

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms
bei Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritiden

von Kirstin Andersen

aus München

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für tiermedizinische Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ-Prof. Dr. Thomas Göbel

Angefertigt am

Universitäts-Klinikum der der Ludwig-Maximilians-Universität München

Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Nephrologisches Zentrum
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Mentor: PD Dr. V. Vielhauer

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke
Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller
Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess
Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Teilergebnisse dieser Promotionsarbeit wurden bereits in Abstract-Form veröffentlicht.

1. **K. Andersen**, N. Eltrich, V. Vielhauer. Differential roles of the inflammasome components NLRP3 and ASC in murine immune complex glomerulonephritis. *Abstract-Band*, 2011.
(23th European Renal Cell Study Group Meetin, Desenzano, Italien 24.03.-27.03.2011, Vortrag)
2. **K. Andersen**, N. Eltrich, V. Vielhauer. Bedeutung der Inflammasomkomponenten NLRP3 und ASC bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. *Internist*, 52:Suppl. 1:143, 2011.
(117. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin Wiesbaden 30.04.-03.05.2011, Poster PS 324)
3. **K. Andersen**, N. Eltrich, V. Vielhauer. Differential roles of the inflammasome components NLRP3 and ASC in murine immune complex glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant Plus*, 4:Suppl. 2, 2011.
(XLVIII Congress, European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association ERA-EDTA, Prag 23.06-26.06.2011, Freier Vortrag SaO 0007)
4. **K. Andersen**, N. Eltrich, V. Vielhauer. Deficiency of the inflammasome component Nlrp3, but not Asc ameliorates murine immune complex glomerulonephritis. *Mitteilungen Dtsch Ges Nephrol*, 3:25, 2011.
(3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin 10.09.-13.09.2011, Freier Vortrag FV 10)
5. **K. Andersen**, N. Eltrich, V. Vielhauer. Proinflammatory role of the inflammasome component Nlrp3, but not Asc in murine immune-complex-mediated Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 22:381A, 2011.
(44th Annual Meeting, American Society of Nephrology, Philadelphia 08.11-13.11.2011, Poster FR-PO 1158)

Überall geht ein früheres Ahnen dem späteren Wissen voraus

Alexander von Humboldt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Literatur	17
2.1	Interleukin–1	17
2.2	Inflammasomkomponenten	20
2.3	High-Mobility-Group-Box–1 Protein	24
2.4	Nephrotoxische Serum–Nephritis	25
2.5	Arbeitshypothese	28
3	Publikation	30
4	Diskussion	46
5	Zusammenfassung	54
6	Summary	56
7	Abkürzungen / Abbildungen	57
	Literaturverzeichnis	62
	Danksagung	74

1 Einleitung

Die Nieren sind ein komplexes Organsystem, makroskopisch lassen sich bereits Rinden- und Markbezirke erkennen. Detaillierter betrachtet enthält die Rinde, der sogenannte Cortex, die Filtrationseinheiten der Niere in Form der Glomeruli. Die Struktur der Glomeruli umfasst einen Gefäßpol, in der die zu- und abführenden Arteriolen ein- beziehungsweise austreten. Die Arteriolen bilden ein Kapillarknäuel, das von einer Kavität, der Bowmanschen-Kapsel umgeben ist. Die "Mündung" der Bowman-Kapsel in die Tubuli wird als Harnpol des Glomerulums bezeichnet. Die Bowman-Kapsel setzt sich aus einem parietalen und einem viszeralem Blatt zusammen. Das parietale Blatt wird durch ein einschichtiges Plattenepithel gebildet, Podozyten bilden das viszerale Blatt und umgeben die Kapillaren. Das fenestrierte Epithel der Kapillarschlingen dient zusammen mit den Podozyten und der glomerulären Basalmembran als Filter, über den der Primärharn in Richtung Tubuli frei filtriert wird. Jedoch gilt dies nur für Moleküle, die weniger als 10 kDa groß sind. In den Tubuli wird der Primärharn durch die Passage verschiedener tubulärer Abschnitte sowohl konzentriert, als auch in seiner Zusammensetzung verändert. So sind die Nieren dafür verantwortlich, Stoffwechselprodukte, Wasser sowie exogene Substanzen aus dem Blutstrom zu entfernen und die Balance des Elektrolyt-Haushaltes in physiologischen Bereichen zu halten. Auf Grund dessen haben die Nieren großen Einfluss auf die Regulation des osmotischen Drucks und auf das Aufrechterhalten der idealen Verhältnisse der verschiedenen Mineralstoffe. Die Tubuli der Niere dienen nicht nur der Resorption, Sekretion und Konzentrierung des Primärharns, sondern produzieren unter anderem Erythropoetin, welches die Entwicklung der roten Blutzellen steuert und Meta-

1 Einleitung

boliten des oxidativen Stresses unschädlich macht. Die verschiedenen Funktionen zeigen, dass die Nieren der Säugetiere Organe sind, ohne die ein Überleben nur zeitlich begrenzt möglich wäre.

Wenn Schädigungen innerhalb der Nieren auftreten, können diese durch die Fähigkeit der Nieren sich teilweise selbst zu regenerieren behoben werden, allerdings ist dieser Reparatursmechanismus eingeschränkt. So zeigen nur einzelne Tubulusabschnitte regenerative Proliferation solange die Basalmembran intakt ist. Diese Fähigkeit nimmt zudem mit steigendem Alter ab [60]. Im Gegensatz dazu hat das Glomerulum kaum eine Möglichkeit sich zu regenerieren. Inzwischen gibt es allerdings Untersuchungen, dass eine mögliche Regeneration der Glomerula durch sogenannte renale Progenitorzellen (Vorläuferzellen) möglich ist. Dieser Prozess ist dabei aber stark abhängig von der Schwere der vorliegenden glomerulären Schädigung [67].

Verschiedenste Gründe wie zum Beispiel Kreislaufstörungen, nicht entzündliche Veränderungen im lokalen Metabolismus der Niere, oder Entzündungen, die steril oder pathogeninduziert sein können, können zu chronischen Nierenerkrankungen führen. Glomeruli und/oder Tubuli sind dabei die am häufigsten betroffenen Strukturen in der Niere. Bezüglich des Glomerulums gilt: Sobald der glomeruläre Schaden ausgelöst ist, tragen weitere Prozesse zur Progression bei. Beispielhaft können hierfür stehen: Erstens die Aktivierung des Komplementsystems, der Gerinnung und der nierenansässigen Immunzellen, zweitens die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten aus der Blutbahn, drittens der Anstieg von proteolytischen Enzymen, viertens die Synthese von Zytokinen und Chemokinen sowie fünftens die Veränderung von hämodynamischen Gegebenheiten.

Vor diesem Hintergrund ist das Erkennen und die Behandlung von Vorgängen, die zu einer renalen Dysfunktion führen elementar, damit Patienten davor bewahrt werden können eine Nierenschädigung zu erleiden, die zu einer akuten oder chronischen Insuffizienz der Organfunktion führen kann. Für die Einteilung der chronischen Nierenerkrankung wurde

1 Einleitung

im Jahr 1997 von der National Kidney Foundation (NKF) ein System entwickelt, welches auf der Beurteilung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) basiert. Der Terminus chronische renale Fehlfunktion bezieht sich dabei auf den Prozess der signifikant progressiven und irreversiblen Reduktion der Anzahl der Nephrone (Gesamtheit der in einer Niere vorliegenden Glomeruli mit ihren nachgeschalteten Tubuli). In der Veterinärmedizin erfolgt die Beurteilung und Einteilung von renalen Fehlfunktionen ebenfalls mittels der GFR. Die International Renal Interest Society (IRIS) hat dafür Beurteilungskriterien verfasst, die zusätzlich zur GFR die Serum-Kreatininwerte berücksichtigt. Chronische Nierenerkrankungen gehen mit einem Spektrum verschiedener pathophysiologischer Veränderungen einher und führen immer zu einer progressiven Verschlechterung der GFR.

Entzündliche Prozesse können in allen Organsystemen auftreten und stellen den Beginn von akuten und chronischen Erkrankungen dar, die bis zu einer irreversiblen Schädigung einzelner Organe oder sogar des gesamten Organismus führen können. Initial liegt immer eine inflammatorische Gefäßreaktion vor, bei der es zu einer primären vaskulären Weitstellung und Permeabilitätserhöhung des Endothels der Gefäße kommt. Jede Entzündungsreaktion ist zudem gekennzeichnet durch leukozytäre Zellinfiltration aus der Blutbahn in das umliegende Gewebe. Primär kommt es zum Übertritt von neutrophilen Granulozyten, diesen folgt eine Einwanderung von mononukleären phagozytierenden Zellen. Diese Zellmigration wird durch Komplement (Faktor C3a und C5a), Kinine (Faktor XII (Kallikrein) und Bradikinin), proinflammatorische Mediatoren (u. a. Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrose Faktor- α (TNF- α)), aber auch durch weitere Zytokine und Chemokine mediert. Findet ein Übergang in ein chronisches Geschehen statt, haben diese Mediatoren weiterhin proinflammatorische Funktionen. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems, das Zellinfiltrat ist dann reich an Lymphozyten. Die Aktivierung von B-Zellen mündet in die Antikörperbildung durch Plasmazellen. Immunglobulin-M (IgM) wird hierbei auf einen Reiz hin gebildet, der dem Körper das erste Mal "präsentiert" wird und erst zeitlich versetzt erfolgt eine Immunglobulin-G

1 Einleitung

(IgG) Ausschüttung. Residente, d. h. ständig im Organ ansässige, phagozytierende Gewebemakrophagen (Histiozyten) sind unter anderem residente dendritische Zellen (rDCs) im interstitiellen Gewebe von Organen. Sie werden den Antigen präsentierenden Zellen (APC) zugeschrieben und haben, im Gegensatz zu eingewanderten Zellen, eine deutlich verlängerte Überlebenszeit von Monaten bis Jahren. Residente DCs sind sowohl Mediatoren der angeborenen Immunität als auch der erworbenen, adaptiven Immunität. Durch ihre verschiedenen Oberflächenrezeptoren, wie zum Beispiel Toll-like Rezeptoren (TLRs), Rezeptoren für Alarmine, Komplement, Zytokine und Fc-Anteile von Immunglobulinen, können sie nach entsprechendem Ligandenkontakt proinflammatorische Zytokine (TNF- α , Typ 1 Interferon (IFN), IL1- β , IL-2, IL-6 u. a.) freisetzen. Diese stimulieren wiederum organspezifische Parenchymzellen und Zellen die dem erworbenen Immunsystem zugeschrieben werden. Unter anderem aktivieren rDCs, nach Migration in die regionalen Lymphknoten, durch ihre Zytokinausschüttung T-Helferzellen, die den initialen Schritt für die Antikörperbildung darstellen [31]. Je nach Art und Menge der einzelnen Zytokine werden verschiedene Subklassen von T-Helferzellen gebildet. Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass auf einen wie auch immer gearteten Antigenreiz eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems erfolgt und die erworbene Immunität sekundär aktiviert wird. Die Immunreaktion bleibt bestehen, wenn die Antigeneradikation nicht adäquat erfolgen konnte, oder ein anhaltender Insult wie zum Beispiel eine Ischämie vorliegt. Entzündungen können sowohl pathogeninduziert als auch steril induziert sein. In beiden Fällen können sämtliche Strukturen innerhalb eines Organs betroffen sein. Für die Nieren sind dies im Speziellen, das Interstitium, die Tubuli und Glomeruli mit ihren Kapillarschlingen sowie der Basalmembran, den Podozyten und Mesangialzellen. Die Infiltration von mononukleären phagozytierenden Zellen stellt eine zentrale Komponente bei inflammatorischen Nierenschädigungen dar [20, 32, 44, 48, 59, 61, 70].

Die meisten "idiopathischen" Glomerulonephritiden (GN) sind antikörpervermittelt, chronische Formen können mit einem nephrotischen Syndrom assoziiert sein. Das ne-

1 Einleitung

phrotische Syndrom ist definiert durch einen Proteinverlust über den Harn ($\geq 3,5$ g/24h), Ödeme (durch den verminderten onkotischen Druck und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems), einer Hypoproteinämie sowie einer Hyperlipoproteinämie (durch erhöhte hepatische Synthese). Durch die funktionelle und anatomische spezifische Rolle der Nieren treten Veränderungen durch immunpathologische Prozesse häufiger auf als in jedem anderen Organ. Begünstigt wird dieser Aspekt durch erstens, die starke Durchblutung des Organs. Dadurch werden vorhandene Antikörper beziehungsweise Antikörperkomplexe vermehrt in die Nieren "eingeschwemmt". Zweitens das fenestrierte Endothel des arteriellen Kapillarnetzes der Glomerula, das einen Teil der Filtrationsbarriere darstellt und bei inflammatorischer Schädigung vermehrt durchlässig wird. Drittens der Querschnitt der Arteriolen des glomerulären Kapillarknäuels, das der Endstrombahn zugerechnet wird, begünstigt die Migration von Zellen während entzündlicher Prozesse. Der lokale Abfall der Durchflussgeschwindigkeit führt einerseits zu einer erleichterten Migration von Zellen und andererseits zu einer erleichterten Bindung und Ablagerung von Antikörpern und Antikörperkomplexen. Alle genannten Aspekte sind bereits seit den frühen fünfziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts bekannt [33]. Die Pathogenese der progressive Antikörper-vermittelte GN ist unter anderem bedingt durch Antikörper, die als Reaktion auf eine Infektion durch den Organismus gebildet werden (im human-medizinischen Bereich zum Beispiel HIV, Hepatitis-B oder Hepatitis-C sowie verschiedene bakterielle Erkrankungen). Im Rahmen der immunologischen Reaktion des Organismus auf die Infektion erfolgt eine Antikörperbildung. Die Antikörper führen dabei zu Schäden durch ihre Ablagerung beziehungsweise durch Formation sogenannter Antikörperkomplexe, beides führt zu einer erneuten Aktivierung des Komplementsystems sowie der zellulären und humoralen Immunantwort. IgG- und IgM-haltige Antikörperkomplexe sind dabei typische Immunglobuline, die zu einer Aktivierung der klassischen Komplementkaskade führen. Progressive Formen der Immunkomplex-vermittelten GN sind charakterisiert durch Infiltration von mononukleären phagozytierenden Leukozyten in die Glomeruli, glomeruläre Zellproliferation, Matrixdeposition sowie eventuel-

1 Einleitung

ler Halbmondbildung und in Einzelfällen einer Glomerulosklerose. Eine mindestens drei Schichten umfassende Proliferation des parietalen Blattes der Bowman-Kapsel wurde dabei als Definition einer glomerulären Halbmondbildung festgelegt.

Auch bei Katzen und Hunden stellen chronische Nierenerkrankungen die häufigste Form renaler Schädigung dar. Im veterinärmedizinischen Bereich überleben Patienten mit chronischer Nierenerkrankung mit relativ guter Lebensqualität Monate bis Jahre, allerdings mit progressiver Verschlechterung des Allgemeinzustandes. Allgemein betrachtet ist die GN eine Erkrankung, die alle Spezies der Haustiere betrifft. In den meisten Fällen hat die GN bei Tieren idiopathischen Ursprung oder ist als Teil einer schwerwiegenden systemischen Erkrankung zu sehen [80]. Immunkomplex-vermittelte progressive GN treten in Verbindung mit verschiedenen Krankheiten auf, wie zum Beispiel equiner infektiöser Anämie; canider Pyometra oder Dirofilariose; Infektion mit feline Leukämie Virus (FeLV), feline infektiöse Peritonitis (FIP) und feline progressiver Arthritis; bovine Virus Diarrhö (BVD) und bovine afrikanische Trypanosomiasis; porcine Dermatitis Nephropathie Syndrom (PDNS) und porcine chronische europäische sowie afrikanische Schweinepest. Hunde und Katzen sind häufiger von GN betroffen als Wiederkäuer oder Pferde. Obwohl die Nieren von Schweinen häufig von einer GN betroffen sind, wird diese meistens erst bei postmortalen Untersuchungen auf Grund anderer Fragestellungen festgestellt. Die Examinierungen finden meist statt, bevor es zu klinisch sichtbaren Symptomen bedingt durch die GN, kommt. Glomerulonephritiden die durch Antikörper vermittelt sind, die direkt gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM) gerichtet sind, werden unter dem Begriff anti-GBM-GN zusammengefasst. Sie finden sich nur bei Hunden und Equiden, die Gründe hierfür sind unklar [10]. Die Gruppe der durch Immunkomplexe vermittelten GN stellt neben der chronischen tubulointerstitiellen Nephritis die häufigste renale Erkrankung bei Katzen und Hunden dar [10]. Bis jetzt existiert kaum eine Behandlung, die die progressiven Schädigungen innerhalb der Niere beheben kann. Klinische und biochemische Veränderungen werden im Kleintierbereich häufig durch unterstützende symptoma-

1 Einleitung

tische Therapie gemildert [16]. Nichts desto trotz wäre es für die Zukunft erstrebenswert, Behandlungsmethoden zu entwickeln, die den selbst perpetuierenden Prozessen der chronischen Nierenerkrankungen entgegenwirken.

Wie oben bereits erwähnt werden Nierenerkrankungen mit entzündlicher Ätiologie von Zytokinexpression und Zellinfiltration geprägt, die auch eine zentrale Rolle in der Pathogenese der progressiven immunmedierten GN darstellen. Man unterscheidet zwischen angeborener und erworbener (adaptiver) Immunität. Die angeborene Immunität stellt ein System der primären Immunantwort dar, deren Komponenten im Genom verankert sind und entwicklungsbiologisch hoch konservierte Strukturen erkennen. Im Gegensatz dazu werden die Moleküle der adaptiven Immunität spezifisch an eine bestimmte Struktur angepasst. Die angeborene Immunität unterscheidet zwischen körpereigenen Molekülen, auf die keine Aktivierung erfolgt und "fremden" Molekülen, sogenannten Antigenen, die als solche erkannt werden und eine gezielt auf das Antigen abgestimmte Zelluläre Immunantwort und Antikörperbildung nach sich ziehen. In den vergangenen Jahren hat sich eine weitere Aktivierungsmöglichkeit für das Immunsystem heraus kristallisiert. Dem angeborenen Immunsystem ist es nicht nur möglich Pathogene, sogenannte Pathogen Associated Molecule Patterns (PAMPs) zu erkennen und darauf zu reagieren, sondern auch körpereigener Moleküle, sogenannte Danger Associated Molecule Patterns (DAMPs) können eine Reaktion hervorrufen. DAMPs können durch Gewebeschädigung, Zelluntergang oder Stress auftreten, beispielhaft sind hier Stickstoffmonoxid (NO), Zytokine, Chemokine oder das High-Mobility-Group-Box-1 Protein (HMGB-1) anzuführen [19, 72, 78]. DAMPs sind somit körpereigene Moleküle, die durch eine vorliegende Erkrankung verändert wurden, oder intrazelluläre Proteine, die nach Nekrose oder Nekroptose freigesetzt werden [7]. Auf Grund dessen sind DAMPs auch an steril bedingten Organschäden und -dysfunktionen beteiligt. Immunantworten, die durch Freisetzung von DAMPs hervorgerufen werden, gleichen denen, die durch PAMPs induziert werden. Der momentane Stand der nephrologischen Forschung lässt jedoch offen, wie diese Prozesse

1 Einleitung

innerhalb des Organs beziehungsweise der Zielzelle konkret ablaufen. Als zelluläre Rezeptoren, die sowohl PAMPs als auch DAMPs binden, fungieren Toll-like-Rezeptoren (TLRs), Retinoic-Acid-Induced-Gene-Like Rezeptoren (RIGs), sowie Nucleotide-Binding-Domain-Leucine-Rich-Repeat (NOD-like receptors / NLRs). Die Stimulierung dieser Rezeptoren führt zu einer Aktivierung des Nuclear-Factor- κ B (NF- κ B) [74], Interferon (IFN) regulatorischer Faktoren und mitogen-aktivierter Protein-Kinasen, die die Expression proinflammatorischer und Typ I IFN-Gene modulieren. Die oben genannten zellulären Rezeptoren werden als Pattern Recognition Receptors (PRRs) bezeichnet, sie sind genetisch kodiert und werden dem angeborenen Immunsystem zugerechnet. PRRs werden unter anderem von Zellen exprimiert, die ebenfalls dem angeborenen Immunsystem zugeschrieben werden, dazu zählen zum Beispiel Makrophagen, Monozyten, DCs, neutrophile polymorphkernige Granulozyten und Epithelzellen. Aber auch Zellen, die dem erworbenen Immunsystem zugerechnet werden, haben die Fähigkeit über PRRs auf DAMPs und PAMPs zu reagieren. PRRs, die der Gruppe der NLR zugeschrieben werden, können sogenannte Inflammasome bilden. Einige dieser Inflammasome sind befähigt, die Maturation proinflammatorischer Zytokine zu prozessieren und sie für die Sezernierung bereit zu stellen. Zwei klassische proinflammatorische Zytokine, die bei der Entstehung von renalen Erkrankungen eine tragende Rolle spielen, sind IL-1 und TNF- α , dies konnte sowohl experimentell als auch klinisch für die humane GN [4] nachgewiesen werden. Gleiches gilt auch für die renale Schädigung im Bereich des Tubulointerstitiums [29, 38, 79, 95]. Trotz der unterschiedlichen Struktur von IL-1 und TNF- α und der Bindung an unterschiedliche Rezeptoren, teilen sie viele biologische Funktionen. Dazu gehören zum Beispiel: Erstens, die induzierte Expression der Leukozyten-Adhäsionsmoleküle (unter anderem Intracellular Adhesion Molekule 1 (ICAM1) und Vascular Cell Adhesion Molekule 1 (VCAM1). Zweitens, die Induktion anderer Zytokine und Chemokine wie die Interleukine- (IL) 2, 6, 8 und Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP1/CCL2) und drittens die erhöhte Expression anderer inflammatorischer Faktoren wie der Inducible Nitric Oxide Synthetase (iNOS), Metalloproteinasen und Gewebefaktoren. Die Beteiligung von IL-1 und TNF- α

1 Einleitung

in der chronischen Phase der Immunkomplex–medierten progressiven GN wurde bereits nachgewiesen [86, 88, 89]. Es konnte in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass überwiegend Leukozyten an der Bereitstellung von IL–1 beteiligt sind und dass IL–1 β über den IL–1R1 auf intrinsischen Nierenzellen die TNF Expression sowie die Bildung von Halbmonden an den Glomeruli induziert.

