 781 agaaaacaag tgagaatgct agatgtgga aatgcggct tgaagatag aaattcaag 841 aacgaaatg atacacagt cgaggagacg taa</p>
Transmembranöses Protein 173	<p>1 ctctcctggg ctctactaa atcttagct tagagcccga gatttcagga agtagagt 61 gctgttacc ctctcaatct ctctgtgca atctccctc ctgatgtct agggatagat 121 agtggagggt ttggggcat ctgaaatcc tttgggggac cctgtcactt tgggtcctt 181 tgtgagctct gctggtgtc tactgcagc gttgtcatcc cacggacctf tagaggaatc 241 cggagtggg ggctgtgact gctgtctgcc cttgagagg ccaactggcc gtcgctacag 301 aagggtctt catagtctt ccagttccag gaacacttcg gtctaggaag cagaagatgc 361 catactcaa cctgcatcca tccatccac ggcccagaag ttacccttc aaactggcag 421 cctcgtctt gctggtggg agcctgatga gcctttggat gacaggggaa ccaccaagtc 481 acactctca ttacctaga cttcacgtag cctcgcagca acttgatta ctgttgaana 541 agctctgctg tctgctgaa gagttgtgcc atgtccagtc caggtaccag ggcagctact 601 ggaaggctg gcgcctctc gtggggagtc ccactgtct tatggcctg atctactgt 661 cattttatt ctactgtcc ctgaaaata ctctgacct gcgccttct tggcatctt 721 gcatcctgt ccttcaag tcctaaaga tgacctgga ccttcagagc ttggcccag 781 cagaagtctc tgggtctgt gaagaaaaga acttcaatgt tggccatgga ctggcctgt 841 cgtactacat tgggtacctg aagctgatct tggcaggact gcaggcccgg atccgatgt 901 tcaatcagct acacaaca atgctctcgg gtgcggggag ccggcggctg tatactctt 961 tccattgga ctgtggggg cctgatgac tgaagtgtgc tgacccaat atcgattcc 1021 gagatagtct gcccagcaa aacacagacc gtgctggcgt caagaatcgg gcttattcca 1081 acagtgtcta tgaactctg gagaatggc agccggcagg tgcctgtatc ctggagtacg 1141 ccaccccct gcagacctg tttgcaatgt cacaggatgg caaagctggc ttcagtggg 1201 aggaccgct tgagcagccc aaactctct gtcggacact tgaggaaat ctggctgatg 1261 tccctgagtc tcgaaccac tgcgcctca ttgtctacca agaatccgaa gagggaaaca 1321 gttctcgtct gtctcaggag gtgctcggc acattcgca agaagaaaag gaggaagtta 1381 ccatgagtgg cccccgacc tcagtggcac ctgctcctc ctactgtcc caagagccga 1441 gacttctcat cagtggcatg gacgagcctc tccactccg cacggacctc atctgaggca 1501 tgagacagcc ttgctgggt cccagtgacc ctacgctc ttgactggg tcccccttaa 1561 tggctggggg cctcatagag acttcacatc tccagatgag tcccactc cggggcaagc</p>
	<p>1621 cacttcact ctctgacct cagcctgccc cactccaaag gccatcataa ggtattccct 1681 gcccactcag ggtttttgt aagacaatac atgtagaagt ttggtgtcaa tgcctgta 1741 acttgagaga taggccaagt atttccatg atgatcagca ttctccactc tctgtgact 1801 tgtgtgggtt gttccagcag acctctgacc cagcttctgg tcatgtgtg tcaacgggag 1861 cctcagtaga tggagagagg gagaaggaac atgtgtctg taggcagta cagtgggccc 1921 ccctgccagg ctgtctctc agtaaacata ttattctca gtttctaga atggtctt 1981 ctcttggccc cagcactggt attgtgtga cactggagta ctactgtct gttgtctt</p>