Die Prozessierung und Sekretion der proinflammatorisch wirkenden Zytokine IL–1 β und IL–18 ist unter anderem abhängig von Inflammasomen. Inflammasome stellen intrazelluläre, zytoplasmatische Makromoleküle dar, deren Einzelkomponenten sich nach der Aktivierung von NLRs zusammenlagern und das IL–1 Converting Enzyme (Caspase–1) in seine aktive Form überführen. Aktivierte Caspase–1 hat über vierzig verschiedene Substrate, die es prozessieren kann [77]. Zu diesen zählen auch die “Pro-Formen” der proinflammatorischen Zytokine IL–1 β und IL–18. Die Bereitstellung von maturiertem, sezernierbarem IL–1 β und IL–18 beinhaltet zwei aufeinander folgende Schritte: Erstens die NF– κ B abhängige Induktion der mRNA Expression und Translation der “Pro-Formen” dieser Zytokine und zweitens eine sich daran anschließende intrazelluläre Spaltung der Prozytokine in ihre aktivierte Form und deren extrazelluläre Freisetzung. Der zweite Schritt dieser Kaskade ist direkt abhängig von Inflammasomen wie zum Beispiel dem NLRP3-Inflammasom [26, 53]. Für das NLRP3-Inflammasom, das nach der intrazellulären Aggregation mehrerer aktivierter NLRP3- und Asc-Moleküle sowie Caspase–1 entsteht, wurde bereits eine Beteiligung an verschiedensten Erkrankungen beschrieben [23, 56, 101]. C. A. Dinarello beispielsweise hat gezeigt, dass die Bereitstellung von IL–1 und IL–18 überwiegend in Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs) erfolgt [11, 12], gleiches gilt für NLRP3 [76, 55]. Laudisi et. al konnten in vitro eine IL–1 β –Aktivierung in phagozytierenden Makrophagen nachweisen die durch das NLRP3-Inflammasom vermittelt wird [45]. Makrophagen und DCs stellen auch während der chronischen Phase von Nierenerkrankungen neben Lymphozyten die am häufigsten vertretenen leukozytären Zelltypen dar. Aus diesem Grund liegt es nahe, das Inflammasome auch in renalen pa-

1 Einleitung

thogeninduzierten oder sterilen chronisch-entzündlichen Prozessen eine Rolle spielen, die in ihrer Ätiologie eine IL-1 β Beteiligung aufweisen.

2 Literatur

2.1 Interleukin-1

Mitglieder der IL-1-Familie spielen während Entzündungsreaktionen eine tragende Rolle. Der IL-1 Familie zugerechnete Interleukine sind verantwortlich für die Expression von Adhäsionsmolekülen auf mesenchymalen und endothelialen Zellen, welche die Infiltration von inflammatorischen Zellen und Immunzellen triggern [13]. Des weiteren haben sie Einfluss auf Fieber, Vasodilation, Hypotension und verstärken die Schmerzempfindlichkeit [11]. IL-1 α , IL-1 β und IL-1-Rezeptor-1-Antagonist (IL-1R1a) binden an den IL-1-Rezeptor-1 (IL-1R1), wobei die Bindung von IL-1R1a die Bindung von IL-1 α und IL-1 β blockiert [13]. Das Fehlen dieses Antagonisten führt zu lebensbedrohlichen autoimmunvermittelten entzündlichen Erkrankungen der Haut und Knochen. IL-1R1a liegt als Therapeutikum in Form von Anakinra vor und wird in der humanmedizinischen Therapie im Rahmen rheumatoider Erkrankungen und seltenen autoinflammatorischen Syndromen eingesetzt. Zur Zeit erfolgt in verschiedenen Studien eine Austestung der therapeutischen Wirksamkeit für renale Erkrankungen. Andere IL-1 Antagonisten liegen ebenfalls vor und werden im Bereich der IL-1 mediierten Krankheitsbildern erprobt, unter anderem bei Erkrankungen, an deren Genese sterile Entzündungen beteiligt sind, beispielsweise Gicht und Diabetes Typ 2. Als proinflammatorisches Zytokin ist besonders IL-1 β hervorzuheben, es ist ein „Schlüsselmediator“ bei Entzündungen und Infektionen. T- und B-Lymphozyten werden durch IL-1 β stimuliert, zudem ist es an der Aktivierung von Makrophagen und Natural-Killer (NK) Zellen beteiligt. IL-1 β induziert seine eigene

2 Literatur

Synthese sowie die Synthese anderer inflammatorischer Mediatoren wie TNF oder IL-6.

IL-1 β ist das am besten charakterisierte Interleukin der IL-1 Familie. Es wird von zahlreichen Zelltypen produziert und sezerniert, auch wenn sich die meisten Untersuchungen nur mit den Zellen die dem angeborenen Immunsystem zugeschrieben werden, befassen. Der überwiegende Anteil von aktivem IL-1 β wird von aktivierten Zellen der myeloiden Linie gebildet, zum Beispiel Makrophagen, Monozyten, DCs, Kupferschen-Sternzellen der Leber und neutrophilen Granulozyten [49]. IL-1 β wird als 31 kDa große Proform gebildet. Die Überführung von pro-IL-1 β , der nicht sezernierbaren zytoplasmatischen Form des Zytokins, in seine sezernierbare Form, wird durch Abspaltung einer Aminosäuresequenz gesteuert. Das Produkt ist das 17 kDa große, biologisch aktive, sezernierbare IL-1 β . Das erste Signal für die Bildung von IL-1 β stellen DAMPs und PAMPs dar. Mitglieder beider Gruppen aktivieren PRRs, zu denen auch die NLR-Familie zählt. PRRs sind unter anderem in und auf Makrophagen sowie DCs nachweisbar [50]. Die Bindung von DAMPs/PAMPs an PRRs induziert unter anderem die NF- κ B-abhängige Genexpression von pro IL-1 β [7, 40]. Dieses Priming ist jedoch nicht ausreichend, um eine „Konvertierungskaskade“ von pro-IL-1 β anzustoßen, es benötigt zusätzliche synergistische Faktoren (siehe 2.2 Inflammasomkomponenten). Die Konvertierung von pro IL-1 β wird neben anderen Molekülen durch die als Interleukin-Converting-Enzyme (ICE) fungierende Caspase-1 gesteuert [85]. Nach Caspase-1-vermittelter Abspaltung eines Peptids am aminoterminalen Ende des Proteins entsteht biologisch wirksames IL-1 β , welches von den produzierenden Zellen sezerniert wird und als proinflammatorischer Mediator wirkt. IL-1 β hat eine positive Rückkopplung bezüglich der Translation/Transkription von pro-IL-1 β . Diese proinflammatorischen Rückkopplung setzt die Bindung von IL-1 β an den IL-1R1 voraus, dies führt zu einer Aktivierung des Adaptermoleküls Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88 (MyD88). MyD88 aktiviert seinerseits NF- κ B, welches wiederum intranukleär die Transkription der entsprechenden IL-1 β Zielgene aktiviert.

2 Literatur

In verschiedenen Modellen für chronische tubulointerstitielle Nierenschäden liegen Untersuchungen vor, die eine pathophysiologische Rolle von Inflammasom-aktiviertem IL-1 β belegen. So konnten Vilaysane et. al. in einem Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) zeigen, dass es in Nlrp3-defizienten Mäusen zu einer Reduktion der Caspase-1-Aktivität und einer verringerten Reifung und Sekretion von IL-1 β sowie IL-18 kommt. Die Untersuchungen wurden auch in Knochenmark-Chimeren durchgeführt. Die Chimären hatten entweder eine Nlrp3-Defizienz ausschließlich in ihren Knochenmarkszellen oder umgekehrt Wildtyp-Knochenmarkszellen wurden Nlrp3-defizienten Mäusen injiziert, nachdem das Knochenmark des Empfängertieres durch Bestrahlung mit einer Cäsiumquelle abgeräumt worden war. Nlrp3-Defizienz führte in diesen Versuchen sowohl in hämatopoetischen als auch nicht-hämatopoetischen zellulären Kompartimenten zu einer herabgesetzten inflammatorischen Reaktion [95]. Ein weiteres Modell einer tubulointerstitiellen Nierenschädigung, hervorgerufen durch Kalziumoxalat, konnte darstellen, dass die Nephropathie durch die Depletion von DCs oder die Antagonisierung von IL-1 zu einer Verringerung der Nierenfunktionsstörung führte [63]. Zudem konnte in den von Mulay et al. durchgeführten Untersuchungen eine Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) abhängige Induktion des NLRP3-haltigen Inflammasoms nachgewiesen werden. Der Mechanismus der dafür zugrunde liegt ist folgender, extrazelluläres ATP stellt einen der Aktivierungsreize für das NLRP3-Inflammasom dar. Bei renalen Ischämie-Reperfusionsschäden (Ischemia Reperfusion Injury, IRI), die auch zu tubulointerstitiellen Schädigungen führen, wurde durch Shigeoka et. al. gezeigt, dass sowohl NLRP3 als auch sein Adaptermolekül Apoptosis-associated-Speck-like-protein Containing a CARD oder kurz ASC, in hohem Maß in renalen epithelialen Tubuluszellen exprimiert sind. Das Fehlen von NLRP3, aber nicht das von ASC, reduzierte die von der IRI hervorgerufene Nierenschädigung im Bereich des Tubulointerstitiums [79]. Für tubulointerstitielle Schädigungen die durch entzündliche Prozesse hervorgerufen sind, lässt sich somit eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms postulieren.

In einem Modell für eine Immunkomplex-vermittelte GN (heterologe Nephrotoxische

Serum Nephritis (NTN)) reduzierte eine Vorbehandlung von Ratten mit anti-IL-1 β -Antikörpern die Proteinurie und den Influx von neutrophilen Granulozyten in die Nieren der Tiere. Timoshanko et al. konnten ebenfalls in fortgeschrittenen Stadien der Immunkomplex-vermittelten GN bei Mäusen belegen, dass das Fehlen von IL-1 β zu einer Reduktion zellulärer Mediatoren führt und zusätzlich eine verminderte Bildung glomerulärer Halbmonde auftritt [86].

Für die Simulation einer progressiven Immunkomplex-vermittelten GN, bei der eine IL-1 β Induktion beschrieben ist steht das Modell der autologen NTN zur Verfügung. Die Hintergründe des NTN Modells sind unter 2.4 beschrieben.

2.2 Inflammasomkomponenten

Komponenten der Inflammasome sind Moleküle, die den PRRs zugeschrieben werden und nach ihrer Aktivierung befähigt sind, pro-Caspase-1 in seine aktive Form zu überführen. Caspase-1 wurde erstmalig im Jahr 1989 als eine Protease beschrieben, die als Pro-Form zytoplasmatisch vorliegt und eine aminoterminal Prosequenz (CARD) aufweist [34]. Caspase-1 ist eine Aspartat-spezifische Cysteinprotease, die unter anderem die Prozessierung von pro-IL1 β in seine sezernierbare Form steuert, ebenfalls ist eine Maturation von pro-IL-18 in seine funktionsfähige Form beschrieben [41]. Caspase-1 ist der Klasse der Mammalia eigen und kann in Vertebraten, die keine Säugetiere sind, nicht nachgewiesen werden.

Die Aktivierung von Pro-Caspase-1 erfolgt durch den multimolekularen Komplex des Inflammasoms (Abb. 2.2.1) [76]. Die bisher bekannten Caspase-1 aktivierenden Inflammasome besitzen einen PRR der NLR-Familie, beispielhaft sind hier NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLR-Familie CARD-domain-containing-protein 4 (NLRC4), DNA-sensing absent in melanoma 2 (AIM2) oder der RIG-1 Rezeptor zu nennen [36, 68, 83]. Die bis jetzt am besten beschriebenen Inflammasome, die durch PRRs der NLR-Familie agieren, sind NLRP3 und NLRC4. Alle NLRP-Moleküle besitzen zwei Domänen die immer vorhan-

2 Literatur

den sind, eine Leucine-Rich-Repeat (LRR) Domäne, die den Inflammasomen zur Erkennung von PAMPs/DAMPs dient [13] und eine Nukleotidbindungs-Domäne (NACHT), die für die Oligomerisierung des Inflammasom-Komplexes notwendig ist. Einige der NLR-Familie angehörenden Moleküle besitzen eine CARD, die sie zu einer direkten Bindung an pro-Caspase-1 befähigt. Fehlt diese CARD, wie zum Beispiel im Fall von NLRP3, erfolgt die pro-Caspase-1 Bindung indirekt über das Adaptermolekül ASC [83]. Die am häufigsten festgestellte Folge der Caspase-1 Aktivierung ist eine schnelle Sekretion von IL-1 β .

Die Inflammasomkomponenten NLRP3 und ASC werden beide der PAAD-Familie zugeschrieben. Die PAAD-Familie umfasst Proteine, die unter anderem eine Death Domain-like (PAAD) Domäne aufweisen. Diese Domäne ist auch unter dem Namen PYRIN, DPIN oder Pyd bekannt. Verschiedene Proteine dieser Familie sind in Aktivierungssignalwegen für NF- κ B und pro-Caspase-1 involviert. Die NF- κ B-Transkriptionsfaktoren migrieren in den Nukleus und aktivieren Promotoren verschiedener Zielgene, unter anderem den von pro-IL1 β und pro-Caspase-1. PAADs sind durch verschiedenen Proteine repräsentiert, die in Zusammenhang mit Entzündungen gebracht werden [6, 17, 52, 54, 82], trotzdem sind die molekularen Mechanismen weitgehend unbekannt. Mutierte Allele des PAAD-Familienmitglieds NLRP3 (Cryopyrin, PYPAF-1) stehen unter anderem in Zusammenhang mit dem humanen Cold Auto-Inflammatory Syndrom oder dem Muckle-Wells-Syndrom, beides Erkrankungen, die eine entzündliche Nierenbeteiligung aufweisen und den Schluss nahe legen, dass die Mitglieder der PAAD-Familie ebenfalls an entzündlichen Reaktionen der Nieren, denen andere Ursachen zugrunde liegen, beteiligt sind [9, 25].

Die NLR Genfamilie besteht beim Menschen aus 22 Mitgliedern, bei Mäusen aus 35 und bei Pflanzen aus mehreren Hundert [76]. Es handelt sich somit um eine hoch konservierte Genfamilie, die sich über die Artengrenzen hinweg in verschiedenen eukaryontischen Spezies wieder finden lässt. Alle Mitglieder der NOD-like-Rezeptor (NLR) Familie besitzen eine zentrale NACHT-Domäne und in den meisten Fällen eine C-terminale LRR-Domäne.

2 Literatur

Ist ein CARD wie im Fall von NLRP1 vorhanden wird kein ASC für die Aktivierung von pro-Caspase-1 benötigt. Dies gilt nicht für NLRP3, hier erfolgt eine Bindung einer CARD über eine Pyrin Domäne (PYD) die das NLRP3 Molekül aufweist.

ASC gehört zu einer Untergruppe der PAADs, die ein Death Domain Fold (DDF) aufweisen. Seinen Namen erhielt das Protein durch seine Fähigkeit, apoptotische Vorgänge durch Kondensation von cytosolischen "Speck Structures" zu triggern [57]. Die Mitglieder der DDF-Subfamilie besitzen verschiedene Proteindomänen, zwei dieser Domänen sind im Rahmen der pro-Caspase-1 Konvertierung von Interesse, die CARD und die PYD [3, 66, 97]. ASC ist eines der wenigen Proteine innerhalb der DDF-Familie, das sowohl eine NH₂-terminale PYD und zusätzlich ein CO-OH-terminales CARD aufweist. Beide Domänen sind elementar zur Bildung des NLRP3-Inflammasomkomplexes. ASC wird überwiegend in Monozyten und Epithelzellen der Mukosa exprimiert [58].

Die Bildung eines Inflammasomkomplexes ist nicht nur der Zusammenschluss eines NLRP3- mit einem ASC-Molekül, sondern es bildet sich ein Oligomer mit der Form einer Radspeiche aus, welches effizient Pro-Caspase-1 in Caspase-1 überführt. Aktivierung von Molekülen der NLR-Familie erfolgt nicht für alle Inflammasome gleich, sondern es existieren für jedes Inflammasom spezifische Erkennungsmuster, die zur Aktivierung führen. Es sind mehrere Ansätze für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und somit auch der NLRP3-Inflammasom Oligomerisierung beschrieben. Jede IL-1 β -Sekretion benötigt zwei aufeinander folgende Signale, wobei das erste Signal immer eine PAMP- oder DAMP-vermittelte Bereitstellung von pro-IL-1 β darstellt [30, 76]. Als zweites Signal, das letztendlich zur Aktivierung des Inflammasoms führt, sind folgende beschrieben worden: Erstens, eine erhöhte extrazelluläre ATP-Konzentration, die ermöglicht nach Aktivierung des ATP-abhängigen P2X7-Rezeptors das Einschleusen von PAMPs/DAMPs über geöffnete Pannexin-1-Poren oder zweitens, zellulärer Stress, für den das vermehrte Auftreten von Reactive-Oxygen-Species (ROS) und/oder Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) charakteristisch ist. TXNIP wird durch oxidativen Stress von seiner antioxidativen Reduktase Thioredoxin abgespalten, das entstandene Spaltprodukt kann NLRP3

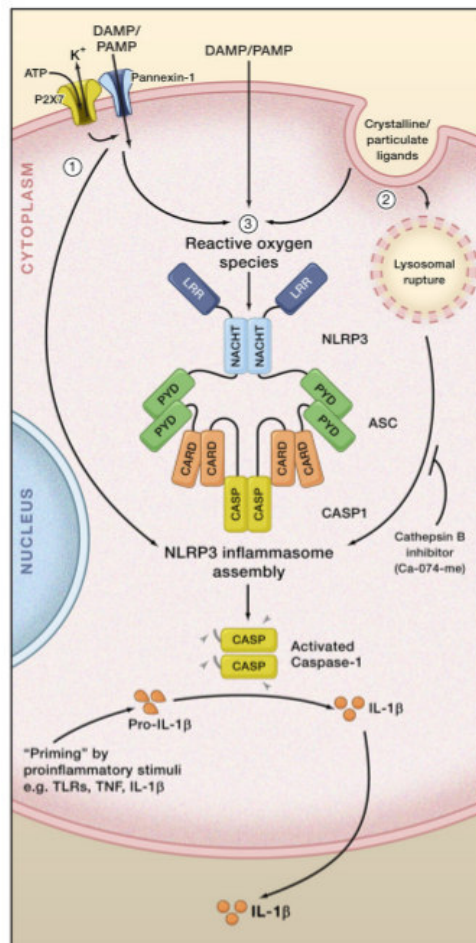


Abbildung 2.2.1: NLRP3-Inflammasom-Aktivierung [76]

direkt aktivieren und so die Bindung an ASC ermöglichen [43]. Der Efflux von intrazellulärem Kalium stellt einen essentiellen Vorgang bei der Inflammasomaktivierung dar, ohne den diese nicht abläuft. Der momentane Stand der Forschung liefert bis dato jedoch noch keinen Erklärungsansatz, durch welches Signal dieser Kaliumefflux gesteuert wird. Für das NLRP3-Inflammasom ist auch beschrieben, dass eine Aktivierung über phagozytierte Partikel oder Kristalle erfolgen kann. Hierbei rupturieren lysosomale Kompartimente und dadurch freigesetzte lysosomale Proteasen, wie Cathepsin-B führen zu einer Aktivierung der inflammasom-vermittelten IL-1 β -Sekernierung [2, 76, 91]. Die graphische Darstellung der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung findet sich in Abb. 2.2.1.

2.3 High-Mobility-Group-Box-1 Protein

HMGB-1 ist ein Nicht-Histon-Chromatin-Bindungsfaktor, der auch als Amphoterin bekannt ist. Es stellt ein sogenanntes Alarmin dar und wirkt als DAMP in Form eines proinflammatorischen Zytokins [51, 93]. Seine Aminosäuresequenz ist in allen Säugetierarten zu 98,5 % identisch [51]. HMGB-1 ist ein potenter Mediator entzündlicher Prozesse, beispielhaft hierfür sind Sepsis, Arthritis, Autoimmunerkrankungen und Diabetes zu nennen. HMGB-1 ist ein „Zellkernprotein“, welches durch Trauma, Nekroptose, Apoptose oder Nekrose und ebenso durch persistierenden oder akuten zellulären Stress durch Acetylierung vom Chromatin abgelöst wird. Dadurch gelangt es in das zytoplasmatische Kompartiment und wird von dort via Vesikel in den extrazellulären Raum sezerniert. Bei Patienten mit septischen Geschehen, beziehungsweise Lipopolysaccharid (LPS) induzierten Endotoxinämien, können erhöhte Serumspiegel von HMGB-1 nachgewiesen werden [96]. Eine passive Immunisierung mit HMGB-1-neutralisierenden Antikörpern führte zu einem geringeren Organschaden im Rahmen entzündlicher Geschehen [42, 73, 96]. Extrazelluläres HMGB-1 triggert Entzündungsprozesse zum Beispiel durch Rekrutierung von Leukozyten an den Ort des Gewebeschadens, durch Interaktion mit dem Rezeptor für „Advanced Glycation End-Products“ (RAGE), oder bewirkt weitere Zytokinfreisetzung. TLRs wie TLR2 und TLR4 sind Rezeptoren für HMGB-1. Die Aktivierung von TLR2 beziehungsweise TLR4 führt über das Adaptermolekül MyD88 zu einer Aktivierung von NF- κ B, der die Transkription von Leukozytenadhäsions-Molekülen, proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen (wie zum Beispiel IL-1 β) induziert. Dieser Prozess findet unter anderem in hämatopoetischen Zellen wie Makrophagen statt [100]. Dadurch werden entzündliche Prozesse gefördert [65]. Neue Studien belegen, dass die Freisetzung von HMGB-1 aus aktivierten Immunzellen auch Inflammasom-vermittelt sein kann [42, 51].

2.4 Nephrotoxische Serum–Nephritis

Die NTN stellt ein Modell einer Immunkomplex-vermittelten progressiven GN mit Aktivierung des Komplementsystems dar. Die Pathophysiologie wurde für das autologe und heterologe NTN-Modell erstmals 1936 von Smadel und Kollegen beschrieben [81]. In den frühen vierziger Jahren des vorigen Jahrhunderts wurde durch Kay et. al. ein Zusammenhang zwischen den Symptomen der renalen Schädigung und die durch die NTN-Induktion stattfindende Antikörperbildung auf das injizierte Antiserum gesehen [35]. Über die Jahre haben sich verschiedene NTN-Modelle entwickelt, die folgenden Punkte sind dabei in allen Modellen gleich: Es wird ein Antiserum gegen die GBM der zu testenden Spezies (meist Maus oder Ratte) hergestellt, indem eine zweite Spezies (meist Kaninchen oder Schaf) mit einer Präparation der GBM der ersten Spezies immunisiert wird. Das gewonnene heterologe, polyklonale Antiserum ("nephrotoxisches Serum") wird der zu testenden Spezies intravenös injiziert, wobei sich die enthaltenen Immunglobuline im Anschluss daran entlang der GBM ablagern. Zusätzlich kommt es zu einer humoralen Immunantwort mit Bildung von autologen Antikörpern im Empfängertier, die je nach verwendeter Spezies und des verwendeten nephrotoxischen Serums in ihrer Stärke variiert.

Die NTN kann in ein heterologes und ein autologes Modell unterteilt werden. Für das heterologe Modell wird eine Dosis des nephrotoxischen Serums verwendet die zu Schädigung der Nieren führt. Bei der Induktion des autologen Modells wird die Dosis des nephrotoxischen Serums jedoch soweit reduziert, dass nach alleiniger Injektion keine nephrotoxischen Effekte an den Nieren feststellbar sind. Man spricht in diesem Fall von einer subnephritischen Dosierung. Wird jedoch im Vorfeld eine Präimmunisation des Tiers mit Immunglobulinen der Spenderspezies durchgeführt, in der das nephrotoxische Serum generiert wurde, kommt es durch dieses Priming zu einer Nephritis.

Im heterologen Modell ist die initiale Phase durch die Bindung des Antigens im Bereich der Basalmembran gekennzeichnet, dies geschieht bereits wenige Minuten nach der

2 Literatur

Injektion. Die polyklonalen Immunglobuline des nephrotoxischen Serums binden dabei an die Wand des Endothels und der GBM, was zu einer lokalen Immunreaktion führt. Die primär stattfindende Aktivierung des Komplementsystems, innerhalb dieser Modelle, erfolgt über die Fc-Domäne der abgelagerten polyklonalen IgG Antikörper des nephrotoxischen Serums, die nun als Immunkomplexe im Bereich der GBM vorliegen. Dadurch kommt es zu einer klassischen Aktivierung des Komplementsystems. Komplementfaktor C1 bindet hierbei an den Fc-Teil des an der GBM gebundenen Antikörper und führt zu einer Aktivierung der Komplementfaktoren C4 und C2 in C4b und C2a. Nach Komplettierung von C4b und C2a (C3-Konvertase) wird Komplementfaktor C3 in C3b und C3a gespalten, welches im Anschluss zu einer Spaltung von Komplementfaktor C5 in C5a und C5b führt. C5a steuert hauptsächlich die Infiltration und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen [69] in der primären akuten Phase. Lytisch wirkende Komplementfaktoren, wie die Komplementfaktoren C5 bis C9 und deren Spaltprodukte, die einen sogenannten Membran-Angriffs-Komplex (MAK) bilden, können Poren in Zellmembranen hervorrufen, sie spielen aber im Rahmen der NTN eine eher untergeordnete Rolle [47].

Im autologen Modell der NTN kommt es nach vorangegangener Immunisierung gegen die Immunglobuline des nephrotoxischen Serums sekundär zu einer autologen Immunglobulinproduktion von IgM und IgG gegen das verwendete nephritogene Serum, dadurch wird die Komplementaktivierung und Immunkomplexbildung weiter verstärkt. Der Grund hierfür ist, dass die gebildeten autologen Antikörper Immunkomplexe mit dem verabreichten und glomerulär abgelagerten heterologen Immunglobulinen bilden. Hinsichtlich der Fähigkeit zur humoralen Immunantwort konnte in dem verwendeten autologen NTN Modell bereits nachgewiesen werden, dass in Tieren, die eine Defizienz für CD28 aufweisen, nur eine abgeschwächte Induktion der Immunkomplex-vermittelten GN mit nephrotoxischem Kaninchenserum möglich war. Die CD28-defizienten Tiere zeigten eine gestörte Fähigkeit bezüglich der B-Zell Aktivierung und entwickelten, verglichen mit Wildtyp-C57BL/6 Mäusen, niedrigere Maus-anti-Kaninchen IgG Antikörpertiter im Serum [64].

2 Literatur

CD28 ist ein Kofaktor auf T-Zellen, der für die Aktivierung dieser Zellreihe notwendig ist und sekundär auch an der B-Zell Aktivierung beteiligt ist. Außerdem konnte in CD28-defizienten Tieren keine glomeruläre Ablagerung von autologem Maus-anti-Kaninchen-IgG nach erfolgter Immunisierung mit Kaninchen-anti-Maus-GBM Antikörper nachgewiesen werden [64]. Nitta et al. konnten somit den Nachweis erbringen, dass die Bildung von Maus-anti-Kaninchen IgG im Rahmen der Immunkomplex-vermittelten GN abhängig von B-Zellen/Plasmazellen ist und somit auch die damit verbundene Antikörperproduktion gegen die glomerulär abgelagerten Immunglobulins des nephrotoxischen Serums. Andere Untersuchungen zeigen, dass die lokale und systemische humorale Immunantwort in Mäusen, die defizient bezüglich der μ -Ketten von Immunglobulinen waren, zu einer verminderten Induktion der autologen NTN führte, da diese Tiere auf Grund ihrer Genetik keine B-Zell vermittelte IgG Produktion aufweisen [71].

Im Modell der autologen NTN konnten die Untersuchungen von Tipping et. al. zudem eine Th1-Zell abhängige Immunantwort nachweisen [89]. Th1-Zellen sind eine Untergruppe von CD4 positiven T-Lymphozyten, die durch $\text{INF-}\gamma$ oder $\text{TNF-}\alpha$ aktiviert werden. Im weiteren Verlauf sezernieren aktivierte Th1-Zellen selbst $\text{INF-}\gamma$, welches die zelluläre und humorale Immunantwort in der autologen NTN weiter stimuliert und dadurch wesentlich zur Progression der Nierenschädigung beiträgt [89]. Für renale DCs wurde nachgewiesen, dass sie im Modell der autologen NTN die T-Zellantwort in proinflammatorischer Weise beeinflussen [24]. Die Aktivierung der Th1-Zellen führt zu einer Aktivierung von B-Zellen, dieser Schritt ist essenziell, um eine Immunglobulinproduktion durch Plasmazellen im Rahmen der humoralen Immunantwort zu induzieren. Der Verlauf einer NTN ist allerdings abhängig von der Linie des Mausstammes, der für die Untersuchungen verwendet wird. Es wurde gezeigt, dass Inzuchtstämme von Mäusen im z. B. C57BL/6 oder Sv/129 Hintergrund eine optimal ausgeprägte NTN entwickeln, wohingegen in z. B. BALB/c oder C3H kaum oder nur geringgradige Veränderungen nach Applikation des nephritogenen Serums induziert wurden [27, 99]. Dieses Phänomen ist begründet durch die genetisch bedingte, kaum vorhandene Th1-Zellantwort in BALB/c und C3H Tieren,

ohne die das NTN Modell nicht regelrecht ablaufen kann.

In den durchgeführten Untersuchungen dieser Arbeit wurden diese Aspekte berücksichtigt. Alle verwendeten Mauslinien lagen in einem C57BL/6 Hintergrund vor und transgene Tiere wurden über mindestens sieben Generationen in einen C57BL/6 Hintergrund rückgekreuzt.

2.5 Arbeitshypothese

Zusammenfassend haben die oben erwähnten Sachverhalte bereits die pathophysiologische Rolle von IL1- β im Rahmen der antikörpervermittelten GN gezeigt. Das NLRP3-Inflammasom ist an der Prozessierung und Sezernierung von IL1- β wesentlich beteiligt. Als Hauptquelle der IL-1 β -Produktion während entzündlicher Prozesse sind DCs zu sehen. Die NTN ist ein Modell für antikörpervermittelte GN, die in ihrer autologen Phase von DCs und Th1-Zell vermittelt wird. Sie zeigt das Bild einer verspäteten Hypersensitivitätsreaktion, welches auch die Grundlage der antikörpervermittelten progressiven GN ist. Der vorliegenden Arbeit liegt daher die Hypothese zugrunde, dass eine NLRP3-Inflammasom-abhängige Bildung von IL-1 β wesentlich zur entzündlichen Schädigung im autologen NTN-Modell der Immunkomplex-GN beiträgt. Der Nachweis einer derartigen proinflammatorischen Rolle würde das NLRP3-Inflammasom als potentielle Zielstruktur für eine entzündungshemmende Therapie während einer Immunkomplex-GN identifizieren.

Folgende Fragen sollten daher durch diese Arbeit geklärt werden: Führt eine Defizienz der Inflammasomkomponenten NLRP3 oder ASC zu einer verminderten Maturierung und Sezernierung von IL-1 β im autologen Modell der NTN? Wird dadurch ebenfalls die renale Schädigung, die durch die Immunreaktionen auf die glomerulär abgelagerten nephritogenen Immunkomplexe hervorgerufen werden, gemildert? Stellen die dendritischen Zellen während der autologen NTN die Hauptquelle für die Komponenten des NLRP3-Inflammasoms dar?

2 Literatur

Um dies zu untersuchen, wurden im autologen Modell der NTN Nlrp3-defiziente und Asc-defiziente Tiere und zum Vergleich Wildtypiere untersucht. Ferner wurden Mäuse, mit einer Defizienz für Il1r1 und Myd88 untersucht, um Effekte einer unterbrochenen IL-1 β -Signaltransduktion durch Fehlen des Rezeptors (IL-1R1) beziehungsweise des Adapterproteins (MyD88) zu charakterisieren.

3 Publikation

The NLRP3/ASC inflammasome promotes T-cell-dependent immune complex glomerulonephritis by canonical and noncanonical mechanisms

Kirstin Andersen¹, Nuru Eltrich¹, Julia Lichtneker¹, Hans-Joachim Anders¹ and Volker Vielhauer¹

¹Nephrologisches Zentrum, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany

Interleukin (IL)-1 β contributes to renal injury in immune complex glomerulonephritis. However, production of mature IL-1 β depends on activation of the inflammasome that cleaves pro-IL-1 β into its secretable form. A functional role of the NLRP3-containing inflammasome, which responds to various endogenous danger signals, was found in tubulointerstitial nephropathies, but its function in glomerular disease has not been established. To determine whether NLRP3 and its adapter molecule ASC contribute to glomerulonephritis, we induced T-cell-dependent autologous nephrotic serum nephritis in *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice. Renal expression of NLRP3/ASC inflammasome components and pro-IL-1 β increased during nephrotic serum nephritis and was abundant in renal dendritic cells. This was associated with renal production of mature IL-1 β , indicating inflammasome activation. *Nlrp3* and *Asc* deficiency significantly attenuated glomerular injury, renal leukocyte infiltration, and T-cell activation. Production of mature IL-1 β was abrogated in *Asc*-deficient mice, consistent with a loss of inflammasome-dependent IL-1 β activation. Surprisingly, renal IL-1 β secretion remained intact in *Nlrp3*-deficient mice, indicating noncanonical pro-inflammatory effects of NLRP3 in autologous nephrotic serum nephritis. This may include NLRP3-mediated glomerular release of pro-inflammatory high-mobility group box 1 protein as a noncanonical function of NLRP3/ASC in glomerulonephritis. Thus, therapeutic blockade of the NLRP3/ASC/IL-1 β axis may be beneficial in glomerulonephritis.

Kidney International advance online publication, 7 May 2014;
doi:10.1038/ki.2014.161

KEYWORDS: cytokines; dendritic cell; interleukin 1; nephrotic serum nephritis

Correspondence: Volker Vielhauer, Nephrologisches Zentrum, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München, Ludwig-Maximilians-University Munich, Ziemssenstr. 1, Munich 80336, Germany. E-mail: Volker.Vielhauer@med.uni-muenchen.de

Received 5 November 2013; revised 24 February 2014; accepted 24 March 2014

Kidney International

Chronic glomerulonephritis (GN) is often caused by glomerular deposition or *in situ* formation of immune complexes, which trigger an adaptive humoral and cellular nephritogenic immune response toward planted glomerular antigens.^{1,2} Studies in autologous nephrotic serum nephritis (NTN), a rodent model of immune complex-mediated, T-cell-dependent progressive crescentic GN, demonstrated the essential role of pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 and tumor necrosis factor (TNF) in immune complex-mediated GN.^{3–5} Analysis of murine bone marrow chimeras with autologous NTN suggested that leukocyte-derived IL-1 β interacts with renal cell-expressed IL-1 receptor 1 (IL-1R1) to promote glomerular injury.⁶

In contrast to other cytokines, secretion of active IL-1 β (and IL-18) requires two activation steps. First, cells must be primed to induce nuclear factor- κ B-mediated expression of pro-IL-1 β . Second, the immature pro-cytokine is enzymatically cleaved into the biologically active form by cytosolic caspase-1. The cleavage-induced activation and secretion of IL-1 β is signaled by several cytosolic NOD-like receptors (NLRs) or the HIN-200 family member AIM2.⁷ These proteins respond to microbial pathogen-associated molecular patterns or host-derived damage-associated molecular patterns to form large multimeric protein complexes, the inflammasomes. Inflammasomes recruit and activate caspase-1 either directly or through the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), leading to caspase-1 cleavage and subsequent activation of IL-1 β .⁸ The NLRP3-containing inflammasome converts a wide spectrum of microbial and endogenous triggers into caspase-1 activation and IL-1 β secretion. Endogenous triggers include uric acid crystals, cholesterol crystals, amyloid crystals, or high glucose levels.⁹ Additional inducers of the NLRP3 inflammasome are extracellular ATP, oxidative stress, or biglycan, all of which can contribute to renal cell injury.⁵ Consistently, *Nlrp3*-deficient mice secreted less renal IL-1 β and developed less renal damage during ischemia/reperfusion injury,^{10,11} unilateral

ureteral obstruction,¹² and oxalate nephropathy,^{13,14} three models of tubulointerstitial disease.

In contrast, we could not demonstrate activation of caspase-1 and renal release of mature IL-1 β in acute heterologous NTN, a GN model involving innate but no adaptive immune effector mechanisms.¹⁵ Consistently, *Nlrp3* and *Asc* deficiency did not ameliorate renal disease in this model.¹⁵ *In vitro*, renal dendritic cells (DCs), but not intrinsic glomerular cells, secreted IL-1 β upon NLRP3 activation, although this apparently did not occur in heterologous NTN *in vivo*.¹⁵ However, renal DCs acquire a pro-inflammatory phenotype and become pathogenic during the prolonged course of autologous NTN. They express higher levels of co-stimulatory molecules, produce TNF, and present nephritogenic antigens to T cells, which are activated.^{16,17} Together with the previously demonstrated role of leukocyte-derived IL-1 β in T-cell-dependent GN,⁶ these data suggest a potential contribution of the DC-expressed NLRP3/ASC inflammasome to renal IL-1 β production and kidney injury in autologous NTN.

We therefore hypothesized that the NLRP3 inflammasome drives glomerular immunopathology in chronic T-cell-dependent immune complex GN. We tested this hypothesis experimentally by inducing autologous NTN in *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice and characterized their phenotype in comparison with wild-type mice. Our data demonstrate for the first time a functional contribution of NLRP3 and ASC to glomerular disease.

RESULTS

Expression of NLRP3/ASC inflammasome components and mature IL-1 β is induced in autologous NTN

To determine whether the NLRP3 inflammasome was expressed and activated in renal injury during autologous NTN, we studied renal mRNA levels of inflammasome components and the production of mature IL-1 β in nephritic wild-type kidneys. The mRNA expression of NLRP3, ASC, pro-caspase-1, and pro-IL-1 β , but not of pro-IL-18, was markedly induced in NTN kidneys (Figure 1a). Expression analysis of other potential inflammasome-forming and IL-1 β -activating NLRs argued against an unspecific induction during NTN, as NLRP1b, but not NLRP12, mRNA increased in nephritic kidneys (Figure 1a). The inflammasome components NLRP3, ASC, and pro-caspase-1 were preferentially expressed in CD11c⁺ DCs isolated from NTN kidneys compared with lower expression in renal tissue depleted for CD11c⁺ cells, i.e., CD11c⁻ leukocyte subsets and renal parenchymal cells (Figure 1b). Importantly, increasing amounts of cleaved, mature IL-1 β protein could be detected in NTN kidneys (Figure 1c). Together with our previous findings of absent IL-1 β maturation in glomeruli and nonimmune glomerular cells¹⁵ and the reported role of leukocyte-derived, but not of parenchymal cell-derived, IL-1 β in GN,⁶ these data suggest an important contribution of the NLRP3/ASC inflammasome expressed in renal DCs to IL-1 β production and renal injury during autologous NTN.

Nlrp3 and Asc deficiency improves renal function in autologous NTN

To investigate the putative function of the NLRP3/ASC inflammasome in immune complex GN, we induced autologous NTN in *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice, and in *Il-1r1*- and *Myd88*-deficient mice with deficient IL-1 β signaling due to lack of its receptor or signaling adapter molecule, respectively. Wild-type mice developed progressive albuminuria from day 7 to day 21. In *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice, albuminuria was significantly reduced throughout the study period, whereas it did not develop in mice lacking IL-1R1 or myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88; Figure 2a). Serum hypoalbuminemia and hypercholesterolemia were present in wild-type mice on day 21, consistent with nephrotic syndrome. These parameters improved in *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice, and were not significantly different from healthy wild-type mice in *Il-1r1*- and *Myd88*-knockout strains (Figure 2b). Serum urea levels were substantially elevated in wild-type mice with NTN, but decreased in *Nlrp3*-, *Asc*-, *Il-1r1*-, and *Myd88*-deficient mice (Figure 2b). Thus, *Nlrp3* and *Asc* deficiency significantly improved functional parameters of autologous NTN, and absent IL-1 β signaling capacity in *Il-1r1*- and *Myd88*-deficient mice substantially protected from functional alterations. Of note, IL-1R1 is also activated by IL-1 α , and the signaling adapter MyD88 additionally mediates pro-inflammatory effects of Toll-like receptors. Both IL-1 α and Toll-like receptors contribute to the pathogenesis of NTN,^{4,18,19} and simultaneous blockade of these mediators together with IL-1 β signaling may explain the highly protective phenotype in *Il-1r1*- and *Myd88*-deficient mice.

Nlrp3 and Asc deficiency attenuates glomerular injury in autologous NTN

Decreased albuminuria indicated reduced glomerular injury in *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice compared with wild-type mice. Consistently, analysis of glomerular fibrinoid necrosis, crescent formation, and the number of preserved podocytes demonstrated less glomerular pathology in *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice compared with wild type (Figure 3a and b). In addition, secondary tubulointerstitial injury significantly decreased in *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice (Figure 3e). Glomerular and tubulointerstitial injury was minimal in mice lacking IL-1R1 or MyD88 (Figure 3a, b, and e). Together, the NLRP3 inflammasome contributes to renal injury in the autologous NTN model of immune complex GN.

NLRP3 and ASC promote leukocyte recruitment in autologous NTN

Infiltrating renal leukocytes were quantitated by flow cytometry of renal single-cell suspensions and immunohistochemistry on day 21 of NTN. Flow cytometry revealed renal accumulation of mononuclear phagocytes and T cells in wild-type mice, which was significantly decreased in *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice and was reduced further in mice lacking IL-1R1 and MyD88 (Figure 4a). Only numbers of

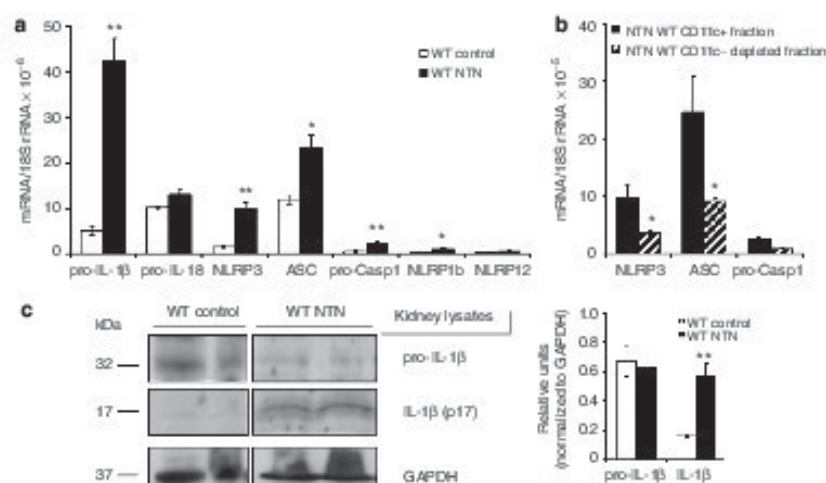


Figure 1 | Activation of the inflammasome in mice during autologous nephrotoxic serum nephritis (NTN). (a) Renal mRNA expression of interleukin (IL)-1 β -activating inflammasome components was analyzed in control and nephritic wild-type (WT) mice on day 21 of NTN. Quantitative real-time PCR revealed significantly induced mRNAs for NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3), ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), pro-caspase-1, pro-IL-1 β and NLRP1b, but not pro-IL-18 and NLRP12, in nephritic kidneys. PCR results were normalized to 18S rRNA expression used as reference gene. Data represent mean \pm s.e.m. of 5–8 mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with WT control. (b) Renal CD11c⁺ dendritic cells (DCs) isolated from nephritic WT kidneys expressed NLRP3, ASC, and pro-caspase-1 mRNA more abundantly than DC-negative renal tissue. * $P < 0.05$. (c) Immunoblotting of renal tissue lysates from normal and nephritic WT mice on day 21 of NTN demonstrated the appearance of mature (processed) IL-1 β in nephritic kidneys, consistent with renal inflammasome activation. ** $P < 0.01$ compared with wild-type control by the two-sided Mann-Whitney U-test. GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

CD3⁺ CD8⁺ T cells were similar in wild-type and *Nlrp3*-deficient NTN kidneys, and were also elevated in *Myl88*-deficient animals (Figure 4a). These results were confirmed by immunohistochemistry on cortical renal tissue that demonstrated reduced interstitial infiltration of F4/80⁺ and ERHR3⁺ phagocytes, and CD3⁺ T cells into kidneys of *Nlrp3*-, *Asc*-, and particularly *Il1r1*- and *Myl88*-deficient mice (Figure 4b). Interestingly, glomerular infiltrates of ERHR3⁺ phagocytes and CD3⁺ T cells were reduced in *Asc*-deficient, but not in *Nlrp3*-deficient, mice (Figure 4b). Numbers of infiltrating renal F4/80⁺ mononuclear phagocytes closely correlated with the degree of albuminuria across the different genotypes (Figure 4c). Together, improved functional parameters and glomerular injury in NTN were associated with reduced renal leukocyte infiltrates in *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice.