<p>Mab-21 domain containing 1</p>	<p>1 ctcttgacc gcctctctt ggcgctgaat cctgcgctg ctggtggcgc ttacagacag 61 gctacttcc cgcacattt ttaagttfc ttccagcgg tcaactgagag ttcccctcc 121 cgcggccttt ctccgaagtc gattatactf tctggcagcg aaggaagaac ggcagatatg 181 gaagatccgc gtagaaggac gacggcgccc cgcgctaaga agcctgtgc gaagcgcgcc 241 ccgacgggc ccagcggaac ccggccacc gtgtcccag cgggaagctg cggcccgcga 301 agagggcgc gatcgcgacg ggtggagcgt gacggggaca ccacggaga gccacacacc 361 ccagcgcctt gactgcctc cagaaggcc gctgagcga ccgaggatg acagccctg 421 gccacggacg cggctggagc ctccgagagg cccgcggtcc gggagccca gcggcaagt 481 atcctgatc ctgagccgc cgtgtgccc gagccccag cggccgagga tcccggagg 541 ccgactgtc caaggggacc tgtccgaga agggggcac gtcctaccg gcagcccaga 601 gcgtcgcaag ggtccaggaa ggagccagac aagctaaaga aggtgctgga caaatggaga 661 ttgaaacga aagaaatct gcgcgccc gagacggtga ataaagctg ggtcaactg 721 ctgcgagaa tgcagagacg ggagtcgag tcaaaaggc tggagcagt gaacaccggc 781 agctattat aacatgtaa gatttctct ctaataat ttgatgat gtttaactg 841 gaagtcaca gaatcgagt agaagaat tacaagaact gtccttcta tctgtgag 901 ttcaagaaa ttccagagg aatcctctg agtatttt tagaaggga agtattatca 961 gctaccaag tctgtcaaa gtttaggaa ctattaag aagaagtga agagatcaaa 1021 gatacagatg tcaccgtgga ggaggaaaa ccaggaaacc ctgctgtaac ccttctatc 1081 aggaacctg aagaaatct tttgatata atctgctt tggaaatgaa aggcagctg 1141 cctattagta ccaaaggag actacctat caagctggc tcggcacaaa agtggaggc 1201 aatctaagc gagagccgt ttatctgta ccaagaatg caaagatg aaatctgtt 1261 caagttagt taatgtaa gattgccgg aggggtgtac aaggctctt agtctctct 1321 gcaaaagcag gaaaagatga acacagatg tctgtgcatt ttacagactg tcaggctaaa 1381 cagaccgcaa aatgagtga gccagctcag cctgagaagt gttgtgctg cctactcag 1441 aaggctcag gcaggagcac aggg</p>
<p>Matrix Metallopeptidase 2</p>	<p>1 ctggcgtctg cccgccctt ttccgctgc atccagact cccgggtgg ctggaggctc 61 tctgtcatc cagaactta gatatacaa gggattacta ggactgcaa gcaccgcag 121 ccgtggtgc tactgttac tggatccc ttatgagacc ctgagcccga agaagctgag 181 gcaattgagt aaaggggtct cagaaccgc tggagagcag gcgccaccg ggtggacccc 241 agggcacagc cagcagctc agggtgacac gcggagccc ggagcgcaag gatggaggca 301 cgattggtc ggggagtgct cgtggccct ctgcgggtc tctgctct ctgtgctctg 361 ctggggcacc ccatcctgc accgtcccc atcatcaagt tcccggcga tctctcccc 421 aaaacagaa aagagtggc agtgcaata ctgaacatt tctatggctg ccccaaggag 481 agttgcaacc tcttctgct gaagacacc ctcaagaaga tgcagaagt cttggctg 541 cccagacagc gtgacctga ccagaacc atcgagacca tgcggaaacc aagatgtggc 601 aaccagatg tggccaacta caactctt ccccgaagc ccaagtggga caagaatcag 661 atcacatac gcatattgg ttacacact gacctggacc ctgagacagt ggtgatgac 721 tttctcggg ccttaaaagt atggagcgc gtaactcac tacgtttc tcgaatcat 781 gatgggaag ctgacatc gatcaactt ggtgatgg agcatgaga tggatacca 841 ttgacggca aggcagact cctggcac gccttccc cgggactgg tttggggga 901 gatttcaat ttgatgaca tgaactgtg actctaggag aaggacaagt ggtccgagta 961 aagatggga acgctgatg cgagtactc aagttccct tctgttaa tggcgggaa 1021 tacagcagc gcacagac tggccgagt gacgctcc tctgtgtc caccacgtac 1081 aactttgaa aggcggcaa atatgctt tctcccacg aagcctgtt taccatggg 1141 ggcaatggag atggacagc ctgcaagt ccttccgct tccaggcac ctctacaac 1201 agctgtacca ccgaggcgc tacagagc taccgtgt gtggcacc cgaggattat 1261 gaccgggata agaagtatg attctgcca gagactgta tctcactgt ggttggaaat 1321 tcagaaggtg cccatgtgt ctcccctt actttctgg gcaacaagta tgagagctg 1381 accagcctg gccgaagcga tggcaagggt tgggtgtgcaa ccacaacca ctacgatg 1441 gaccggaagt gggcctctg tccgaccaa ggatatagc tctctgtg ggcagccat 1501 gattcggcc atgcatggg gctggaac tcacaggacc ctggagctt gatggccct 1561 atctacact acaccaaga ctccgacta tcaatgat acatcaagg gatccaggag 1621 ctctatggc cctcccctg tctgatac gactggtg ctggaccac gcctactg 1681 ggacctgca ctcccagat ctgcaagca gacattgt ttagtgcat tctcagac 1741 cgtgtgaga tcttctt caagatcgg tttattggc ggacagtac accactgac 1801 aagcccacg gtccctgt ggtggcaca ttctggctg agtcccga aaagattat 1861 gccgtgtac agggccaca ggaagaga gctgttct tcgaggga tgagtactg 1921 gtctattct ccagcactt ggaaagaga taccacaag cactgaccg cctgggtta 1981 cccctgatg tccagcaag agacgtgccc ttaactgga gtaagaaca gaagacafac 2041 atctttctg gggacaagt ctggagatac aatgaagta agaagaaat ggaccggg 2101 tcccgaagc tcatgcaga ctctggaat gccatcctg ataactgga tgcagtgtg 2161 gactcagag gtgtgtgca cagctattc tcaagggt ctattacct gaagtggag 2221 aaccaagtc tgaagatgt gaagttgga agcatcaat cggactgct gggctgtga 2281 gctggcctg ttctgaggg ccgtacaat tcaactgac accggccca ggacctggg 2341 gaaggactg aagggcctg gttaccctg ctctgctct gtgttaac agccttcc</p>