***Nlrp3* and *Asc* deficiency decreases renal expression of inflammatory mediators**

Intrarenal mRNA expression of inflammatory mediators significantly increased in nephritic wild-type kidneys compared with untreated controls (Figure 5). mRNAs for IL-17 (156-fold), IL-6 (47-fold), and C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2; 45-fold) were most prominently upregulated, all of which mediate immune complex GN.^{20–23} Expression of most inflammatory molecules was significantly reduced in *Nlrp3*-

and *Asc*-deficient mice and was similar to healthy wild-type kidneys in *Il1r1*-deficient animals (Figure 5). Of note, pro-IL18 mRNA was not induced in nephritic wild-type kidneys or regulated in the other genotypes (Figure 5a). Interestingly, expression of some pro- and anti-inflammatory mediators was downregulated in *Asc*-deficient, but not in *Nlrp3*-deficient mice despite a similar protective renal phenotype. These included the pro-inflammatory cytokine IL-17 and pro-caspase 1 (Figure 5a and d). Thus, deficiency of the inflammasome component NLRP3 and its adapter ASC both attenuated NTN and renal leukocyte accumulation but differentially affect intrarenal inflammatory pathways.

Renal production of IL-1 β during NTN requires ASC but not NLRP3 expression

We next investigated production of mature IL-1 β in kidneys of *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice with NTN by immunoblotting of organ lysates. Consistent with a canonical inflammasome-dependent role of ASC, its deficiency abolished production of mature IL-1 β in nephritic kidneys (Figure 6a). Unexpectedly, in *Nlrp3*-deficient mice, IL-1 β maturation remained intact and was comparable to wild type (Figure 6a), indicating a redundancy of NLRP3 for renal IL-1 β secretion. As the NLRP3/ASC inflammasome components were most abundantly expressed in renal DCs during NTN (Figure 1b), we additionally investigated their expression in DCs isolated

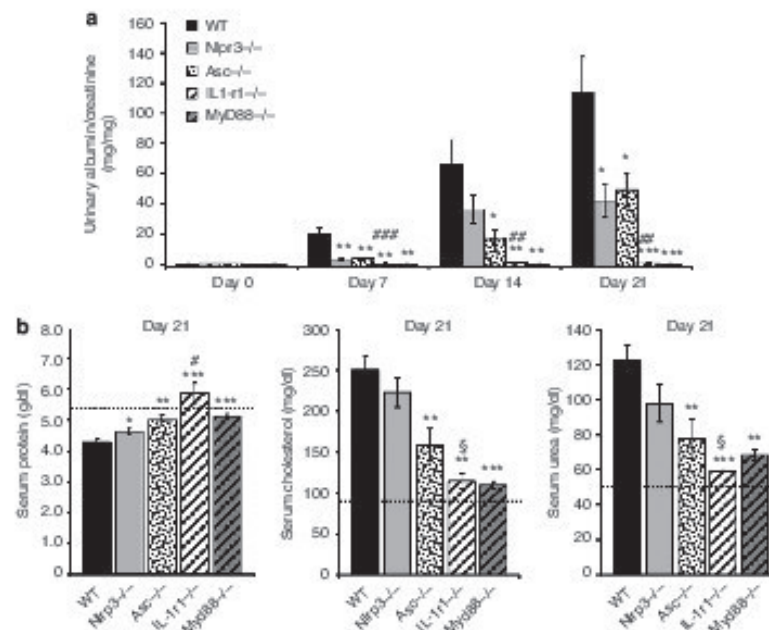


Figure 2 | Albuminuria and renal function is improved in mice deficient for *Nlrp3*, *Asc*, *Il-1r1*, and *Myd88*. (a) Albuminuria was evaluated in spot urine samples at indicated days after injection of nephrotoxic serum and is expressed as urinary albumin/creatinine ratio (mg/mg). (b) Serum levels of total protein, cholesterol, and urea were determined at day 21 of nephrotoxic serum nephritis. Dashed lines indicate mean baseline values for normal wild-type (WT) mice. Data represent mean \pm s.e.m. of 5–15 mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with WT; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice; * $P < 0.05$ compared with *Nlrp3*-deficient but not *Asc*-deficient mice (the Kruskal–Wallis test followed by pairwise Mann–Whitney *U*-tests).

from *Nlrp3*- and *Asc*-deficient kidneys with NTN. *Asc*-deficient DCs revealed decreased expression of the inflammasome components NLRP3, pro-caspase 1, and pro-IL-1 β , as well as the inflammasome-independent cytokine TNF (Figure 6b). This indicates a reduced activation status of intrarenal DCs and a compromised capability to form inflammasomes, consistent with the absent renal production of mature IL-1 β . In contrast, *Nlrp3*-deficient DCs expressed lower levels of pro-IL-1 β and TNF, but without alteration of ASC and pro-caspase 1 expression (Figure 6b), consistent with reduced DC activation but preserved ability to generate mature IL-1 β in an inflammasome-dependent, although not NLRP3-dependent, mechanism. Renal DC-specific analysis of expressed inflammasome components closely resembled the results obtained for whole-kidney mRNA (Figure 5d). To investigate whether the requirement for ASC, but not NLRP3, to produce mature IL-1 β was specific for nephritic kidneys, we additionally analyzed spleen lysates of mice with NTN. Appearance of mature IL-1 β was significantly abrogated not only in *Asc*-deficient spleens but was also reduced in *Nlrp3*-deficient spleens (Figure 6c), indicating a contribution of both inflammasome components to systemic IL-1 β production.

Thus, in autologous NTN, IL-1 β production depends on the presence of ASC-containing inflammasomes, but renal IL-1 β secretion does not specifically require NLRP3. Together, these data suggest that the NLRP3/ASC inflammasome contributes to autologous NTN in a canonical and noncanonical manner.

Renal production of cleaved IL-1 α during NTN increases in *Asc*-deficient, but not *Nlrp3*-deficient mice

Il-1r1-deficient mice were substantially protected from renal injury during NTN. Compared with *Asc*-deficient mice lacking IL-1 β production, *Il-1r1* deficiency led to a significantly greater improvement of several disease parameters, including albuminuria, hypoproteinemia, glomerular fibrin deposition and podocyte loss, renal leukocyte infiltration, and renal mRNA expression of inflammatory mediators, such as pro-IL-1 β , IL-12, and CCL2 (Figures 2–4). As IL-1 α and IL-1 β both signal through IL-1R1, its activation by IL-1 α may contribute to the residual renal injury in *Asc*-deficient mice. Consistently, we found an increased production of cleaved IL-1 α in nephritic kidneys of *Asc*-deficient mice compared with nephritic wild-type controls (Supplementary Figure S1 online). Interestingly, abundance of

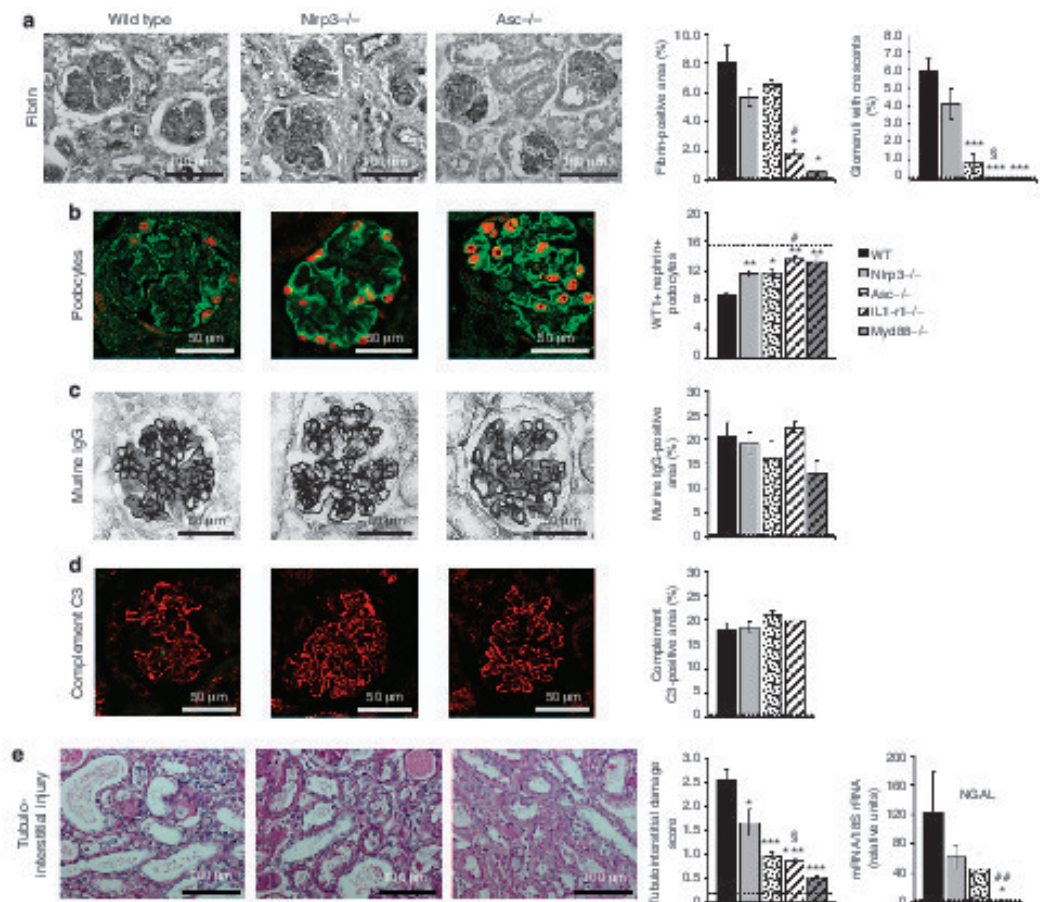


Figure 3 | Renal injury on day 21 after induction of nephrotoxic serum nephritis. (a) Representative photomicrographs of kidney sections from wild-type (WT), *Nlrp3*^{-/-}, and *Asc*^{-/-} mice after immunohistochemical staining for fibrin. Morphometric assessment demonstrated fibrinoid necrosis in WT glomeruli, which was attenuated in knockout strains. Glomerular crescent formation was significantly reduced in *Asc*^{-/-} deficient mice, and absent in *IL1-1*^{-/-} and *Myd88*^{-/-} deficient mice. (b) Podocytes were identified by double staining for nephrin and nuclear Wilms tumor antigen-1. Podocyte loss was attenuated in all investigated knockout mice. (c) Glomerular deposition of murine autologous IgG and (d) complement C3 as demonstrated by immunohistochemistry was not significantly altered in all genotypes. (e) Tubulointerstitial injury was attenuated in *Nlrp3*^{-/-} deficient and more significantly in *Asc*^{-/-}, *IL1-1*^{-/-}, and *Myd88*^{-/-} deficient mice. This correlated with reduced renal mRNA expression of the tubular injury marker neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Images show representative glomeruli or tubulointerstitial tissue from each group, original magnification $\times 400$. Semiquantitative and morphometric analysis was performed as described in Materials and Methods. Dashed lines indicate mean baseline values for normal WT mice. In all, 25 glomeruli or 10 tubulointerstitial high power fields per mouse were evaluated. Data represent mean \pm s.e.m. of five mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ compared with wild-type; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} deficient mice; $^{\dagger}P < 0.05$ compared with *Nlrp3*^{-/-} deficient but not *Asc*^{-/-} deficient mice (the Kruskal-Wallis test followed by pairwise Mann-Whitney *U*-tests).

cleaved IL-1 α was minimal in nephritic wild-type and *Nlrp3*^{-/-} deficient mice, and was significantly lower than its expression in healthy wild-type kidneys. These data indicate a constitutive and compensatory cleavage of IL-1 α in conditions without ASC inflammasome-dependent IL-1 β processing, i.e., in unprimed healthy wild-type and nephritic *Asc*^{-/-} deficient mice.

Local and systemic humoral immune responses to the nephritogenic antigen are preserved in *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} mice

Absent B-cell-dependent immunoglobulin G (IgG) production in μ -chain-deficient mice ameliorates autologous NTN.²⁴ We therefore analyzed humoral immune responses in *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} deficient mice with NTN. Glomerular

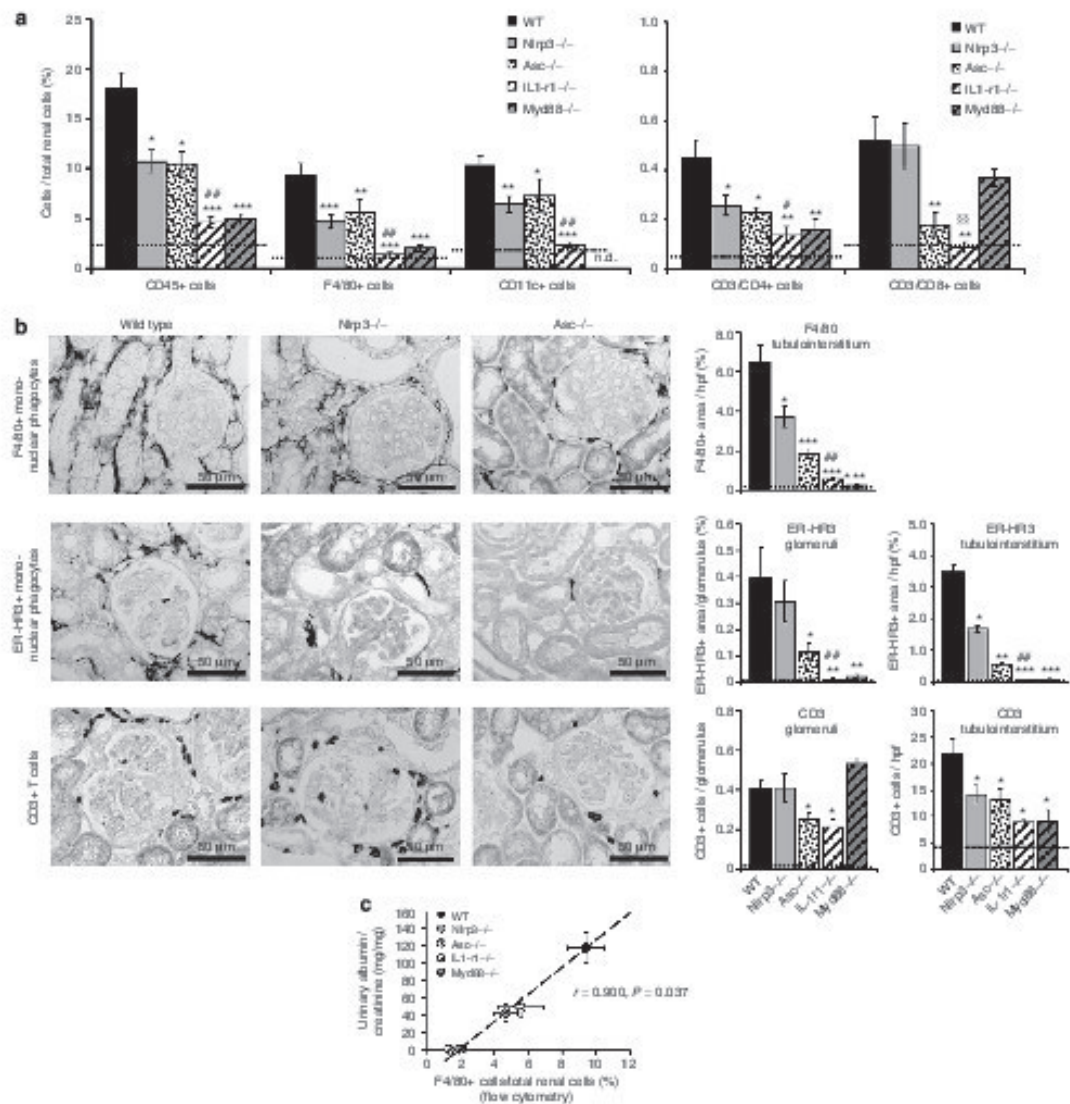


Figure 4 | Renal leukocyte infiltrates in nephritic wild-type (WT), *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-}, *Il1r1*^{-/-}, and *Myd88*^{-/-} mice on day 21 of nephrotoxic serum nephritis. (a) Flow cytometric analysis of renal single-cell suspensions prepared from nephritic kidneys demonstrated reduced leukocyte infiltrates in transgenic mice compared with WT. Cells were stained for CD45 (pan leukocyte marker), F4/80 (mononuclear phagocytes), CD11c (DC-like mononuclear phagocytes), CD3/CD4 (CD4⁺ T helper cells), and CD3/CD8 (CD8⁺ cytotoxic T cells). **(b)** Representative renal sections of WT, *Nlrp3*^{-/-}, and *Asc*^{-/-} mice stained for F4/80⁺ mononuclear phagocytes, ER-HR23⁺ inflammatory macrophages, and CD3⁺ T cells, original magnification $\times 400$. Glomerular and tubulointerstitial leukocyte infiltrates were quantified as described in Materials and Methods. Dashed lines indicate mean baseline values for normal WT mice. Data represent mean \pm s.e.m. of at least five mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with WT; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} mice; *** $P < 0.001$ compared with *Nlrp3*^{-/-} but not *Asc*^{-/-} mice (the Kruskal-Wallis test followed by pairwise Mann-Whitney *U*-tests). n.d., no data. **(c)** The number of renal F4/80⁺ mononuclear phagocytes closely correlated with albuminuria across all genotypes investigated (Spearman's rank-correlation test).

deposition of murine autologous IgG directed against the planted heterologous rabbit immunoglobulins was readily detectable in wild-type kidneys on day 21 of NTN, without

significant differences in *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-}, *Il1r1*^{-/-}, and *Myd88*^{-/-} mice (Figure 3c). As glomerular injury in this NTN model is complement dependent,²⁵ we also quantified local

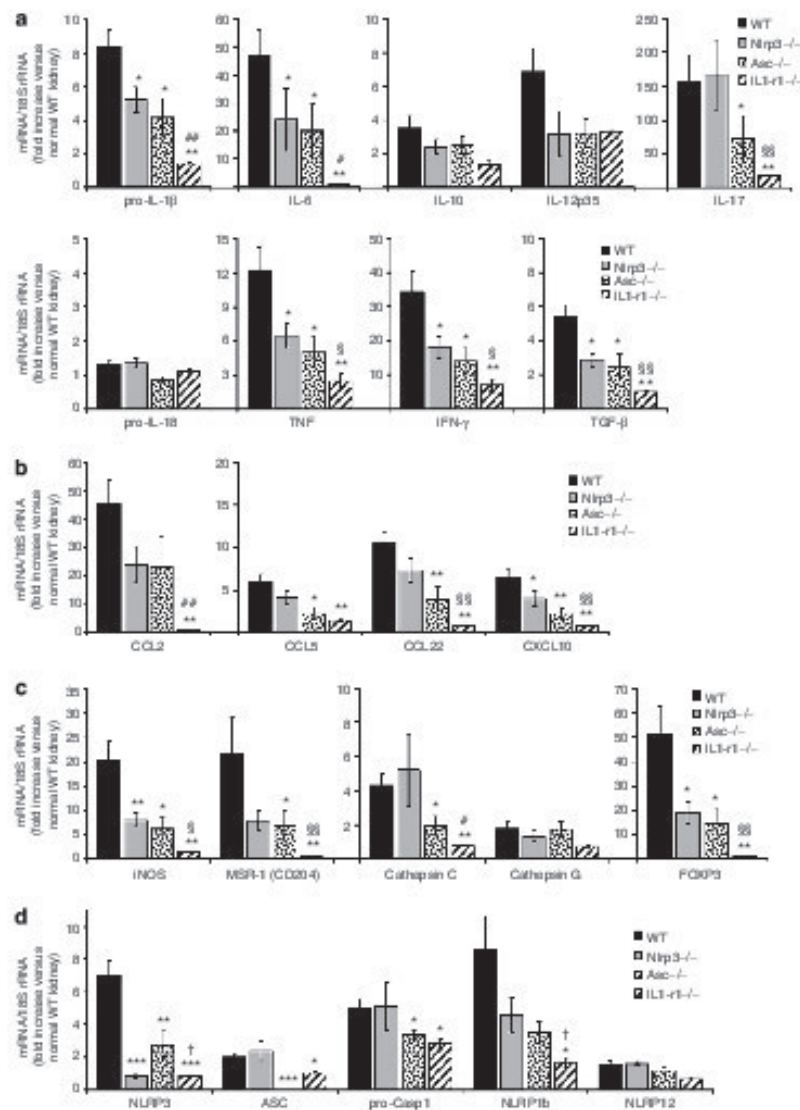


Figure 5 | Renal mRNA expression of inflammatory mediators in wild-type (WT), *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-}, and *Il-1r1*^{-/-} mice on day 21 of autologous nephrotoxic serum nephritis (NTN). (a) Induced expression of most cytokines in nephritic WT kidneys was significantly attenuated in *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-}, and *Il-1r1*^{-/-} mice. Note that IL-17 expression was reduced in *Asc*^{-/-} and *Il-1r1*^{-/-} deficient, but not *Nlrp3*^{-/-} deficient kidneys. Renal mRNA for inflammasome-processed pro-IL-18 was not induced during NTN. (b) Increased renal expression of pro-inflammatory chemokines in WT mice was reduced in mice deficient for NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3), ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), and IL-1R1. (c) Several additional pro- and anti-inflammatory mediators upregulated in WT kidneys were significantly downregulated in the knockout strains investigated. (d) Induced expression of the NLRP3/ASC inflammasome components was decreased in *Asc*^{-/-} and *Il-1r1*^{-/-} deficient kidneys, but ASC and pro-caspase-1 expression was not downregulated in *Nlrp3*^{-/-} deficient mice. Increased renal expression of NLRP1b in nephritic WT mice was reduced in transgenic strains, without significantly regulated expression of the NLRP12 inflammasome component in nephritic kidneys. PCR results were normalized to 18S rRNA as a housekeeping gene. Data represent mean \pm s.e.m. of eight mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with WT; † $P < 0.05$, ‡ $P < 0.01$ compared with *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} deficient mice; § $P < 0.05$, ¶ $P < 0.01$ compared with *Nlrp3*^{-/-} deficient but not *Asc*^{-/-} deficient mice; † $P < 0.05$ compared with *Asc*^{-/-} deficient mice (the Kruskal-Wallis test followed by pairwise Mann-Whitney U-tests). CCL, C-C motif chemokine ligand; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; IFN, interferon; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MSR-1, macrophage scavenger receptor 1; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor.