	<p>2401 ttaccttggg gatttcagat ttaagagggt ggctctttt ttgtcccaa agaaagggtc 2461 tgacctgata cctccagggt gctactttt cccgccacc caaggggatg cttggatatt 2521 cacatgcag cctcctttg ggctgccctg gtgctccaca ctcagggtc tccagatga 2581 atgatcttt gtgggttaca gcactcag agtcaacaga gactgttta ggagggcact 2641 ggtggctcaa cagcctggca cagggcagtg ggatacagggt gtgccaaggt ggaaaccaga 2701 gacatctggt gtctccctta cggctgccct ggcacttta ctacttagc tgtttgcttt 2761 gtttgcctt tgetgtttg ttcaacctt tcagtttcc accacactgc atttttca 2821 ccgaaggact cgggtgtcg gacatcactg cacgatgat ctggcctggc ctatggatgg 2881 ctccctct cactttgtt agaagcaact ccagtcactt cctccactgg ttgaggaga 2941 accaagtcac cggcttctg ctacgcttc ttgctctcc cttaacagt tccccatgg 3001 aaatggcaaa aagtataaat aaaggcacc tttgagtggc aaaaaaaaaaaa aaa</p>
<p>Matrix Metalloproteinase 8</p>	<p>1 atgcttacc tgaagacact tccatttctg ttcttctcc acacacagct tgccacagcc 61 ctccagtgcc ctccagaaca cctggaagag aaaaatatga aaactctga gaattaccta 121 cgaatattct accacttacc aagcaatcag ttccgctcg caaggaatgc cactatgatt 181 gccgagaagc ttaaggagat gcagcgttc ttccgcttg ccgagacagg gaagccagat 241 gcagctaca tagagataat ggaaaagcct cgtgtggag tgcggactc tggatattc 301 ttgtaactc cgggaagccc caagtggaca cacactaac tgacctacag gattataaac 361 catacccc agatgtcaa ggctgaagtg aaaacagaaa tcgagaaagc ttttaaatc 421 tggagtgtc catcaacct gaccttact gagaccttag agggagaagc agacatcac 481 attgtttct tctcaagaga ccatggtgac aatttccat ttgatggacc caatggaatc 541 ctgcccagc ctttcaacc agcgggggtt attggaggag atgcacattf tgattcagaa 601 gaaactgga ctaagactc caagaattac aacctgttc tctggctgc tcatgaatt 661 ggacattct tgggactctc tcaactcact gatcctggtg ccttgatga cccaaactat 721 gcttacagag aaccagcac ctattacta cctcaagatg atacaatgg aattcagaca 781 atctatggac cttcagaca cctgtccaa cctactggac ccagcagcc cacagcctgt 841 gacccccac tgagattga tgetgccc acactccgtg gggagattta cttctttaa 901 gacaagtact tctggagagc gcatccccag ctgagaacag ttgacctaa tttcatct 961 ctgttctgc ccttctacc taatgttct caggctgctt atgaagactt tgatagagac 1021 ctagtcttct tattaaagg cagacagtac tgggctctaa gtgctatga cttgcagaa 1081 ggttaccaca gagatatac caactatga ttcccaagga gtgtccaagc cattgatga 1141 gctgttctc ataaggga gacatactc ttctaaaca accaatgctg gagatacagc 1201 aatcaagaa gatccatgga tccaggttac cccactagca tagcaagcgt gttccagga 1261 ataaactgta gaattgatg agtttccag caggattct tcttctct ctcagtga 1321 ccacaatatt ttgcaftaa tttgtcagt cgcagagtca ctagattgc aagaagcaat 1381 ttatgctta actgtcata g</p>
<p>Chemokin (C-X-C motif) ligand 1</p>	<p>1 cctaaaccag ctccagcact ccagactcca gccacactcc aacagagcac catggtctca 61 gccaccgct cgcttctctg tgcagcgtg cctgtgctgg ccaccagccg ccaagccaca 121 ggggcccggc tcgccaatga gctgcgctgt cagtgctgc agacagtggc agggattcac 181 tcaagaaca tccagagttt gaaggtgatg ccgcccaggac cccactgcac ccaaaccgaa 241 tcatagcca cactcaagaa tggctgcgag gcttgccttg accctgaagc ccccatggt 301 cagaagattg tcaaaaagat gctaaagggt gtcccaagt aatggagaaa gaagatagat 361 tgcaccgatg gcgtctgtct ggtgaacgct ggcttctgac aactactgtt ttacacatt 421 tacgatttct attgagggtc ctatttatt tatgtatga tttattccac caagtgtgtg 481 gttttattt tacattaata tttaacgatg tggatgcgtt tcatgatgg tcttcaatt 541 ccaattgtc agtttaaga tggtagcgt taaatatctc gttaaattaa tattattgg 601 gagaccatta ggtgtcaacc actgtctag aaggtgttga gcgggaagaa gggcggagag 661 atgagagtct gggatcgtgt tttgttag ggtgaggaat gtgtgagagg ctatgttga 721 tgtttgaaa gaatgtatt tattgaaagt tcttctcat atttatggt caacattgat 781 gtgtgaaag ttccttga cattttatgt ctagtgtga gggcacaatg ccttttata 841 tcttaacca atgtctctc tctctcagg acagagaagt tcaaggact gttacaatg 901 aaataaaat aaaagtitta taaaaaat</p>