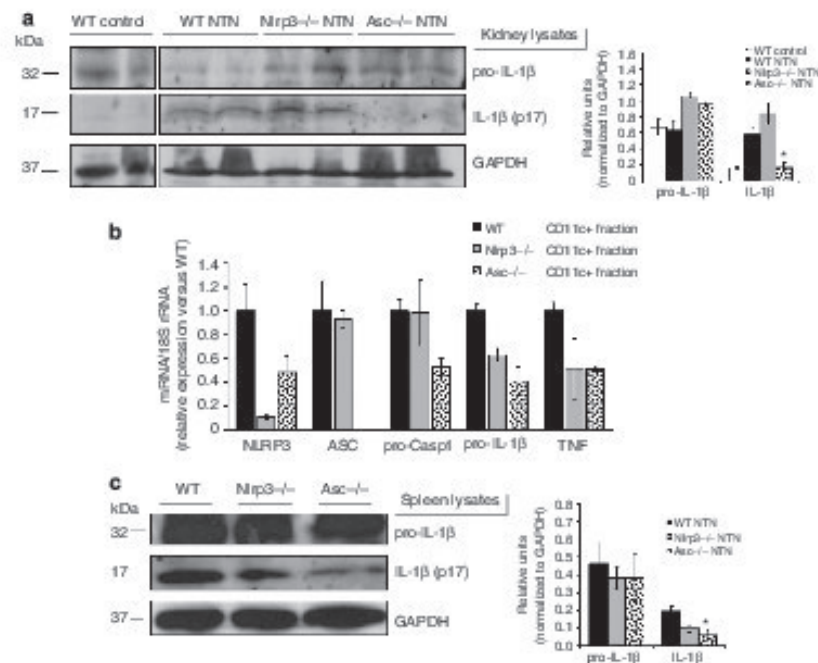


Figure 6 | ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)-dependent, but not NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3)-dependent, maturation of renal IL-1 β during autologous nephrotic serum nephritis (NTN). (a) IL-1 β immunoblotting in kidney lysates of wild-type (WT), *Nlrp3* $^{-/-}$, and *Asc*-deficient mice with NTN. Appearance of mature 17-kD IL-1 β indicates activation, which was present in WT and *Nlrp3*-deficient, but not *Asc*-deficient mice. * $P < 0.05$ compared with nephritic WT. (b) mRNA expression of NLRP3/ASC inflammasome components in renal CD11c $^{+}$ dendritic cells isolated from nephritic kidneys. Expression values were normalized to 18S rRNA and are illustrated relative to WT. Data represent mean \pm s.e.m. of four kidneys per group. (c) IL-1 β immunoblotting in spleen lysates of nephritic WT, *Nlrp3* $^{-/-}$, and *Asc*-deficient mice 72 h after restimulation with rabbit IgG *in vitro*. * $P < 0.05$ (the Kruskal-Wallis test followed by pairwise Mann-Whitney *U*-tests). GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

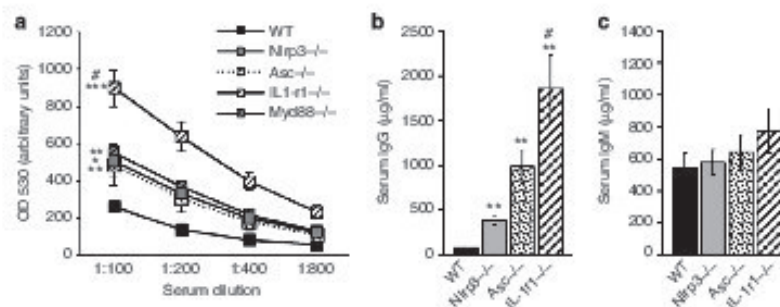


Figure 7 | Circulating autologous mouse anti-rabbit immunoglobulin (Ig) G levels in wild-type (WT), *Nlrp3* $^{-/-}$, *Asc* $^{-/-}$, *Il-1r1* $^{-/-}$, and *Myd88*-deficient mice during nephrotic serum nephritis (NTN). (a) Antibody levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from serum samples on day 21 of NTN. Titers in serial dilutions of serum are expressed in arbitrary units. OD 530, optical density at 530 nm. (b) Levels of serum IgG and (c) IgM in WT and transgenic mice on day 21 of NTN, as determined by ELISA. Data represent mean \pm s.e.m. of 5–6 mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ compared with WT; # $P < 0.05$ compared with *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice (the Kruskal-Wallis test followed by pairwise Mann-Whitney *U*-tests).

deposition of complement C3. Compared with wild-type, glomerular C3d deposition was not reduced in any genotype (Figure 3d). Moreover, circulating mouse anti-rabbit IgG

could be detected in all genotypes, with higher serum titers in *Nlrp3* $^{-/-}$, *Asc* $^{-/-}$, *Il-1r1* $^{-/-}$, and *Myd88*-deficient mice than in wild-type on day 21 of NTN (Figure 7a). This increase in

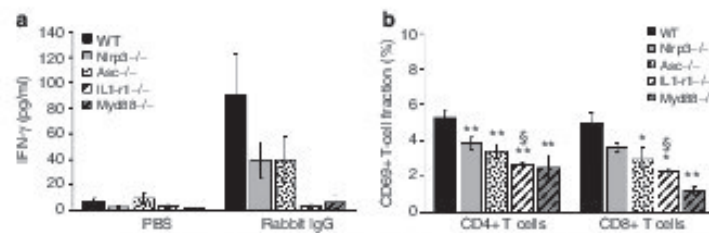


Figure 8 | Cellular immune responses in wild-type (WT), *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-}, *Il-1r1*^{-/-}, and *Myd88*^{-/-} mice during nephrotoxic serum nephritis (NTN). (a) Splenocytes were prepared from mice on day 21 of NTN and incubated with phosphate-buffered saline (PBS) or rabbit immunoglobulin G (IgG) *in vitro*. After 72 h, interferon (IFN)- γ was measured in the supernatant by enzyme-linked immunosorbent assay as a marker of rabbit IgG-induced T-cell activation. (b) The fraction of activated CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells in splenocyte cultures 72 h after restimulation with rabbit IgG *in vitro* was determined by flow cytometric analysis of CD69 surface expression. Data represent mean \pm s.e.m. of 6–8 mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with WT; $\dagger P < 0.05$ compared with *Nlrp3*-deficient, but not *Asc*-deficient mice (the Kruskal–Wallis test followed by pairwise Mann–Whitney U-tests).

autologous antibody titers resulted most likely from reduced proteinuria and reduced urinary loss of IgG, as similar to the anti-rabbit antibody titers total serum IgG levels were higher in *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-}, and *Il-1r1*^{-/-} mice (Figure 7b). In contrast, serum levels of IgM, which is not substantially lost in the urine due to its larger size, were not significantly different (Figure 7c). Taken together, these results demonstrate that local and systemic humoral immune responses to the nephritogenic antigen remained intact in *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} mice.

***Nlrp3* and *Asc* deficiency attenuated systemic T-cell immune responses to the nephritogenic antigen**

To analyze potential systemic alterations of adaptive cellular immune responses to the nephritogenic rabbit IgG, splenocytes isolated from nephritic mice on day 21 of NTN were reexposed to rabbit IgG *in vitro*. There was a reduced interferon- γ production in *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} mice, which was completely abrogated in mice lacking IL-1R1 or MyD88 (Figure 8a). Moreover, flow cytometry revealed a reduced fraction of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells after re-challenge of splenocyte preparations isolated from nephritic *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} mice with rabbit IgG (Figure 8b). T-cell activation was also reduced in *Il-1r1*^{-/-} and *Myd88*^{-/-} deficient strains (Figure 8b). Together, these data reveal a defect in systemic T-cell responses in *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} mice with NTN.

As antigen-specific T-cell activation is dependent on DCs, we further investigated the phenotype of DCs in *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} mice with NTN. Flow cytometry demonstrated a reduced surface expression of some activation markers and co-stimulatory molecules in CD11c⁺ DCs isolated from the kidneys and spleens of nephritic *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} mice (Figure 9a and b). These data are consistent with the reduced activation of renal DCs in *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} mice as suggested by decreased mRNA expression of pro-IL-1 β and TNF (Figure 6b). Thus, the attenuated pro-inflammatory phenotype of *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} DCs, independently of their

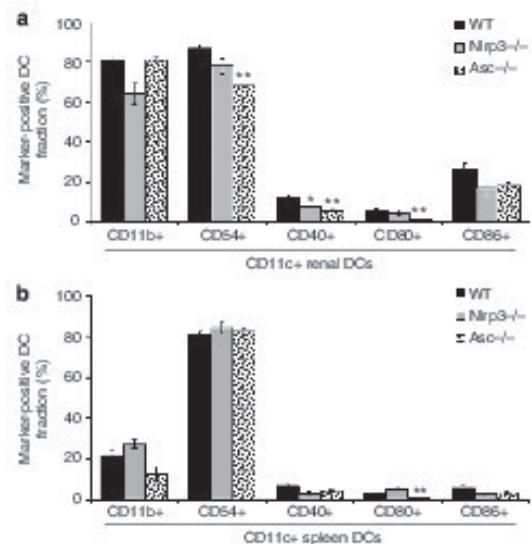


Figure 9 | Surface expression of activation markers and co-stimulatory molecules in renal and splenic dendritic cells (DCs) of wild-type (WT), *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} mice on day 21 of nephrotoxic serum nephritis (NTN). (a) Renal single-cell suspensions were prepared from nephritic kidneys with NTN. DC-like mononuclear phagocytes were identified as CD45⁺CD11c⁺ cells. In addition, the expression of surface markers (CD11b, CD54) and co-stimulatory molecules (CD40, CD80, CD86) or respective isotype controls was analyzed. For each surface protein, the fraction of positive CD11c⁺ cells is shown. Despite similar reductions of renal DC infiltrates in *Nlrp3*^{-/-} and *Asc*^{-/-} mice (Figure 4a), surface expression of activation markers was more prominently reduced in *Asc*-deficient mice. (b) In spleen DCs isolated from nephritic mice on day 21 of NTN, only CD80 surface expression was significantly reduced in *Asc*-deficient mice. Data represent mean \pm s.e.m. of five mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with WT (the Kruskal–Wallis test followed by pairwise Mann–Whitney U-tests).

capability to secrete mature IL-1 β , may reduce stimulation of nephritogenic T cells and contribute to attenuated renal injury in NTN.

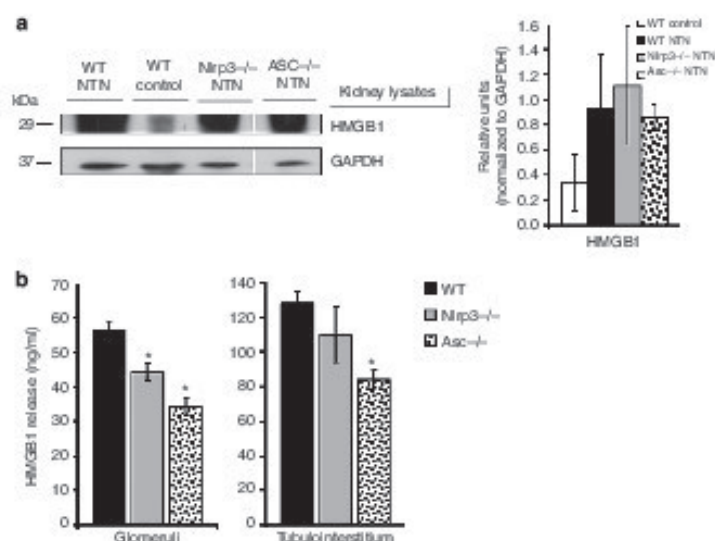


Figure 10 | Renal high-mobility group box 1 (HMGB1) expression and extracellular release in wild-type (WT), *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice. (a) Induced renal expression of HMGB1 protein in nephritic WT, *Nlrp3*-, and *Asc*-deficient mice on day 21 of nephrotoxic serum nephritis, as revealed by immunoblotting. Data represent mean \pm s.e.m. (b) Release of HMGB1 into the supernatant of isolated glomeruli and tubulointerstitial tissue fractions is attenuated in *Nlrp3*- and *Asc*-deficient glomeruli and *Asc*-deficient tubulointerstitial cells compared with WT. Tissue fractions were prepared from WT, *Nlrp3*-, and *Asc*-deficient kidneys as described in Material and Methods. Data represent mean \pm s.e.m. of three mice per group. * $P < 0.05$ compared with nephritic WT (the Kruskal-Wallis test followed by pairwise Mann-Whitney *U*-tests). GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

NLRP3 and ASC contribute to glomerular release of pro-inflammatory high-mobility group box 1 (HMGB1)

An inflammasome-independent role for NLRP3 has been demonstrated in mediating release of HMGB1 protein in activated macrophages.³⁶ Extracellular HMGB1 is a potent inducer of pro-inflammatory effects, and has been implicated in the pathogenesis of several renal diseases.^{27,28} Compared with normal wild-type kidneys, protein expression of HMGB1 increased in nephritic kidneys of wild-type, *Nlrp3*-, and *Asc*-deficient mice (Figure 10a). However, pro-inflammatory release of HMGB1 into the culture supernatant significantly decreased in glomeruli isolated from *Nlrp3*- and *Asc*-deficient mice and in tubulointerstitial tissue of *Asc*-deficient kidneys (Figure 10b). Together, these data suggest that the NLRP3/ASC inflammasome additionally contributes to glomerular inflammation by promoting local HMGB1 release, independent of canonical inflammasome signaling and IL-1 β secretion.

DISCUSSION

IL-1 β is a pro-inflammatory mediator of immune complex GN.^{4,6} Analysis of bone marrow-chimeric mice demonstrated that leukocyte-derived IL-1 β interacted with intrinsic renal cell-expressed IL-1R1 to promote glomerular injury in T-cell-dependent autologous NTN.⁶ In mononuclear phagocytes, such as DCs and macrophages, secretion of mature IL-1 β

depends on the inflammasome cleaving pro-IL-1 β .^{7,8} Thus, we hypothesized that components of IL-1 β -activating inflammasomes such as NLRP3 and ASC have a pathogenic role in immune complex GN. Here, we show that *Nlrp3* and *Asc* deficiency attenuated autologous NTN. Consistent with an inflammasome-dependent role of ASC, production of mature IL-1 β was abrogated in *Asc*-deficient mice with autologous NTN. In contrast, an IL-1 β -independent non-canonical function of NLRP3 was identified, which could involve NLRP3/ASC-mediated release of pro-inflammatory HMGB1 in nephritic kidneys. With the functional contribution of the NLRP3/ASC/IL-1 β axis to tubulointerstitial disease being well established,^{10–14} our data now demonstrate for the first time a pro-inflammatory function of NLRP3 and ASC in glomerular disease.

We show an induced renal mRNA expression of NLRP3/ASC inflammasome components, particularly in renal DCs, together with a substantial production of mature IL-1 β in nephritic kidneys during autologous NTN. Together with the reported dependence of NTN on leukocyte-derived, but not on parenchymal renal cell-derived IL-1 β production,⁶ our data strongly suggest that ASC-dependent maturation of IL-1 β in renal phagocytes such as CD11c⁺ DCs promotes renal injury, expression of inflammatory mediators, and renal leukocyte infiltration during autologous NTN. *Asc* deficiency without significant renal IL-1 β secretion was also associated

with reduced activation of renal and splenic DCs and decreased T-cell responsiveness to the nephritogenic antigen. As previous studies demonstrated that IL-1 β acts principally via IL-1R1 on intrinsic renal cells to induce GN,⁶ the attenuated local inflammation in the kidney likely triggers reduced DC activation and systemic cellular immune responses in *Asc*-deficient mice. However, IL-1 β acting directly on CD4 T cells can enhance their antigen-driven expansion and differentiation.²⁹ IL-1 β also contributes to the differentiation of T helper type 17 cells, which substantially mediate renal tissue injury in GN.^{30,31} As such, abrogated IL-1 β production in *Asc*-deficient DCs may also directly contribute to reduced T-cell responsiveness during NTN. Of note, we did not find an induced mRNA expression of pro-IL-18 in nephritic kidneys during NTN, arguing against a significant pathogenic role of inflammasome-activated IL-18 in the autologous NTN model.

Compared with nephritic wild-type mice, renal expression of cleaved IL-1 α increased in *Asc*-deficient mice. As IL-1R1 is activated by both IL-1 α and IL-1 β , IL-1 α likely contributes to the residual NTN activity in *Asc*-deficient mice compared with the greater protection seen in *Il-1r1*-deficient animals. Consistent with our results, a contribution of IL-1 α to pathology in NTN, particularly to proteinuria and autologous antibody titers, but not to glomerular crescent formation and T-cell infiltration, was suggested in previous studies.⁴ Constitutive expression of cleaved IL-1 α in normal wild-type kidneys, but minimal production in nephritic wild-type and *Nlrp3*-deficient mice, suggests that processing of renal IL-1 α predominantly occurs in the absence of ASC inflammasome-dependent IL-1 β maturation. To this end, it is interesting that caspase-11 interacts with the inflammasome to support IL-1 β activation, but also contributes to inflammasome-independent cleavage of IL-1 α .³² Thus, in the presence of an active ASC-containing inflammasome, caspase-11 may contribute to IL-1 β release, whereas in its absence caspase-11 could preferentially mediate IL-1 α cleavage.

In contrast to *Asc*-deficient mice, *Nlrp3* deficiency did not reduce IL-1 β production in nephritic kidneys, despite its similar protective phenotype in autologous NTN. Apparently, renal IL-1 β activation is mediated by other ASC-containing inflammasomes than NLRP3/ASC in autologous NTN. The inflammasome-independent pro-inflammatory role of NLRP3 was unexpected. Interestingly, a noncanonical function of NLRP3 not related to inflammasome signaling and IL-1 β release was suggested previously in renal ischemia/reperfusion injury.^{10,11} NLRP3 was also reported to facilitate release of pro-inflammatory HMGB1 from activated macrophages and DCs via inflammasome-independent pathways.³⁶ Nuclear HMGB1 can be actively secreted by stimulated cells or released during cell death. Secreted HMGB1 serves as a danger signal and elicits strong pro-inflammatory effects via activation of receptor for advanced glycation end products and Toll-like receptors.²⁷ As such, HMGB1 has been implicated in the pathogenesis of a variety of renal diseases.²⁸ We demonstrate an induced expression of HMGB1 protein in

nephritic kidneys with NTN. Importantly, we show reduced HMGB1 release in both *Nlrp3*- and *Asc*-deficient glomeruli. These data suggest that decreased NLRP3-mediated HMGB1 release in glomeruli of *Nlrp3*-deficient mice could contribute to attenuated renal inflammation in autologous NTN independently of inflammasome-mediated IL-1 β maturation. In *Asc*-deficient mice this mechanism may potentiate effects of the abrogated IL-1 β production. In line with a noncanonical role of NLRP3 in autologous NTN, renal expression of several inflammatory mediators, including IL-17 decreased in *Asc*-deficient, but not in *Nlrp3*-deficient mice. IL-1 β can promote differentiation of IL-17-producing T helper type 17 cells.³⁰ Consistently, intact renal and systemic IL-1 β production in *Nlrp3*-deficient mice correlated with preserved IL-17 levels in *Nlrp3*-deficient kidneys.

In summary, we demonstrate an inflammasome-dependent pro-inflammatory role for ASC in immune complex-mediated GN. A similar pro-inflammatory contribution of NLRP3 was not related to canonical NLRP3 inflammasome signaling in an IL-1 β -dependent manner. Noncanonical effects of NLRP3 and ASC, including release of pro-inflammatory HMGB1 may contribute to renal injury in GN. Our data suggest that, in addition to IL-1R1, IL-1 α and the signaling adapter MyD88, the NLRP3/ASC/IL-1 β axis is a potential therapeutic target in T-cell-mediated GN. Blockade of IL-1 β (e.g., with the FDA-approved antagonist anakinra) as well as inhibition of NLRP3 and ASC may be beneficial in GN.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Nlrp3-deficient (*Nlrp3*^{tm1Tacy33}) mice were originally provided by J. Tschopp, Epalinges, Switzerland. These mice were generated by in-frame insertion of the enhanced green fluorescent protein gene at exon 2 of the *Nlrp3* locus.^{33,34} The inserted enhanced green fluorescent protein cassette followed by a SV40 poly(A) tail disrupts endogenous NLRP3 protein expression. We confirmed absence of NLRP3 protein production in nephritic *Nlrp3*-deficient mice by immunoblotting (Supplementary Figure S2 online). Despite absent NLRP3 protein expression, this knock-in strategy leads to residual transcription of endogenous *Nlrp3* mRNA transcripts containing downstream sequences of exons 3 and 4 of the *Nlrp3* gene, which we detected by quantitative reverse transcriptase-PCR (Figure 5d). *Asc*-deficient (*Pycard*^{tm1Vand35}) mice were provided by V. Dixit, Genentech, San Francisco, CA. *C57BL/6*, *Il-1r1*^{-/-} (*Il1r1*^{tm1Bmx}), and *MyD88*^{-/-} (*MyD88*^{tm1Dwb}) mice were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, MA). Transgenic mouse strains were on a C57BL/6 background. All experimental procedures were performed according to the German animal care and ethics legislation and were approved by the local government authorities.

Induction of autologous NTN

NTN was induced in 7–9-week-old male mice essentially as previously described.³⁶ In brief, mice were immunized subcutaneously in both flanks with 20 μ g rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) in Freund complete adjuvant (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany). Three days later, mice were injected intravenously into the tail vein with 150 μ l nephrotoxic

rabbit serum. Spot urine samples were collected at weekly intervals. On day 21, mice were euthanized, peripheral blood was collected by retroorbital bleeding, and both kidneys were harvested for histological analysis, flow cytometry, and mRNA and protein detection.

Functional assessment of renal injury

Albuminuria was quantified by determining the urinary albumin/creatinine ratio ($\mu\text{g}/\text{mg}$) in spot urine samples as described.¹⁵ Serum values for protein, cholesterol, and urea were measured with an Olympus AU-640 autoanalyzer at Synlab.vet (Augsburg, Germany).