<p>Chemokin (C-X-C motif) ligand 2</p>	<p>1 actgcaccte tgggecteca gcaagctccc tectgtgctc aagactcaa ccaacttttg 61 gtccagagcc atggcccctc cactctgcca gctctcaat gctgtactgg tctgtctct 121 cctgctggcc accaaccatc aggggtacagg ggttgtgtg gccagtgagc tgcgctgtca 181 atgcctgagc accctaccaa ggggtgactt caagaacatc cagagcttga cggtgaccce 241 tccaggacc cactgcgcc agacagaagt catagccact ctaaggatg gtcataaagt 301 ttgtctcaac cctgaagccc ccttgggtca gaggatcgtc caaaagatac tgaacaaagg 361 caaggctaac tgacctgga aggaagaaca tgggctcctg tacctcaacg ggcagaatca 421 aagagaaaag aaacaaactg caccaggaa gcctggatcg tacctgatgt gcctcgtgt 481 ctgagtttat ctatttatt atatatgtat ttatttatt atttcagtg cctagatgt 541 gttacattta ctatgatatt taaagatatg cattggccag ctcactgtag tatcttaaga 601 ggtcatttta atagtggaa gtttattgta ataatgttca atgtgttcag tcagcattat 661 tttactatg tagttggaag gtagtcatt tttaaacta tattattac ttctggggg 721 gggaggggga gttgggtact gactacacca cctccacct gtagatagaga ttggggatga 781 ggggggtggg ggggcaaca gacgcagta gagggcttc aaggcaggac tgcctcgtg 841 cacgtcatt tctgtaagc ccgagaagg cgggacgact gttattctg tctcctgtt 901 tctacactat ggtacaaca ttctgatcg tgaatgttca acaatcgtaa tctgaatc 961 ccctggacat tctatgctt ctctgtaagg cacagtgcct cgttagcaa ttgtttgtc 1021 atgctttc atgtctgaa gttgggacat ttatttatt atgtacttt acaataaca 1081 aaaaaataa aaattttac t</p>
<p>Chemokin (C-C-motif) ligand 2</p>	<p>1 gcagagacac agacagaggc cagcccagaa accagccaac tctactgaa gccagatctc 61 tctctctcca ccaatgca ggtctctg acgttctgg gcctgtgtt cacagtgtc 121 gcctgtagca tccactgtct gctcagcca gatgcagta atgcccact cacctgtcgc 181 tactattca ctggcaagat gatcccaatg agtcggctgg agaactaca gagaatcacc 241 agcagcagg gtcccaaga agctgtagta ttgtacca agctcaagag agagatctgt 301 gctgaccca ataaggatg ggtccagaag tacattagaa aactggacca gaaccaagt 361 agatcagaaa ctacagtct ctataaaat gcatcaacc taaggacttc agcactttg 421 aatgtgaact tgaccata atctgaagct aatgcatcca ctctctttc cacaaccacc 481 tcaagcactt ctgtagaagt gaccagtatg acagagaact agtgtgattt ggaatgtgat 541 gccttaagta atgttaact tatttaact atgtatata cactattccc ttccatgat 601 actagaaatc cttaaatgca agatgtatg ccaattttt atttctgtg gaactctgt 661 tcaacactt caatgtatga gagatgaatg ggtaaacctt ggtttgaga gtccaaggta 721 ttgttataa tattattatg gatattccta attattaaa gaaatattt atttttgac</p>
<p>Chemokin (C-C motif) ligand 20</p>	<p>1 agcagggc ac tgggtacca gcaactgca gatcaatcc tggagctgag aatggcctgc 61 aagcatctgc ccttctggc ttggcgggg gtagctgtgg ctactctctg cagcagtc 121 gaagcagcaa gcaacttga ctgtgcctc acgtacacaa agaactgtga tcatcatcg 181 agaaatttg tgggtttac aacacagatg gcgacgaag ctgtgacat taatgctatc 241 atctttacc tgaagtcgaa aagatccgtg tgcgctgacc caaagcagat ctgggtgaaa 301 aggatitgg acctctcag cctaagaacc aagaagatg aaaaacggat gcttttctg 361 gatggaatg gacacagccc aaggaggaaa tgatcacagc tggggttgga gttttcacct 421 gcaatcact gcacagacct gattgtgtc ccagtgtct tctccaatgg atgaagtga 481 ttcatattg atcatagtgt gtcataatg agctcattt agagttaagt tttatttgg 541 gttattata gatccgaat ttctatgtt agctattaa ttttaattc ccacaatca 601 tgaagggcgc ttgtaaaag gttcaatatt atgttaagg cagtaagttt atatggcct 661 tcttggaaac aataagctat ttttaaaata ttaattgtt tctgtgtct taattgttc 721 ttaattgat acgatttact tataaaacag aaaggaatta taagaatata ttgaaaaaa 781 aaaaaatgaa aggcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa</p>
<p>Chemokine (C-CX motif) ligand 10, IP-10</p>	<p>1 cctcggctga gctgcatcc aatccaact acatccggag cccagctaca ttgagccca 61 gccacatccc gagccaact tccagaagca ccatgaacct aagtgtctgt gctgttctct 121 gcctctgtct gctgagctg agtgggactc aaggatccc tctcgaaga acggtgctgt 181 gcactgcat cgaacttcat gaacagacgc tgagaccag ggccatagga aaactgaaa 241 tcaatctgc aagtctatcc tgcctcagc ttgagatcat tgccacaatg aagaagaaca 301 atgagaagag gttctgaaat ccggaatctg aggcacatca gagcttattg aaagcgggtga 361 gccaaagaag gtcaaaaaga gctccgtaac tagagagaag ccaactgcca cagtctgag 421 accgatggac agcagagaga cgtctctcc acctcccttt acccagtggt cggtatgtc 481 taactgtccc ttttctct gaccatggtc ccatcagctg gtactcccac tacagctga 541 tggacaaggc ctggtcctga gacaaaagt actccagcag caaggctcc caatttcta 601 agagctggtc cgaatctcc ctcaggcagc tatgacggtc ctctagctc ttttccgtaa 661 gctatgtgca ggtactaatc tctcagcat gtcctatgcc ccagcctgct ccacacacc 721 tcttctccc tagctctaa gctcatcagt ctgagttcac ctgagctct ttatttcaa 781 tgcagtcagc gtgagatgac aaatcaagt tctcagaaca aacttaccac cacttccca 841 aggaatttc ataactcaga atactcacag gaacctagac atgcatgttt aaatattat 901 taatgaccga ctgtacaag tggactcct agatgtatt ttgtacgat ttctattga 961 tatgtaagaa ctgtgtggt taagtatga tcaatgggta gttaaagtt acataggcaa 1021 atgctttgaa tctacatat tacaagatgt gttggatggt ttcaaaaaa aaatgtactg 1081 tattgaatgt agtatgagac aaaaagtaa taaagtata ataactgaca tga</p>