Assessment of glomerular and tubulointerstitial injury

Glomerular injury was evaluated on 4- μm formalin-fixed, paraffin-embedded renal sections after immunohistochemical staining with polyclonal rabbit anti-mouse fibrinogen (1:500, Abcam, Cambridge, UK). The extent of glomerular fibrinoid necrosis was quantified with digital image analysis using an area measurement system (ImageJ, NIH, Bethesda, MD). Podocytes were detected by conventional immunofluorescence microscopy staining for nephrin and Wilms tumor antigen-1 as described previously.³⁷ The extent of tubulointerstitial injury was determined on periodic acid-Schiff-stained sections by scoring the severity of four tubulointerstitial damage markers (i.e., dilation, denudation, intraluminal casts, and cell flattening) in a range of 0–3.

Flow cytometry and immunohistochemistry for renal leukocyte infiltrates

Antibody staining of renal single-cell suspensions was performed as previously described.^{36,38} Stained cells were analyzed with a FACS

Calibur flow cytometer and Cellquest software (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). The number of stained leukocytes was expressed as percentage of total renal cells.

For immunohistochemistry, 4- μm paraffin-embedded renal sections were stained with primary antibodies to mononuclear phagocytes (rat anti-mouse ER-HR3, 1:50, BMA Biomedicals, Augst, Switzerland; and rat anti-mouse F4/80, clone CL:A3-1, 1:100; AbD Serotec, Oxford, UK) and CD3⁺ T cells (cross-reactive rat anti-human CD3, 1:100, clone CD3-12; AbD Serotec) as previously described.³⁶ Stained cells were counted in 50 glomeruli per mouse. For tubulointerstitial cell infiltrates, positive staining was quantified in 30 cortical high power fields (magnification, $\times 400$) per mouse using ImageJ. All assessments were performed in a blinded protocol.

Quantitative reverse transcriptase-PCR

Total RNA was extracted from whole kidneys and renal DC isolates using the Invitrogen RNA extraction kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Renal DCs were isolated from NTN kidneys by magnetic bead separation (magnetic-activated cell sorting) using CD11c-MicroBeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative reverse transcriptase-PCR was performed on a Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Germany) using SYBR Green PCR master mix (Invitrogen). All gene expression values were normalized to 18S rRNA. Primers used are listed in Table 1 (all from Metabion, Martinsried, Germany).

Immunoblot analysis

To identify inflammasome activation in total kidney and spleen lysates of nephritic mice with NTN, we determined protein content of pro-IL-1 β /IL-1 β by western blotting as previously described¹⁵

Table 1 | Primers used for real-time qRT-PCR

Gene target	Primer sequence
Pro-IL-1 β	5'-TTCCTTGTCAGTGTCTGAAG-3' (forward), 5'-CACTGTCAAAAGGTGGCATT-3' (reverse)
IL-6	5'-TGATGCACTTGCAGAAACA-3' (forward), 5'-ACGAGAGAAATTTCAATAGGC-3' (reverse)
IL-10	5'-ATCGATTCTCCCTGTGAA-3' (forward), 5'-TGTCAAATTCATTATGGCCT-3' (reverse)
IL-12p35	5'-CATCGATGAGCTGATGAGT-3' (forward), 5'-CAGATAGCCATCACCCTGT-3' (reverse)
IL-17	5'-TCCAGAAAGGCGCTCAGACTA-3' (forward), 5'-TGAGCTTCCAGATCAGAG-3' (reverse)
IL-18	5'-CCAAATCACTTCTCTGGC-3' (forward), 5'-GGCCAAAGTGTCTGATCC-3' (reverse)
TNF	5'-CCACCACGCTCTCTGTCTAC-3' (forward), 5'-AGGCTCTGGGCAATAGAACT-3' (reverse)
IFN- γ	5'-ACAGCAAGGCGAAAGAGAT-3' (forward), 5'-TGAGCTCATTGAATGCTGG-3' (reverse)
TGF- β 1	5'-GGAGGCGCTGGATACCAAC-3' (forward), 5'-CAACCCAGGTCTTCTCTAAA-3' (reverse)
CCL2/MCP-1	5'-CCTGCTGTTCAGATGTC-3' (forward), 5'-ATTGGGATCATCTTGTGGT-3' (reverse)
CCL5/RANTES	5'-CCACTTCTCTCTGGGTGG-3' (forward), 5'-GTGCCACGTCAGAGAT-3' (reverse)
CCL22/MDC	5'-TCTGACCTCAAAATCTGC-3' (forward), 5'-TGGAGTAGCTTCTTCAACCA-3' (reverse)
CXCL10/IP-10	5'-GGCTGGTCACTTTCAGAA-3' (forward), 5'-ATGGATGGACAGCAGAGAGC-3' (reverse)
INO1	5'-TTCGTGTGTGCCAGTGAG-3' (forward), 5'-TGAAGAAACCCCTTGTGCT-3' (reverse)
CD204/MSR-1	5'-CCTCCGTTCCAGGAGAAGTG-3' (forward), 5'-TTTCCCAATCAAAAGCTGA-3' (reverse)
Cathepsin C	5'-CCAAGGCTTGAGATTGTG-3' (forward), 5'-CCACCCAGTCATGGTCTCAT-3' (reverse)
Cathepsin G	5'-CTCTCTGTCTCTGTGACC-3' (forward), 5'-CCCTTCTGGACTCTGGATCA-3' (reverse)
FOXp3	5'-TTCATGCATCAGCTCTCCAC-3' (forward), 5'-CTGGACCCCATTCAGAGT-3' (reverse)
NLRP3	5'-AGAAGAGACACGGCAGAG-3' (forward), 5'-CCTTGGACAGGTTCAGTGT-3' (reverse)
ASC	5'-GAGCAGCTGCAAAAGACTAA-3' (forward), 5'-GCTGGTCCAAAGTGTCT-3' (reverse)
Pro-Caspase-1	5'-TCAGCTCCATCAGCTGAAC-3' (forward), 5'-TGGAAATGTGCCATCTCTT-3' (reverse)
NLRP1b	5'-GACTTTTGGCTTGTGAATGC-3' (forward), 5'-CATTTAGCTGACGCTAGCTCTCT-3' (reverse)
NLRP12	5'-AGCGTGGTATATCCCTCGAAGA-3' (forward), 5'-CCCTGAGCATCATGGAAGAA-3' (reverse)
NGAL	5'-AATGTCACCTCCATCTGGT-3' (forward), 5'-ATTCCACAGTGAAGTGGC-3' (reverse)

Abbreviations: ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; CCL, C-C motif chemokine ligand; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; FOXp3, forkhead box P3; IFN, interferon; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IP-10, interferon gamma-induced protein 10; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MDC, macrophage-derived chemokine; MSR-1, macrophage scavenger receptor 1; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NLRP3, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; qRT-PCR, quantitative reverse transcriptase-PCR; RANTES, regulated and normal T cell expressed and secreted; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor.

using polyclonal rabbit anti-IL-1 β (Cell Signaling, Danvers, MA) antibodies. Renal expression of NLRP3 protein and cleaved IL-1 α was detected with a mouse anti-NLRP3 antibody (clone Cryo-2; Adipogen, San Diego, CA) and polyclonal rabbit anti-IL-1 α (Abcam), respectively. HMGB1 protein expression was analyzed with a polyclonal rabbit anti-human antiserum (Cell Signaling). To demonstrate HMGB1 release in glomeruli and tubulointerstitial tissue, tissue compartments were isolated from wild-type, *Nlrp3*^{-/-}, and *Asc*-deficient mice applying a magnetic bead-based isolation method as previously described.³⁸ Culture supernatants of separated tissue fractions were collected for HMGB1 analysis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; IBL International, Hamburg, Germany) after 6 h.

Antibody and T-cell immune responses

Autologous mouse anti-rabbit IgG serum levels were measured by ELISA as previously described.³⁶ For quantification of total mouse IgG and IgM in serum, ELISA kits from Bethyl Laboratories (Montgomery, TX) were used. Glomerular deposition of mouse anti-rabbit IgG was assessed by immunohistochemistry on paraffin-embedded sections using a goat anti-mouse IgG antibody (clone BA-9200, 1:400, Vector, Burlingame, CA) with subsequent analysis of positive staining in 15 glomeruli per mouse by ImageJ. Glomerular complement deposition was quantitated after immunofluorescence staining with a PE-conjugated goat anti-mouse C3d antibody (1:400, R&D Biosystems, Minneapolis, MN).

To characterize systemic T-cell immune responses to the nephritogenic rabbit IgG, splenocytes of nephritic mice isolated on day 21 of NTN were rechallenged with 20 μ g/ml rabbit IgG for 72 h. Supernatants were assayed for interferon- γ by ELISA (OptEIA, BD Biosciences). CD4⁺ and CD8⁺ T-cell activation was determined by flow cytometry detecting CD69 surface expression (PE-conjugated hamster anti-mouse CD69; clone H1.2F3; BD Biosciences) as marker for activated T cells. Activation of renal and splenic DCs during NTN was analyzed by flow cytometric detection of surface markers (CD11b, CD54) and co-stimulatory molecules (CD40, CD80, CD86) as previously described.³⁸

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm s.e.m. Comparison of groups was performed using the two-sided nonparametric Mann-Whitney *U*-test. When more than two experimental groups were compared, the Kruskal-Wallis test was applied followed by pairwise Mann-Whitney *U*-tests. To measure the strength of association between numbers of renal F4/80⁺ phagocytes and albuminuria, the Spearman rank-order correlation test was used. Significance was assigned to $P < 0.05$.

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

The expert technical assistance of Dan Draganovici and Jana Mandelbaum is gratefully acknowledged. We also thank Monika Hofstetter for providing advice in immunoblotting and Henning Konetzko for his support in digital image analysis. We are thankful to Dr Daniel Muruve, Department of Medicine, University of Calgary, Canada for providing *Nlrp3*-deficient mice originally created in the laboratory of J. Tschopp, Epalinges, Switzerland and to Vishva Dixit, Genentech, San Francisco, USA for providing *Asc*-deficient mice. Portions of this work were prepared by KA as part of her doctoral

thesis at the Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. Increased protein expression of cleaved IL-1 α in *Asc*-deficient, but not wildtype and *Nlrp3*-deficient mice with NTN.

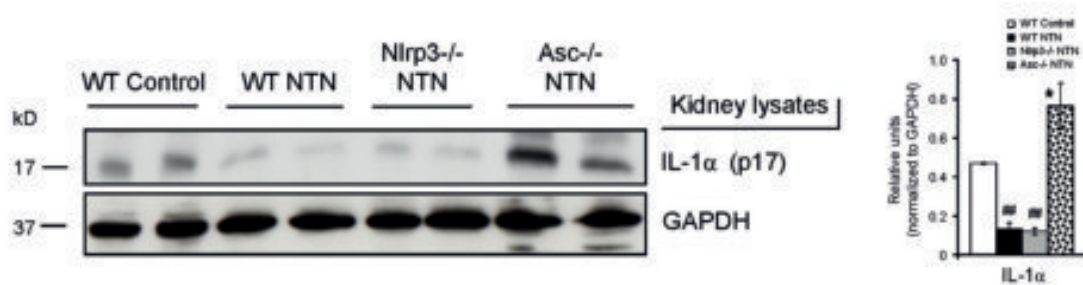
Figure S2. Lack of NLRP3 protein expression in *Nlrp3*-deficient mice with NTN.

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/ki>

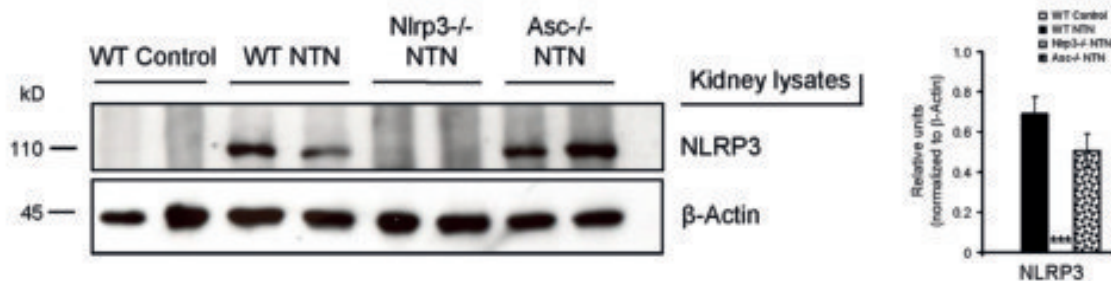
REFERENCES

- Kurts C, Heymann F, Lukas-Kornek V et al. Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology. *Semin Immunopathol* 2007; **29**: 317–335.
- Kurts C, Parzer U, Anders HJ et al. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**: 738–753.
- Timoshenko JR, Sedgwick JD, Holdsworth SR et al. Intrinsic renal cells are the major source of tumor necrosis factor contributing to renal injury in murine crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 1785–1793.
- Timoshenko JR, Kitching AR, Iwakura Y et al. Contributions of IL-1 β and IL-1 α to crescentic glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 910–918.
- Tipping PG, Holdsworth SR. Cytokines in glomerulonephritis. *Semin Nephrol* 2007; **27**: 275–285.
- Timoshenko JR, Kitching AR, Iwakura Y et al. Leukocyte-derived interleukin-1 β interacts with renal interleukin-1 receptor I to promote renal tumor necrosis factor and glomerular injury in murine crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2004; **164**: 1967–1977.
- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; **140**: 821–832.
- Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol* 2012; **13**: 325–332.
- Anders HJ, Muruve DA. The inflammasomes in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; **22**: 1007–1018.
- Iyer SS, Pulsifers WP, Sadler JJ et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 20388–20393.
- Shigeoka AA, Mueller JL, Kambo A et al. An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 2010; **185**: 6277–6285.
- Waysane A, Chun J, Seaman ME et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 1732–1744.
- Mulay SR, Kulkarni OP, Rupanagudi KV et al. Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1 β secretion. *J Clin Invest* 2013; **123**: 236–246.
- Knauff F, Asplin JR, Ganja I et al. NALP3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy. *Kidney Int* 2013; **84**: 895–901.
- Uchtmann J, Kulkarni OP, Mulay SR et al. Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1. *PLoS One* 2011; **6**: e26778.
- Hochheiser K, Engel DR, Hammett L et al. Kidney dendritic cells become pathogenic during crescentic glomerulonephritis with proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2011; **22**: 306–316.
- Teteris SA, Engel DR, Kurts C. Homeostatic and pathogenic role of renal dendritic cells. *Kidney Int* 2011; **80**: 139–145.
- Brown HJ, Sacks SH, Robson MG. Toll-like receptor 2 agonists exacerbate accelerated nephrotic nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 1931–1939.
- Fu Y, Xie C, Chan J et al. Innate stimuli accentuate end-organ damage by nephrotic antibodies via Fc receptor and TLR stimulation and IL-1/TNF- α production. *J Immunol* 2006; **176**: 632–639.
- Paust HJ, Turner JE, Steinmetz OM et al. The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 969–979.
- Cash H, Rellie M, Menke J et al. Interleukin 6 (IL-6) deficiency delays lupus nephritis in MRL-Faspr mice: the IL-6 pathway as a new therapeutic target in treatment of autoimmune kidney disease in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2010; **37**: 60–70.
- Lloyd CM, Minto AW, Doi ME et al. RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in

- crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* 1997; **185**: 1371-1380.
23. Tesch GH, Schwarting A, Kinoshita K et al. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *J Clin Invest* 1999; **103**: 73-80.
 24. Rosenkranz AR, Knight S, Sethi S et al. Regulatory interactions of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in glomerulonephritis. *Kidney Int* 2000; **58**: 1055-1066.
 25. Rosenkranz AR, Mendrick DL, Coran RS et al. P-selectin deficiency exacerbates experimental glomerulonephritis: a protective role for endothelial P-selectin in inflammation. *J Clin Invest* 1999; **103**: 649-659.
 26. Willingham SB, Allen IC, Bergstralh DT et al. NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 2009; **183**: 2008-2015.
 27. Scaffidi P, Mistl T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; **418**: 191-195.
 28. Zhu P, Xie L, Ding HS et al. High mobility group box 1 and kidney diseases (Review). *Int J Mol Med* 2013; **31**: 763-768.
 29. Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Qiu L et al. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 7119-7124.
 30. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 2009; **30**: 576-587.
 31. Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM et al. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int* 2010; **77**: 1070-1075.
 32. Viganò E, Montellaro A. Caspase-11: the driving factor for noncanonical inflammasomes. *Eur J Immunol* 2013; **43**: 2240-2245.
 33. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; **440**: 237-241.
 34. Guarda G, Zenger M, Yazdi AS et al. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J Immunol* 2011; **186**: 2529-2534.
 35. Mariathasan S, Newton K, Monack DM et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 2004; **430**: 213-218.
 36. Vidhauer V, Allam R, Lindenmeyer MT et al. Efficient renal recruitment of macrophages and T cells in mice lacking the duffy antigen/receptor for chemokines. *Am J Pathol* 2009; **175**: 119-131.
 37. Ryu M, Muly SR, Miosge N et al. Tumour necrosis factor- α drives Alport glomerulosclerosis in mice by promoting podocyte apoptosis. *J Pathol* 2012; **226**: 120-131.
 38. Schwarz M, Taubitz A, Elrich N et al. Analysis of TNF-mediated recruitment and activation of glomerular dendritic cells in mouse kidneys by compartment-specific flow cytometry. *Kidney Int* 2013; **84**: 116-129.



Supplementary Figure S1 | Increased protein expression of cleaved IL-1 α in *Asc*-deficient, but not wildtype and *Nlrp3*-deficient mice with NTN. IL-1 α immunoblotting revealed a constitutive protein expression of cleaved mature IL-1 α in normal wildtype mice, which increased in nephritic *Asc*-deficient mice. In contrast, cleaved IL-1 α expression decreased in nephritic wildtype and *Nlrp3*-deficient mice compared to normal wildtype controls. * $p < 0.05$ compared to nephritic wildtype; ## $p < 0.01$ compared to normal wildtype controls (Kruskal-Wallis test followed by pairwise Mann-Whitney U tests).



Supplementary Figure S2 | Lack of NLRP3 protein expression in *Nlrp3*-deficient mice with NTN. As expected NLRP3 immunoblotting revealed absent NLRP3 protein expression in nephritic kidneys of *Nlrp3*-deficient mice at day 21 of NTN. Note that NLRP3 protein was also not detectable in normal wildtype mice without NTN. *** $p < 0.001$ compared to nephritic wildtype (Kruskal-Wallis test followed by pairwise Mann-Whitney U tests).

4 Diskussion

IL-1 β ist ein proinflammatorischer Mediator der Immunkomplex-vermittelten GN. Es ist bereits bekannt, dass die Induktion der GN dabei im Wesentlichen über Aktivierung des IL-1R1 erfolgt, der auf intrinsischen renalen Zellen exprimiert wird [86, 87]. Des Weiteren zeigte eine NTN Induktion in Knochenmark-Chimeren im Mausmodell, dass von Leukozyten gebildetes IL-1 β den auf intrinsischen Nierenzellen exprimierten IL-1R1 aktiviert und hierdurch zur Entwicklung des glomerulären Schadens beiträgt [87]. Auf Grund dessen lässt sich postulieren, dass bei der Entstehung und Progression der NTN leukozytär exprimiertes IL-1 β eine entscheidende pathophysiologische Rolle spielt.

In Modellen der Ureterobstruktion, Ischämie-Reperfusion und späten autologen NTN wurden renale rDCs als eine Zellgruppe identifiziert, die durch Produktion und Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen zur entzündlichen Nierenschädigung beiträgt [14, 15, 24]. Die Prozessierung und Sekretion von aktivem IL-1 β in mononukleären Phagozyten wie DCs und Makrophagen hängt unter anderem von Caspase-1 ab, deren Aktivierung wiederum Inflammasom-vermittelt ist [18, 76]. In vitro-Untersuchungen an primären Nierenzellisolaten von Mulay et al. konnten zeigen, dass eine Stimulation des Nlrp3-Inflammasoms durch LPS und ATP oder Oxalatkristalle zu einer IL-1 β -Sezernierung führt. Untersuchungen der einzelnen Nierenkompartimente und der darin enthaltenen immunologisch aktiven Zellen belegte, dass die Prozessierung und Freisetzung von IL-1 β überwiegend durch DCs, nicht aber durch renale Parenchymzellen erfolgte [63]. Zu den pathophysiologisch relevanten Phagozyten im autologen NTN Ver-

4 Diskussion

lauf sind vor allem CD11c-positive DCs zu zählen [24, 84]. Die Untersuchungen von Hochreiser et al. zeigen zudem, dass eine Depletion von rDCs im NTN-Modell in der späteren autologen Phase der NTN zu einer verminderten Infiltration von T-Zellen und Makrophagen führt. Damit wurde eine proinflammatorische Rolle von rDCs in diesem Modell nachgewiesen. Außerdem konnte einer Verbesserung hinsichtlich der Ausbildung von Halbmonden an den Glomeruli nachgewiesen werden [24]. Dendritische Zellen, unabhängig davon ob eingewandert oder organständig vermitteln durch die Präsentation bestimmter Oberflächenmoleküle ein Signal zur Differenzierung oder Aktivierung von T-Zellen. Die Induktion des NTN-Modell führt zu einer Th1-Zell vermittelten Immunantwort, die auch kennzeichnend für andere antikörpervermittelte Glomerulonephritiden ist [37]. Für NLRP3 wurde bereits eine proinflammatorische Funktion im Rahmen der renalen Ischämie (IRI) beschrieben. Die Schädigungen die bei IRI auftreten sind jedoch überwiegend auf die tubulären Strukturen beschränkt [29, 79]. Auf Grund dieser Daten wurde in dieser Arbeit die Hypothese untersucht, ob die Inflammasomkomponenten NLRP3 und ASC eine proinflammatorische Rolle bei Immunkomplex-vermittelten chronischen GNs besitzen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine erfolgreiche Induktion der autologen Phase der NTN in C57BL/6 Wildtypieren in dem verwendeten NTN Modell nachgewiesen werden, unter anderem durch eine Proteinurie, Hypoproteinämie und Hypercholesterolämie. Zudem wiesen eine vermehrte Infiltration von CD3-positiven-T-Zellen in die Niere und erhöhte $\text{INF-}\gamma$ Spiegel in lienalem Gewebe auf auf eine regelrechte und für das Modell typische T-Zell-vermittelte Immunantwort im Verlauf der NTN hin. Bei Wildtypieren mit einer induzierten NTN zeigte sich in der späten autologen Phase eine Erhöhung sowohl der renalen Expression von pro-IL- 1β als auch des renal sezernierten aktiven IL- 1β . Ferner war das mRNA-Expressionsmuster der Inflammasomkomponenten NLRP3 und ASC in Zellisolaten von renalen CD11c-positiven DCs signifikant erhöht, verglichen mit Isolaten, in denen die CD11c-positive Zellen entfernt waren. Timoschanko et

4 Diskussion

al. haben in der autologen Phase der NTN die pathophysiologische Rolle von Leukozyten, nicht jedoch von Parenchymzellen auf die Bereitstellung von aktivem IL-1 β beschrieben [87]. Allerdings konnte bis zum Tag 7 kein proinflammatorischer Effekt der IL-1 β aktivierenden Inflammasomkomponenten NLRP3 und ASC nachgewiesen werden [46]. Die beschriebene proinflammatorische Funktion von renalen DCs in späteren Phasen der autologen NTN [24], sowie die in dieser Arbeit im Verlauf der NTN nachgewiesene renale IL-1 β Produktion und die induzierte Expression der Inflammasomkomponenten NLRP3 und ASC bestärkten die Annahme, dass in der autologen Phase der NTN in renalen dendritischen Zellen eine NLRP3-Inflammasom-vermittelte Prozessierung und Sezernierung von IL-1 β abläuft, die zur entzündlichen Nierenschädigung beiträgt. Der in der Literatur beschriebene Einfluss des NLRP3-Inflammasoms auf die Maturierung von IL-18 via Caspase-1 [77] scheint dagegen in der autologen Phase der NTN keine entscheidende Rolle zu spielen, da keine vermehrte Expression von pro-IL-18 in nephritischen NTN-Nieren nachgewiesen werden konnte.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass sowohl Nlrp3- als auch Asc-Defizienz in der autologen Phase der NTN zu einer Verbesserung der Nephritis führen. Fehlen einer der beiden Inflammasomkomponenten führt zu einer Verminderung der Proteinurie, der leukozytären Zellinfiltration (DCs und T-Zellen), einer deutlich verminderten glomerulären Fibrinablagerung und Schädigung sowie einer verringerten Reduktion der Podozyten (WT-1/Nephrin-positive Zellen). Zudem waren in Tieren die defizient für NLRP3 oder ASC waren, proinflammatorische Mediatoren wie Zytokine und Chemokine renal weniger stark exprimiert (z. B. CCL2, CCL5, CXCL10, IL-6, TNF, TGF- β , IFN- γ und iNOS). Gleiches galt in noch ausgeprägterer Form für Il-1r1-defiziente und Myd88-defiziente Mäuse. Die leukozytäre Infiltration in die Nieren steht vermutlich unter dem Einfluss von IL-1 β und IL-12. Beide Zytokine beeinflussen die renale Schädigung, da sie Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation von CD3/CD4 positiven Lymphozyten in Th17-, Th2- und Th1-Zellen haben [5]. IL-17 bildende Th17 Zellen sind in erheblichem Maß an der

4 Diskussion

Zerstörung des renalen Gewebes während einer Glomerulonephritis beteiligt [8, 92]. Eine vermehrte Differenzierung und Infiltration von naiven T-Zellen, bedingt durch vermehrte Produktion und Sekretion chemotaktisch wirkender inflammatorischer Mediatoren wie CCL5, CXCL10 sowie IL-1 β und IL-12 durch leukozytäre Zellen (insbesondere Makrophagen und DCs), kann der Grund für die vermehrte Zellinfiltration in den untersuchten Wildtyptieren sein, verglichen mit Nlrp3-, Asc-, oder IL-1r1-defizienten Tieren. Zudem war die renale mRNA-Expression der Inducible Nitric Oxidase Synthetase (iNOS) in den Wildtyptieren verglichen mit den oben genannten defizienten Linien stark erhöht. Inducible NOS hat Einfluss auf die zelluläre Immunantwort, sie induziert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, TNF- α und INF- γ und ist an der Aktivierung von K⁺-Kanälen beteiligt [21].

Übereinstimmend mit der Inflammasom-abhängigen IL-1 β -Prozessierung war die renale und lienale Produktion von aktivem IL-1 β in der Gruppe der Asc-defizienten Tiere im Verlauf der NTN deutlich vermindert. Die Annahme, dass in der autologen Phase der NTN eine ASC-abhängige IL-1 β -Prozessierung eine funktionelle Rolle spielt wird hierdurch gestärkt. Zusätzlich führte das Fehlen von ASC zu einer reduzierten Aktivierung renaler und lienaler DCs sowie zu einer verminderten T-Zell-Aktivierung und lienaler INF- γ -Sekernierung nach Restimulation mit polyklonalem IgG des nephrotoxischen Kaninchenserums, dass das initial im Glomerulus abgelagerte nephritogene Antigen darstellt. Die mögliche Erklärung für die abgeschwächte lokale Entzündung in Nieren Asc-defizienter Tiere kann daher einerseits Folge der lokal verminderten Inflammasom-abhängigen IL-1 β -Produktion vor allem in renalen DCs sein. Zusätzlich könnte eine reduzierte DC-Aktivierung zu einer verringerten T-zellulären Immunantwort gegenüber dem im Glomerulus abgelagerten nephritogenen Antigen führen. Die reduzierte Aktivierung der DCs in Asc-defizienten Tieren konnte durch eine verminderte Expression von CD40, CD80 und CD86 in Zellisolaten CD11c positiver Zellen belegt werden. Für CD40, CD80 und CD86 wurde bereits beschrieben, dass eine vermehrte Oberflächenexpression auf

4 Diskussion

Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), zu denen auch DCs zählen, zu einer Verstärkung der renalen Schädigung im Rahmen der NTN führt [14, 15]. Die geringere Anzahl dieser Moleküle sowie eine verminderte renale mRNA Expression von IL-12 und pro-IL-1, wie sie bei Asc-defizienten Tieren in der autologen Phase der NTN auftritt, könnte zu einer abgeschwächten Aktivierung und Differenzierung naiver T-Helfer Zellen in Th1-Zellen führen. Th1-Zellen stellen, wie bereits beschrieben, einen elementaren Teil der T-zellulären Immunantwort im Rahmen der NTN dar [28, 90]. Die verminderte Anzahl von Th1-Zellen kann ein Grund für die verminderte Nierenschädigung bei Asc-defizienten Tieren in der autologen Phase der NTN sein.

Das Fehlen von NLRP3 führte bei Mäusen in einem Modell für tubulointerstitielle Nierenschädigung zu einer vollständigen Protektion [38]. Dies konnte in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Nlrp3-Defizienz führte zwar zu einer Verbesserung hinsichtlich der funktionellen Parameter, der Zellinfiltration und den pathologischen Veränderung der Niere, diese waren aber nicht so deutlich ausgeprägt wie bei Asc-, Il-1r1- oder Myd88-defizienten Tieren. Zudem stellte sich die Frage, warum eine IL-1 β -Produktion in Nieren der Nlrp3-defizienten Tiere, im Gegensatz zu Asc-defizienten Tieren, weiterhin vorlag. Offenbar ist im Verlauf der NTN die Bildung des pathophysiologisch wirksamen IL1- β von ASC-enthaltenden Inflammasomen beeinflusst, nicht jedoch ausschließlich vom NLRP3-Inflammasom abhängig. Es ist möglich, dass andere Inflammasom-Komplexe wie zum Beispiel das NLRP1-Inflammasom, dessen renale Expression ebenfalls während der autologen NTN induziert ist, eine Rolle spielen. Der abgeschwächte Verlauf der NTN in Nlrp3-defizienten Mäusen bei erhaltener IL-1 β -Produktion legt nahe, dass IL1- β -unabhängige nicht kanonische Effekte der NLRP3-Inflammasomkomponenten zur renalen Schädigung während der NTN beitragen. Die Inflammasom-unabhängige proinflammatorische Rolle von NLRP3 war unerwartet und bedurfte weiterer Untersuchung.

Der proinflammatorischen Mediator HMGB-1 wird durch aktivierte Makrophagen und

4 Diskussion

DCs freigesetzt [102]. In den durchgeführten Untersuchungen konnten eine IL-1 β unabhängige Funktion von NLRP3 nachgewiesen werden, die zu einer Freisetzung von proinflammatorischem HMGB-1 in nephritischen Nieren beiträgt. Die Freisetzung von HMGB-1 aus aktivierten Makrophagen und DCs kann durch NLRP3 vermittelt werden, wobei dieser Mechanismus auch Inflammasom unabhängig sein kann [98]. Nukleäres HMGB-1 kann durch proinflammatorisch stimulierte Zellen oder durch den Zelltod in seiner aktiven Form freigesetzt werden. Extrazelluläres HMGB-1 fungiert als DAMP und führt zu starken proinflammatorischen Effekten, die über die Aktivierung von RA-GE und TLRs vermittelt werden [75]. Für HMGB-1 wurde nachgewiesen, dass es an der Pathogenese einer Vielzahl von Nierenerkrankungen beteiligt ist, wie zum Beispiel Glomerulonephritiden, Lupusnephritis, diabetische Nephropathie oder bei akuten Nierenerkrankungen [102]. In der vorliegenden Arbeit konnte auch im Modell der autologen NTN gezeigt werden, dass im renalen Gewebe von Nlrp3-defizienten Mäusen eine verminderte HMGB-1-Freisetzung vorliegt, was die renale Inflammation im Modell der autologen NTN, unabhängig von einer kanonischen Inflammasom-vermittelten IL-1 β Prozessierung, mildern könnte. Wichtig zu erwähnen bleibt, dass in den durchgeführten Untersuchungen nicht nur in Nlrp3-defizienten, sondern auch in Asc-defizienten Nierengewebe eine Reduktion der HMGB-1-Freisetzung nachweisbar war. Dies könnte die teilweise ausgeprägtere Abschwächung der NTN in Mäusen mit einer Defizienz für ASC erklären. Konsistent mit Inflammasom- und IL-1 β -unabhängigen Effekten von NLRP3 in der autologen NTN war auch die erhaltene renale Expression einiger inflammatorischer Mediatoren, darunter IL-17, in Nlrp3-defizienten Mäusen mit NTN. Nur in Asc nicht aber in Nlrp3-defizienten Tieren war die IL-17 mRNA Expression vermindert. IL-1 β kann die Differenzierung, der naiven T-Zellen in IL-17-produzierende Th17- Zellen unterstützen [8]. Übereinstimmend mit der erhaltenen renalen IL-1 β -Produktion zeigte sich eine unverändert hohe IL-17 Expression in nephritischen Nlrp3-defizienten Nieren.

Nicht nur IL-1 β , sondern auch IL-1 α bindet an den IL-1R1 und kann dadurch zur

4 Diskussion

Progression der Nierenschädigung während der autologen Phase der NTN beitragen. Zudem kann die Freisetzung von IL-1 α auch durch Inflammasom-aktivierte Caspase-1 vermittelt werden [1, 22, 39, 53, 62]. Untersuchungen an IL-1 β -defizienten Tieren mit einer induzierten NTN zeigten eine verringerte Proteinurie, verminderte autologe Antikörpertiter, eine Reduktion der Anzahl glomerulärer Halbmonde (Crescents) und einen Rückgang der T-Zell Infiltration. Jedoch waren diese Parameter nicht so ausgeprägt verbessert wie bei IL-1 α -defizienten Tieren [86]. Dadurch lässt sich postulieren, dass die Induktion und Progression der NTN sowohl durch IL-1 α als auch durch IL-1 β vermittelt ist. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass prozessiertes IL-1 α in deutlich größerer Menge in nephritischen Nieren von Asc-defizienten Tieren, verglichen mit Wildtyp-tieren und Tieren mit einer Defizienz für Nlrp3, nachweisbar war. Diese Tatsache könnte eine Erklärung für die verbliebene NTN Aktivität in Asc-defizienten Tieren sein, im Vergleich zu IL-1 α -defizienten Tieren. Konsistent mit den vorliegenden Ergebnissen wiesen frühere Untersuchungen in IL-1 α - und IL-1 β -defizienten Tieren mit induzierter NTN eine IL-1 α Beteiligung hinsichtlich der Proteinurie und der Bildung von autologen Antikörpern nach. Jedoch konnte keine funktionelle Beteiligung von IL-1 α bei der glomerulären Halbmondbildung und der renalen T-Zell Infiltration gezeigt werden [86]. Die vorhandene Expression von IL-1 α in Asc-defizienten Nieren verglichen mit der minimalen Expression in Nieren von Wildtyp-tieren oder Nlrp3-defizienten Tieren mit NTN legt den Schluss nahe, dass die Expression von IL-1 α überwiegend dann einsetzt, wenn keine durch ASC vermittelte IL-1 β -Produktion vorhanden ist. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Caspase-11 mit Inflammasomen interagiert und dadurch die IL-1 β Aktivierung unterstützt, andererseits jedoch auch an einer Inflammasom-unabhängigen Prozessierung von IL-1 α beteiligt ist [94]. Bei Vorhandensein eines ASC beinhaltenden Inflammasoms könnte Caspase-11 die Freisetzung von IL-1 β hervorrufen, wohingegen beim Fehlen eines solchen Inflammasoms, wie in naiven Wildtyp-tieren ohne Stimulus für eine Inflammasom-Aggregation und Asc-defiziente Tiere, Caspase-11 die Maturierung von IL-1 α vermitteln könnte. Die konstitutive IL-1 α -Proteinexpression in den Nieren

4 Diskussion

naiver Wildtypiere ohne NTN weist auf eine derartige intrazelluläre Funktionen von IL-1 α hin [13].

Die vorliegenden Ergebnisse können erstmalig belegen, dass ASC durch eine Vermittlung der IL-1 β -Produktion eine Inflammasom-abhängige proinflammatorische Rolle im Verlauf der Immunkomplex-vermittelten GN besitzt. Jedoch konnte trotz Abschwächung der NTN in Nlrp3-defizienten Mäusen keine gleichartige Beteiligung für NLRP3 im Sinne einer kanonischen Inflammasom-vermittelten IL-1 β Freisetzung während der NTN nachgewiesen werden. Nicht kanonische Effekte von NLRP3 und ASC, wie die Freisetzung von proinflammatorischem HMGB-1 könnten dagegen an der Entstehung und Progression von Immunkomplex-vermittelten GN wie der NTN beteiligt sein. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen weisen darauf hin, dass neben IL-1R1 und dem Adaptermolekül MyD88 auch der NLRP3/ASC/IL-1 β -Signalweg einen potentiellen Ansatzpunkt für eine therapeutische Intervention im Rahmen der T-Zell vermittelten GN darstellt. Die Blockade von IL-1 β mit Anakinra, einem IL-1 β -Antagonisten, oder alternativ die direkte Inhibition von NLRP3 und ASC könnten erfolgversprechende Therapieansätze sein.

5 Zusammenfassung

Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritiden

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β ist maßgeblich an der renalen Schädigung im Rahmen der Immunkomplex-Glomerulonephritis beteiligt. Für die Spaltung von pro-IL-1 β in seine extrazelluläre sezernierbare Form sind Inflammasome zuständig. Für das NLRP3-Inflammasom, das auf eine Vielzahl endogener Gefahrensignale (DAMPs) reagiert, wurde eine funktionelle Rolle bereits in tubulointerstitiellen Nephropathien gezeigt, wohingegen die Funktion in glomerulären Erkrankungen bis dato nicht geklärt ist. Um zu untersuchen, ob NLRP3 und sein Adaptermolekül ASC am Geschehen der Immunkomplex-vermittelten glomerulären Inflammation beteiligt sind, wurde ein T-Zell-abhängiges autologes NTN Modell induziert. Dies erfolgte in Mäusen mit einer Defizienz der Inflammasomkomponenten NLRP3 (C57BL/6-Nlrp^{3tm1Tsc}) und ASC (C57BL/6-Pycard^{tm1Vmd}). Die renale Expression von NLRP3/ASC Inflammasom-Komponenten und pro-IL-1 β stiegen während der NTN an und waren insbesondere in dendritischen Zellen (DC) vermehrt nachweisbar. Diese Tatsache war assoziiert mit der renalen Produktion von aktivem IL-1 β , was auf die Aktivierung des Inflammasoms hindeutet. Eine Defizienz für Nlrp3 oder Asc verringerte den renalen Schaden signifikant, ebenso die Leukozyteninfiltration und die T-Zell Aktivierung. Übereinstimmend mit einem ASC-abhängigen Verlust der Inflammasom-vermittelten IL-1 β -Aktivierung war die renale und lienale Produktion von aktivem IL-1 β in Asc-defizienten Mäusen vermindert. Überraschenderweise blieb die IL-1 β -Bildung

5 Zusammenfassung

bei Nlrp3-defizienten Tieren unverändert, was auf nicht-kanonische proinflammatorische NLRP3-abhängige Effekte im Modell der NTN hinweist. Ein solcher möglicher Effekt könnte die NLRP3-vermittelte Freisetzung von proinflammatorischem HMGB-1 als ein neuer nicht-kanonischer Mechanismus von NLRP3 und ASC während der Immunkomplex- Glomerulonephritis sein. Auf Grund dessen wäre die Blockade sowohl von NLRP3, als auch von ASC eine möglicher nutzbringender therapeutischer Ansatz im Rahmen der Behandlung von Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritiden.

6 Summary

The influences of the NLRP3-Inflammasome in immune complex glomerulonephritis

The proinflammatory cytokine IL-1 β significantly contributes to renal injury in immune complex glomerulonephritis. Production of mature IL-1 β depends on activation of the inflammasome that cleaves pro-IL-1 β into its secretable form. A functional role of the NLRP3-containing inflammasome, which responds to a variety of endogenous danger signals, has been demonstrated in tubulointerstitial nephrophathies, but its function in glomerular disease remained unknown. To investigate whether NLRP3 and its adapter molecule ASC contributes to immune complex-mediated glomerular inflammation, we induced T-cell dependend autologous nephrotoxic serum nephritis (NTN) in Nlrp3- and Asc-deficient mice. Renal expression of NLRP3/ASC inflammasome components and pro-IL-1 β increased during NTN, and was abundant in renal DCs. This was associated with renal production of mature IL-1 β , indicating activation of the inflammasome. Nlrp3- and Asc-deficiency significantly attenuated glomerular injury, leukocyte infiltration and T-cell activation. Consistent with a loss of ASC-dependent inflammasome-mediated IL-1 β activation, renal and splenic production of mature IL-1 β was abrogated in Asc-deficient mice. Surprisingly, IL-1 β secretion remained intact in Nlrp3-deficient mice indicating noncanonical pro-inflammatory effects of NLRP3 in autologous nephrotoxic serum nephritis. This may include NLRP3-mediated glomerular release of pro-inflammatrory HMGB-1 as a non canonical function of NLRP3 and ASC in glomerulonephritis. Thus, therapeutic blockade of both NLRP3 and ASC may be beneficial in glomerulonephritis.

7 Abkürzungen / Abbildungen

Abkürzungen

APC	Antigen Presentin Cell
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
CARD	Caspase Recruitment Domain
Caspase-1	IL-1 Converting Enzyme
DAMP	Danger Assosciated Molekular Pattern
DC	Dendrititische Zelle
DDF	Death Domain Fold
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GMB	Glomeruläre Basalmembran
GN	Glomerulonephritis
HMGB1	High Mobility Group Box 1 Protein
ICAM1	Intra Cellular Adhesion Molekule 1
ICE	Interleukin Converting Enzyme / Caspase-1
IFN	Interferon

7 Abkürzungen / Abbildungen

IL	Interleukin
IL-1R1	Interleukin-1-Rezeptor1
IL-1R1a	Interleukin-1-Rezeptor-1-Antagonist
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthetase
IRI	Ischemia Reperfusion Injury
kDa	Kilo-Dalton (Maßeinheit für die Proteingröße)
MAK	Membranangriffskomplex
MCP1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88
NFκB	Nuclear-Faktor-kappaB
NK Zelle	Natural Killer Zelle
NLR	NOD-like Rezeptoren / Nucleotide-Binding-Domain-Leucine-Rich-Repeat
NLRP3	NOD-like Receptor Protein 3
NO	Stickstoffmonoxid
NTN	Nephrotoxische Serum Nephritis
PAAD-Familie	Familie von Proteinen die eine Pyrin, AIM, CARD und eine death domain-like aufweisen und als Adaptorprotein fungieren
PAMP	Pathogene Associated Molecule Pattern
PRR	Pattern Recognition Receptors
PYD	Pyrin-Domäne

7 Abkürzungen / Abbildungen

RIG	Retinoic-Acid-Induced-Gene-Like Rezeptor
ROS	Reactive oxigen species
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrose-Faktor
TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein
UUO	Ureterobstruktion
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molekule 1

Abbildungsverzeichnis

2.2.1 NLRP3-Inlammasom-Aktivierung [76]	23
---	----

Literaturverzeichnis

- [1] I.S. Afonina, G.A. Tynan, S.E. Logue, S.P. Cullen, M. Bots, A.U. Luethi, E.P. Reeves, N.G. McElvaney, J.P. Medema, and S.J. Lavelle, E.C. und Martin. Granzyme b-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of il-1alpha. *Mol Cell*, 44:265–278, 2011.
- [2] H.-J. Anders and D.A. Muruve. The inflammasomes in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 22:1007–1018, 2011.
- [3] L. Aravind and Dixit V.M. und Koonin E.V. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.*, 24:47–53, 1999.
- [4] R.C. Atkins, D.J. Nikolic-Paterson, Q. Song, and H.Y. Lan. Modulators of crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 7:2271–2278, 1996.
- [5] S.Z. Ben-Sasson, J. Hu-Li, J. Quiel, S. Cauchetaux, M. Ratner, I. Shapira, C.A. Dinarello, and Paul W.E. Il-1 acts directly on cd4 t cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:7119–7124, 2009.
- [6] J. Bertin and P.S. DiStefano. The pyrin domain: a novel motif found in apoptosis and inflammation proteins. *Cell Death Differ*, 7:1273–1274, 2000.
- [7] G.Y. Chen and G. Nunez. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, 10:826–837, 2010.
- [8] Y. Chung, S.H. Chang, G.J. Martinez, X.O. Yang, R. Nurieva, H.S. Kang, L. Ma,

- S.S. Watowich, A.M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. Critical regulation of early th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, 30:576–587, 2009.
- [9] French F.M.F. Consortium. A candidate gene for familial mediterranean fever. *Nat Genet*, 17:25–31, 1997.
- [10] E. Dahme and E. Weiss. Grundriss der speziellen pathologischen anatomie der haustiere. *Enke*, 2007, 6. Auflage.
- [11] C.A. Dinarello. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci*, 856:1–11, 1998.
- [12] C.A. Dinarello. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*, 16:457–499, 1998.
- [13] C.A. Dinarello. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, 27:519–550, 2009.
- [14] X. Dong, L.A. Bachman, M.N. Miller, K.A. Nath, and M.D. Griffin. Dendritic cells facilitate accumulation of il-17 t cells in the kidney following acute renal obstruction. *Kidney Int*, 74:1294–1309, 2008.
- [15] X. Dong, S. Swaminathan, L. A. Bachman, A. J. Croatt, K. A. Nath, and M. D. Griffin. Resident dendritic cells are the predominant tnf-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*, 71:619–628, 2007.
- [16] S. Ettinger. Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and cat. *Elsevier Saunders*, 2004, 6. edition.
- [17] W.J. Fairbrother, N.C. Gordon, E.W. Humke, K.M. O'Rourke, M.A. Starovasnik, J.P. Yin, and V.M. Dixit. The pyrin domain: a member of the death domain-fold superfamily. *Protein Sci*, 10:1911–1918, 2001.
- [18] L. Franchi, R. Munder, and G. Nunez. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol*, 13:325–332, 2012.
- [19] G. Gobe, D. Willgoss, N. Hogg, E. Schoch, and Z. Endre. Cell survival or death

- in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*, 56:1299–1304, 1999.
- [20] G. Grandaliano, L. Gesualdo, F. Bartoli, E. Ranieri, R. Monno, A. Leggio, G. Paradies, E. Caldarulo, B. Infante, and F.P. Schena. Mcp-1 and egf renal expression and urine excretion in human congenital obstructive nephropathy. *Kidney Int*, 58:182–192, 2000.
- [21] S.J. Green, L.F. Scheller, M.A. Marletta, M.C. Seguin, F.W. Klotz, M. Slayter, B.J. Nelson, and C.A. Nacy. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol Lett*, 43:87–94, 1994.
- [22] O. Gross, C.J. Thomas, G. Guarda, and J. Tschopp. The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev*, 243:136–151, 2011.
- [23] A. Halle, V. Hornung, G.C. Petzold, C.R. Stewart, B. G. Monks, T. Reinheckel, K.A. Fitzgerald, E. Latz, K.J. Moore, and D.T. Golenbock. The nalp3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*, 9(8):857–865, Aug 2008.
- [24] K. Hochheiser, D.R. Engel, L. Hammerich, F. Heymann, P.A. Knolle, U. Panzer, and C. Kurts. Kidney dendritic cells become pathogenic during crescentic glomerulonephritis with proteinuria. *J Am Soc Nephrol*, 22:306–316, 2011.
- [25] H.M. Hoffman, J.L. Mueller, D.H. Broide, A.A. Wanderer, and R.D. Kolodner. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and muckle-wells syndrome. *Nat Genet*, 29:301–305, 2001.
- [26] V. Hornung and E. Latz. Critical functions of priming and lysosomal damage for nlrp3 activation. *Eur J Immunol*, 40:620–623, 2010.
- [27] M. T Huang, D. J Taxman, E. A Holley-Guthrie, C. B Moore, S. B Willingham, V. Madden, R. K Parsons, G. L Featherstone, R. R Arnold, B. P O'Connor, and J. P Ting. Critical role of apoptotic speck protein containing a caspase recruitment

- domain (asc) and nlrp33 in causing necrosis and asc speck formation induced by porphyromonas gingivalis in human cells. *J Immunol*, 182(4):2395–2404, 2009.
- [28] X.R. Huang, P.G. Tipping, L. Shuo, and S.R. Holdsworth. Th1 responsiveness to nephritogenic antigens determines susceptibility to crescentic glomerulonephritis in mice. *Kidney Int*, 51:94–103, 1997.
- [29] S.S. Iyer, W.P. Pulsikens, J.J. Sadler, L.M. Butter, G.J. Teske, T.K. Ulland, S.C. Eisenbarth, S. Florquin, R.A. Flavell, J.C. Leemans, and F.S. Sutterwala. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:20388–20393, 2009.
- [30] C. Jin and R.A. Flavell. Molecular mechanism of nlrp3 inflammasome activation. *J Clin Immunol*, 30:628–631, 2010.
- [31] R. John and P.J. Nelson. Dendritic cells in the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 2007.
- [32] R.J. Johnson. Cytokines, growth factors and renal injury: where do we go now? *Kidney Int Suppl*, 63:S2–S6, 1997.
- [33] D.B. Jones. Glomerulonephritis. *Am J Pathol*, 29:33–51, 1953.
- [34] S.H. Kaufmann and M.O. Hengartner. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol*, 11:526–534, 2001.
- [35] C.F. Kay. The mechanism by which experimental nephritis is produced in rabbits injected with nephrotoxic duck serum. *J Exp Med*, 72:559–572, 1940.
- [36] S. Khare, A. Dorfleutner, N.B. Bryan, C. Yun, A.D. Radian, L. de Almeida, Y. Rojanasakul, and C. Stehlik. An nlrp7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. *Immunity*, 36:464–476, 2012.
- [37] A.R. Kitching, P.G. Tipping, D.A. Mutch, X.R. Huang, and S.R. Holdsworth. Interleukin-4 deficiency enhances th1 responses and crescentic glomerulonephritis in mice. *Kidney Int*, 53:112–118, 1998.
- [38] F. Knauf, J.R. Asplin, I. Granja, I.M. Schmidt, G.W. Moeckel, R.J. David, R.A.

- Flavell, and P.S. Aronson. Nalp3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy. *Kidney Int*, 84:895–901, 2013.
- [39] Y. Kobayashi, K. Yamamoto, T. Saido, H. Kawasaki, J.J. Oppenheim, and K. Matsushima. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:5548–5552, 1990.
- [40] M.J. Kostura, M.J. Tocci, G. Limjuco, J. Chin, P. Cameron, A.G. Hillman, N.A. Chartrain, and J.A. Schmidt. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86:5227–5231, 1989.
- [41] M. Lamkanfi. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat Rev Immunol*, 11:213–220, 2011.
- [42] M. Lamkanfi, L. Sarkar, A. and Vande Walle, A.C. Vitari, A.O. Amer, M.D. Wewers, K.J. Tracey, T.-D. Kanneganti, and V.M. Dixit. Inflammasome-dependent release of the alarmin hmgb1 in endotoxemia. *J Immunol*, 185:4385–4392, 2010.
- [43] T. Lane, B. Flam, R. Lockey, and N. Kolliputi. Txnip shuttling: missing link between oxidative stress and inflammasome activation. *Front Physiol*, 4:50, 2013.
- [44] B. Lange-Sperandio, A. Trautmann, O. Eickelberg, A. Jayachandran, S. Oberle, F. Schmidutz, B. Rodenbeck, M. Hoemme, R. Horuk, and F. Schaefer. Leukocytes induce epithelial to mesenchymal transition after unilateral ureteral obstruction in neonatal mice. *Am J Pathol*, 171:861–871, 2007.
- [45] F. Laudisi, R. Spreafico, M. Evrard, T.R. Hughes, M. Mandriani, B. and Kandasamy, B.P. Morgan, B. Sivasankar, and A. Mortellaro. Cutting edge: The nlrp3 inflammasome links complement-mediated inflammation and il-1beta release. *J Immunol*, 191:1006–1010, 2013.
- [46] J. Lichtnekert, O.P. Kulkarni, S.R. Mulay, K.V. Rupanagudi, M. Ryu, R. Allam, V. Vielhauer, D. Muruve, M.T. Lindenmeyer, C.D. Cohen, and H.-J. Anders.

- Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1. *PloS one*, 6:e26778, 2011.
- [47] F. Lin, D.J. Salant, H. Meyerson, S. Emancipator, B.P. Morgan, and M.E. Medof. Respective roles of decay-accelerating factor and cd59 in circumventing glomerular injury in acute nephrotoxic serum nephritis. *J Immunol*, 2004.
- [48] Y. Liu. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*, 15:1–12, 2004.
- [49] G. Lopez-Castejon, A. Baroja-Mazo, and P. Pelegrin. Novel macrophage polarization model: from gene expression to identification of new anti-inflammatory molecules. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, pages –, 2010.
- [50] G. Lopez-Castejon and D. Brough. Understanding the mechanism of il-1beta secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22:189–195, 2011.
- [51] B. Lu, H. Wang, U. Andersson, and K.J. Tracey. Regulation of hmgb1 release by inflammasomes. *Protein Cell*, 4:163–167, 2013.
- [52] S.J. Martin. Dealing the cards between life and death. *Trends Cell Biol*, 11:188–189, 2001.
- [53] F. Martinon, K. Burns, and J. Tschopp. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proil-beta. *Mol Cell*, 10:417–426, 2002.
- [54] F. Martinon, K. Hofmann, and J. Tschopp. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol*, 11:R118–R120, 2001.
- [55] F. Martinon, A. Mayor, and J. Tschopp. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*, 27:229–265, 2009.

- [56] F. Martinon, V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp. Gout-associated uric acid crystals activate the nalp3 inflammasome. *Nature*, 440:237–241, 2006.
- [57] J. Masumoto, S. Taniguchi, K. Ayukawa, H. Sarvotham, T. Kishino, N. Niikawa, E. Hidaka, T. Katsuyama, T. Higuchi, and J. Sagara. Asc, a novel 22-kda protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia hl-60 cells. *J Biol Chem*, 274:33835–33838, 1999.
- [58] J. Masumoto, S. Taniguchi, J. Nakayama, M. Shiohara, E. Hidaka, T. Katsuyama, S. Murase, and J. Sagara. Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin n-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 49:1269–1275, 2001.
- [59] S.A. Mezzano, M.A. Droguett, M.E. Burgos, L.G. Ardiles, C.A. Aros, I. Caorsi, and J. Egido. Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. *Kidney Int*, 57:147–158, 2000.
- [60] M. Miya, A. Maeshima, K. Mishima, N. Sakurai, H. Ikeuchi, T. Kuroiwa, K. Hiromura, and Y. Nojima. Age-related decline in label-retaining tubular cells: implication for reduced regenerative capacity after injury in the aging kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302:F694–F702, 2012.
- [61] T. Morii, H. Fujita, T. Narita, J. Koshimura, T. Shimotomai, H. Fujishima, N. Yoshioka, H. Imai, M. Kakei, and S. Ito. Increased urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 in proteinuric renal diseases. *Ren Fail*, 25:439–444, 2003.
- [62] B. Mosley, D.L. Urdal, K.S. Prickett, A. Larsen, D. Cosman, P.J. Conlon, S. Gillis, and S.K. Dower. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J Biol Chem*, 262:2941–2944, 1987.
- [63] S.R. Mulay, O.P. Kulkarni, K.V. Rupanagudi, A. Migliorini, M.N. Darisipudi,

- A. Vilaysane, D. Muruve, Y. Shi, F. Munro, H. Liapis, and H.-J. Anders. Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by nlrp3-mediated interleukin-1 beta secretion. *J Clin Invest*, 123(1):236–246, Jan 2013.
- [64] K. Nitta, S. Horita, S. Ogawa, M. Matsumoto, Y. Hara, K. Okano, T. Hayashi, R. Abe, and H. Nihei. Resistance of cd28-deficient mice to autologous phase of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol*, 7:104–112, 2003.
- [65] J.A. Nogueira-Machado, M. Caroline, and V. de Oliveira. Hmgb-1 as a target for inflammation controlling. *Rec Pat Endocr Metabol Imm Drug Discov*, 6:201–209 (9), 2012.
- [66] K. Pawlowski, F. Pio, Z. Chu, J.C. Reed, and A. Godzik. Paad - a new protein domain associated with apoptosis, cancer and autoimmune diseases. *Trends Biochem Sci*, 26:85–87, 2001.
- [67] A. Peired, M.L. Angelotti, E. Ronconi, G. la Marca, B. Mazzinghi, A. Sisti, D. Lombardi, E. Giocaliere, M. Della Bona, F. Villanelli, E. Parente, L. Ballerini, C. Sagninati, N. Wanner, T.B. Huber, H. Liapis, E. Lazzeri, L. Lasagni, and P. Romagnani. Proteinuria impairs podocyte regeneration by sequestering retinoic acid. *J Am Soc Nephrol*, 24:1756–1768, 2013.
- [68] H. Poeck, M. Bscheider, O. Gross, K. Finger, S. Roth, M. Rebsamen, N. Hanneschlaeger, M. Schlee, S. Rothenfusser, W. Barchet, H. Kato, S. Akira, S. Inoue, S. Endres, C. Peschel, G. Hartmann, V. Hornung, and J. Ruland. Recognition of rna virus by rig-i results in activation of card9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol*, 11:63–69, 2010.
- [69] R.J. Quigg. Complement and autoimmune glomerular diseases. *Curr Dir Autoimmun*, 7:165–180, 2004.
- [70] S.D. Ricardo, H. van Goor, and A.A. Eddy. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest*, 118:3522–3530, 2008.

- [71] A.R. Rosenkranz, S. Knight, S. Sethi, S.I. Alexander, R.S. Cotran, and T.N. Mayadas. Regulatory interactions of alphabeta and gammadelta t cells in glomerulonephritis. *Kidney Int*, 58:1055–1066, 2000.
- [72] P. Rovere-Querini, A. Capobianco, P. Scaffidi, B. Valentini, F. Catalanotti, M. Gazzon, I. E. Dumitriu, S. MÄCeller, M. Iannacone, C. Traversari, M.E. Bianchi, and A.A. Manfredi. Hmgb1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep*, 5:825–830, 2004.
- [73] K. Sade, I.F. Schwartz, S. Etkin, S. Schwartzberg, Y. Levo, and S. Kivity. Expression of inducible nitric oxide synthase in a mouse model of anaphylaxis. *J Inv Allerg*, 17:379–385, 2007.
- [74] A.B. Sanz, M.D. Sanchez-Nino, A.M. Ramos, J.A. Moreno, B. Santamaria, M. Ruiz-Ortega, J. Egido, and A. Ortiz. Nf-kappab in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 21:1254–1262, 2010.
- [75] P. Scaffidi, T. Misteli, and M.E. Bianchi. Release of chromatin protein hmgb1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418:191–195, 2002.
- [76] K. Schroder and J. Tschopp. The inflammasomes. *Cell*, 140:821–832, 2010.
- [77] W. Shao, G. Yeretssian, K. Doiron, S.N. Hussain, and M. Saleh. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *J Biol Chem*, 282:36321–36329, 2007.
- [78] Y. Shi, J.E. Evans, and K.L. Rock. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, 425:516–521, 2003.
- [79] A.A. Shigeoka, J.L. Mueller, A. Kambo, J.C. Mathison, A.J. King, W.F. Hall, C.J. da Silva, R.J. Ulevitch, H.M. Hoffman, and D.B. McKay. An inflammasome-independent role for epithelial-expressed nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol*, 185:6277–6285, 2010.
- [80] D.O. Slauson. Comparative pathology of glomerulonephritis in animals. *Veterinary Pahtology*, 16:135–164, 1979.

- [81] J. E. Smadel. Experimental nephritis in rats induced by injection of anti-dsDNA serum: iii. pathological studies of the acute and chronic stages. *J Exp Med*, 65:541–555, 1937.
- [82] E. Staub, E. Dahl, and A. Rosenthal. The dapin family: a novel domain links apoptotic and interferon response proteins. *Trends Biochem Sci*, 26:83–85, 2001.
- [83] T. Strowig, J. Henao-Mejia, E. Elinav, and R. Flavell. Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 481:278–286, 2012.
- [84] S.A. Teteris, D.R. Engel, and C. Kurts. Homeostatic and pathogenic role of renal dendritic cells. *Kidney Int*, 2011.
- [85] N.A. Thornberry, H.G. Bull, J.R. Calaycay, K.T. Chapman, A.D. Howard, M.J. Kostura, D.K. Miller, S.M. Molineaux, J.R. Weidner, and J. Aunins. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356:768–774, 1992.
- [86] J.R. Timoshanko, A.R. Kitching, Y. Iwakura, S.R. Holdsworth, and P.G. Tipping. Contributions of il-1beta and il-1alpha to crescentic glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol*, 15:910–918, 2004.
- [87] J.R. Timoshanko, A.R. Kitching, Y. Iwakura, S.R. Holdsworth, and P.G. Tipping. Leukocyte-derived interleukin-1beta interacts with renal interleukin-1 receptor i to promote renal tumor necrosis factor and glomerular injury in murine crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol*, 164:1967–1977, 2004.
- [88] J.R. Timoshanko, J.D. Sedgwick, S.R. Holdsworth, and P.G. Tipping. Intrinsic renal cells are the major source of tumor necrosis factor contributing to renal injury in murine crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 14:1785–1793, 2003.
- [89] P.G. Tipping and S.R. Holdsworth. Cytokines in glomerulonephritis. *Semin Nephrol*, 27:275–285, 2007.

- [90] P.G. Tipping, X.R. Huang, M. Qi, G.Y. Van, and W.W. Tang. Crescentic glomerulonephritis in cd4- and cd8-deficient mice. requirement for cd4 but not cd8 cells. *Am J Pathol*, 152:1541–1548, 1998.
- [91] J. Tschopp. Mitochondria: Sovereign of inflammation? *Eur J Immunol*, 41(5):1196–1202, May 2011.
- [92] J.-E. Turner, H.-J. Paust, O.M. Steinmetz, and U. Panzer. The th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int*, 77:1070–1075, 2010.
- [93] L. Van de Walle, T.-D. Kanneganti, and M. Lamkanfi. Hmgb1 release by inflammasomes. *Virulence*, 2:162–165, 2011.
- [94] E. Vigano and A. Mortellaro. Caspase-11: the driving factor for noncanonical inflammasomes. *Eur J Immunol*, 43:2240–2245, 2013.
- [95] A. Vilaysane, J. Chun, M.E. Seamone, W. Wang, R. Chin, S. Hirota, Y. Li, S.A. Clark, J. Tschopp, K. Trpkov, B. R. Hemmelgarn, P. L. Beck, and D.A. Muruve. The nlrp3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to ckd. *J Am Soc Nephrol*, 21:1732–1744, 2010.
- [96] H. Wang, O. Bloom, M. Zhang, J.M. Vishnubhakat, M. Ombrellino, J. Che, A. Frazier, H. Yang, S. Ivanova, L. Borovikova, K.R. Manogue, E. Faist, E. Abraham, J. Andersson, U. Andersson, P.E. Molina, N.N. Abumrad, A. Sama, and K.J. Tracey. Hmg-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 285:248–251, 1999.
- [97] C.H. Weber and C. Vincenz. The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci*, 26:475–481, 2001.
- [98] S.B. Willingham, I.C. Allen, D.T. Bergstralh, W.J. Brickey, M.T.-H. Huang, D.J. Taxman, J.A. Duncan, and J.P.-Y. Ting. Nlrp3 (nalp3, cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and hmgb1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.*, 183:2008–2015, 2009.

- [99] C. Xie, R. Sharma, H. Wang, X.J. Zhou, and C. Mohan. Strain distribution pattern of susceptibility to immune-mediated nephritis. *J Immunol*, 172:5047–5055, 2004.
- [100] H. Yang, H.S. Hreggvidsdottir, K. Palmblad, H. Wang, M. Ochani, J. Li, B. Lu, S. Chavan, M. Rosas-Ballina, Y. Al-Abed, S. Akira, A. Bierhaus, H. Erlandsson-Harris, U. Andersson, and K.J. Tracey. A critical cysteine is required for hmgb1 binding to toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107:11942–11947, 2010.
- [101] R. Zhou, A. Tardivel, B. Thorens, I. Choi, and J. Tschopp. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*, 11:136–140, 2010.
- [102] P. Zhu, L. Xie, H.-S. Ding, Q. Gong, J. Yang, and L. Yang. High mobility group box 1 and kidney diseases (review). *Int J Mol Med*, 31:763–768, 2013.

Danksagung

Besonders möchte ich mich bei PD Dr. Volker Vielhauer, meinem Doktorvater an der humanmedizinischen Fakultät der LMU München, bedanken. Er hat mir ermöglicht, das Forschungsprojekt, welches meine Doktorarbeit umfasst, mitzugestalten, aber auch Hilfestellungen zu geben wenn sie notwendig waren. Nochmal ein großes Danke, dass ich meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen vortragen konnte.

Nuru Eltrich, dem medizinisch technischen Assistenten unseres Labors, gebührt ebenso mein Dank. Er hat mich in den ersten Monaten fundiert in die Arbeitsweisen des Labors eingeführt und stand bei schwierigeren technischen Fragestellungen immer zur Verfügung.

Monika Hofstetter, möchte ich für die intensive Betreuung während der Etablierung der Western Blots danken, die letztendlich von Erfolg gekrönt waren.

An alle meine Kollegen ein Danke für die schönen letzten vier Jahre in der Laborgemeinschaft, die anregenden Diskussionen und Gespräche und dass Ihr mich, vom ersten Tag an, in das Team integriert habt.

Ferner möchte ich meinem Betreuer an der veterinärmedizinischen Fakultät der LMU München Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel danken, dass er sich bereitklärt hat, die extern angefertigte Promotionsschrift an meiner Alma mater einzureichen. Ich möchte mich nochmal herzlich für die Chance bedanken, dass ich in seiner Forschungsgruppe für drei Monate die Möglichkeit hatte, meine Arbeitstechniken wieder auf den neusten Stand zu bringen. Außerdem stand er immer hilfreich mit Ratschlägen bezüglich der Promotionsschrift zur Verfügung.

Univ.-Prof. Dr. Wanke möchte ich danken für die anregenden Gespräche über Nierenpathologie und andere Themen die mir häufig neue Denkanstöße gegeben haben.

Großer Dank gebührt meinen Eltern, ohne deren finanzielle Unterstützung Studium und Dissertation nicht möglich gewesen wären. Danke für Eure Geduld wenn mal wieder mit Arbeiten, Studium und Privatem alles zusammen kam.

Martin auch Dir ein großes Danke, dass Du mir in der Zeit der finalen Phase zu jedem Zeitpunkt den Rücken frei gehalten hast.