Interleukin-17A	<p> 1 catccacctc acacgaggca caagctcctc cegtaccagc tgatcaggac gagcgacat 61 gagtccccgg agaattccat ccatgtcctt gatgctgttg ctgctactga acctggaggc 121 tacagtgaag gcagcggtag tcatccctca aagttcagtg tgtccaaacg cggaggccaa 181 taactttctc cagaacgtga aggtcaacct gaaagtctct aactccctta gctcaaaaagc 241 gagtcccaaga aggccctcag actacctcaa cegtccact tcacctgga ctctgagccg 301 caatgaggac cctgatagat atccttctgt gatctgggag gcacagtgcc gccaccagcg 361 ctgtgtcaac gctgagggga agttggacca ccacatgaat tctgtttca tccagcaaga 421 gatcctggtc ctgaagaggg agcctgagaa gfgcccttc actttccggg tggagaagat 481 gctgggtggc gtgggctgca cctgcgttc ctctattgtc cgccatcgt cctaaacaga 541 gacctgaggc tagccctaa gaaacccctg cgtttctctg caaactcct tgtctttta 601 aaacagtca cagttgaatc tcagcaagtg atatggattt aaaggcgggg ttagaattgt 661 ctgcctcca ccctgaaaag aagcgcaga ggggatacaa atgtcttctt gttttctgt 721 gggctttaa ttattatgt attactcta tcccagata actttgaggc ataagtatt 781 ttaatgaatt atctacatta ttattatgt tctaatgca gaagacaaaa tcaagacta 841 agaaatttta ttattaaaa ggtaaaacct atattatat gagctattta tgggtctatt 901 tattttctt aagtgctaag atcatgatta tcagatctac ctaaggagt cctaaataat 961 attaaatatt aattgaaatt tcagtttac tattgctta tttaaggctt cctcctctga 1021 atggtgtgaa agtcaaacct cgttttatgt ttttaatta ttgaggcttc gaaaaattgg 1081 gcaatttagc ttctactgt gtgttataaa acctgtaac aatatacta taataaattt 1141 ttgg </p>
-----------------	--

8.2 Publikationslizenzen



49 Spadina Ave. Suite 200
Toronto ON M5V 2J1 Canada
www.biorender.com

Confirmation of Publication and Licensing Rights

September 24th, 2023
Science Suite Inc.

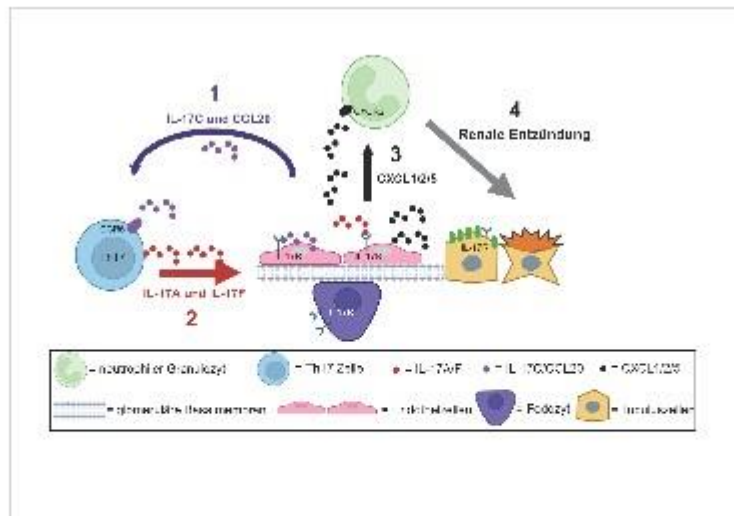
Subscription: Institution
Agreement number: VE25W4D6MW
Journal name: Blockade des IL-17 Pathways in einem Rattenmodell zur ANCA-assozierten Vaskulitis

To whom this may concern,

This document is to confirm that Erika Boschmann has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

September 24th, 2023
Science Suite Inc.

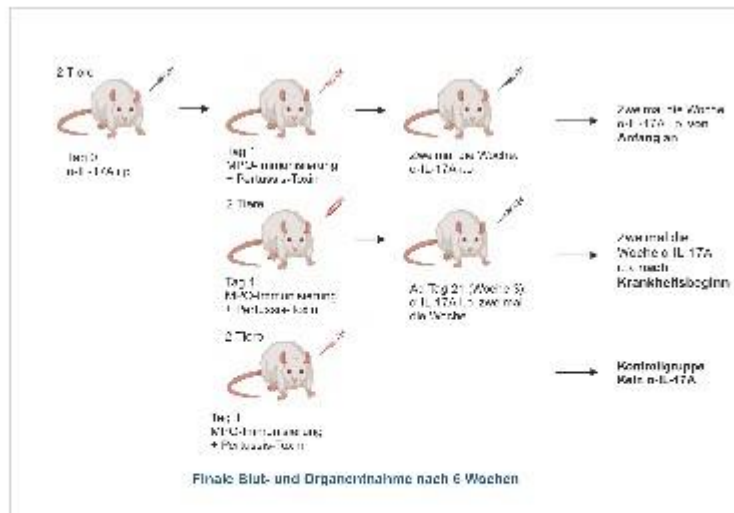
Subscription: Institution
Agreement number: AE25W4D1SX
Journal name: Blockade des IL-17 Pathways in einem Rattenmodell zur ANCA-assoziierten Vaskulitis

To whom this may concern,

This document is to confirm that Erika Boschmann has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

September 24th, 2023
Science Suite Inc.

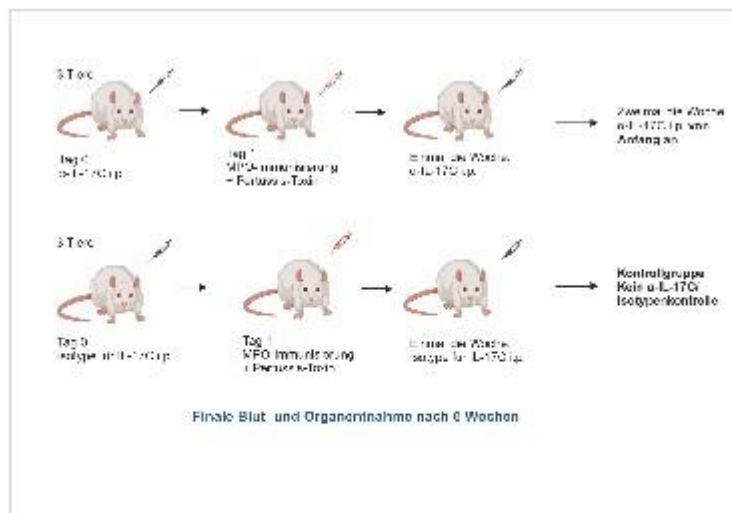
Subscription: Institution
Agreement number: OX25W4D04F
Journal name: Blockade des IL-17 Pathways in einem Rattenmodell zur ANCA-assoziierten Vaskulitis

To whom this may concern,

This document is to confirm that Erika Boschmann has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

September 24th, 2023
 Science Suite Inc.

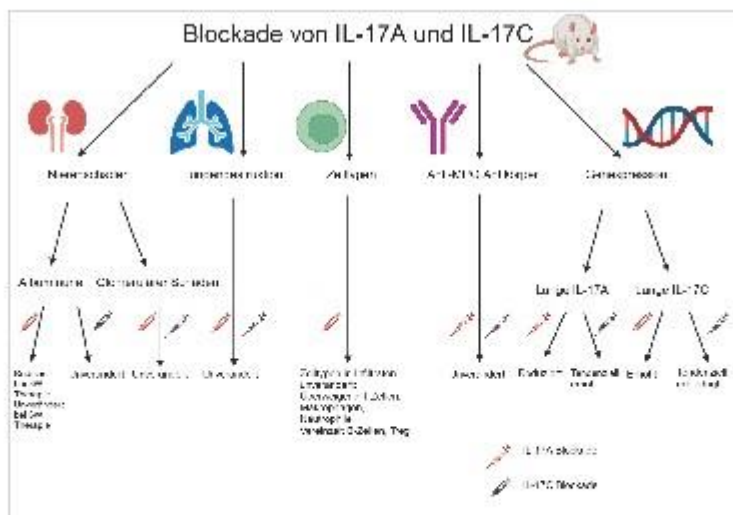
Subscription: Institution
Agreement number: WJ25W4D3T5
Journal name: Blockade des IL-17 Pathways in einem Rattenmodell zur ANCA-assoziierten Vaskulitis

To whom this may concern,

This document is to confirm that Erika Boschmann has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

9. Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Benjamin Wilde für die Möglichkeit der Dissertation bedanken. In den Jahren der experimentellen Tätigkeit und auch beim Verfassen der Dissertationsschrift habe ich mich stets außerordentlich gut betreut gefühlt. Dank seiner Anleitung, sowie außerordentlichen Geduld und seinem Engagement war es mir möglich diese Arbeit abzuschließen.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Kribben danken für die Möglichkeit meine Promotion in der Abteilung für Nephrologie am Universitätsklinikum Essen verfassen zu dürfen.

Außerdem gilt mein Dank dem Essener Ausbildungsprogramm „Labor und Wissenschaft“ für den ärztlichen Nachwuchs (ELAN), welcher durch die Else Kröner Fresenius Stiftung gefördert wurde, für die Unterstützung meiner Promotion.

Den Mitarbeitern des experimentellen Labors am Universitätsklinikum, dabei vor allem Tanja, Barbara, Simone und Anette, möchte ich herzlich danken für die ausgezeichnete Einweisung in das experimentelle Arbeiten und die Zusammenarbeit im Labor. Dabei habe ich Tanjas Unterstützung immer sehr geschätzt und ohne sie wäre dieses Projekt so nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei Bastian Tebbe bedanken für das Scannen der Lungenschnitte.

Ein Dankeschön geht auch an Alexandra Haase und Jil Karutz.

Meiner Mutter möchte ich für den Beistand während meiner Promotion danken.

10. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten