

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

Die Rolle von Pentraxin 3 bei entzündlichen Nierenerkrankungen

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

vorgelegt von
Julian Aurelio Marschner
aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Anne Krug

PD Dr. Ursula Storch

Prof. Dr. Peter Weyrich

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

PD. Dr. Shrikant Ramesh Mulay

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

17.07.2019

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2013 bis Juli 2018 in der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Universität München durchgeführt.

Betreut wurde diese Dissertation durch Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders.

Aus dem Projekt hervorgegangene Veröffentlichungen

Publikationen

Marschner JA, Mulay SR, Steiger S, Anguiano LG, Zhao Z, Boor P, Rahimi K, Inforzato A, Garlanda C, Mantovani A, Anders HJ: The long pentraxin PTX3 is an endogenous inhibitor of calcium oxalate crystal growth in hyperoxaluria-related nephrocalcinosis and chronic kidney disease. *Front Immunol* 9, 1–14, 9:2173 (2018). DOI: 10.3389/fimmu.2018.02173

Marschner JA, Schäfer H, Holderied A, Anders HJ: Optimizing Mouse Surgery with Online Rectal Temperature Monitoring and Preoperative Heat Supply. Effects on Post-Ischemic Acute Kidney Injury. *PLoS One* 11, e0149489 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0149489

Vorträge

Fellows' Night des Nephrologischen Forums München 2017

Endogenes Pentraxin 3 inhibiert Nephrokalzinose und schützt vor Hyperoxalurie-bedingter chronischer Niereninsuffizienz. Marschner JA, Mulay SR, Steiger S, Anguiano Gómez L, Anders HJ

Junge Niere 2018 (Deutsche Gesellschaft für Nephrologie)

Endogenes Pentraxin 3 inhibiert Nephrokalzinose und schützt vor Hyperoxalurie-bedingter chronischer Niereninsuffizienz. Marschner JA, Mulay SR, Steiger S, Anguiano Gómez L, Anders HJ

55th ERA-EDTA Congress (Kopenhagen, 2018)

Endogenous pentraxin 3 inhibits nephrocalcinosis and protects hyperoxaluria-induced chronic kidney disease. Marschner JA, Mulay SR, Steiger S, Anguiano Gómez L, Anders HJ

Auszeichnungen

Junge Niere 2018 (Deutsche Gesellschaft für Nephrologie)

Bester Vortrag, Reisestipendium für die 10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie

55th ERA-EDTA Congress (2018)

Preis für bestes Abstract, Reisestipendium

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
Einheitenverzeichnis	XIII
Verzeichnis im Text erwähnter Gene und Proteine	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie und Funktion der Nieren	1
1.2 Akutes und chronisches Nierenversagen	2
1.3 Entzündliche Nierenerkrankungen	3
1.4 Die Immunantwort bei akuter und chronischer Nierenschädigung	4
1.5 Pentraxin 3	9
1.6 Rolle von Ptx3 bei entzündlichen Nierenkrankheiten	13
1.7 Zielsetzung der Arbeit und Hypothesen	15
1.8 Arbeitsplan und Strategie	15
2 Material	17
2.1 Tierexperimentelle Methoden	17
2.2 Molekularbiologische Methoden	20
2.3 Histologische Methoden	23
2.4 Biochemische Methoden	25
2.5 Immunologische Methoden	26
2.6 Zellkultur Methoden	27
2.7 <i>In chemico</i> Methoden	28
2.8 Verbrauchsmaterialien	29
2.9 Geräte	29
2.10 Software	30
3 Methoden	31
3.1 Tierexperimentelle Methoden	31
3.2 Molekularbiologische Methoden	43
3.3 Histologische Methoden	48
3.4 Biochemische Methoden	54
3.5 Immunologische Methoden	57

3.6	Zellkultur Methoden	64
3.7	<i>In chemico</i> Methoden	65
3.8	Datenaufbereitung, Statistik und Darstellung	66
4	Ergebnisse	68
4.1	Charakterisierung des renalen Ischämie- und Reperfusionsschadens mit standardisierter Temperaturkontrolle	68
4.2	Effekte der therapeutischen Intervention mit rhPTX3 in der Regenerationsphase nach IRI	73
4.3	Effekte der Substitution von Ptx3 in der Regenerationsphase nach IRI	78
4.4	Effekte der therapeutischen Intervention mit rhPTX3 bei akuter Oxalatnephropathie	82
4.5	Rolle von endogenem Ptx3 in der akuten Oxalatnephropathie	87
4.6	Rolle von endogenem Ptx3 bei chronischer Oxalatnephropathie	91
5	Diskussion	102
5.1	PTX3 und Nekroinflammation	102
5.2	Kompartiment-spezifische Effekte von Ptx3	105
5.3	PTX3 bei akuter Oxalatnephropathie	106
5.4	PTX3 in der post-ischämischen Regenerationsphase	107
5.5	PTX3 als Kristallisationsinhibitor	110
5.6	Limitationen der Arbeit	114
5.7	Ausblick	117
	Zusammenfassung	119
	Literaturverzeichnis	121
	Danksagung	140
	Eidesstattliche Erklärung	141
	Übereinstimmungserklärung	142

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematischer Aufbau der menschlichen Niere	1
Abb. 2	Systematische Untergliederung des Immunsystems in Mensch und Maus . . .	5
Abb. 3	Idealtypischer Verlauf einer ANV-assoziierten, sterilen, renalen Entzündungsreaktion	6
Abb. 4	Strukturmodelle der Pentraxine CRP und PTX3	10
Abb. 5	Quellen und biologische Effekte von Ptx3	12
Abb. 6	Zuchtstrategie für <i>Ptx3^{+/+}</i> und <i>Ptx3^{-/-}</i> Tiere	32
Abb. 7	<i>Ptx3</i> mRNA-Expression in <i>Ptx3^{+/+}</i> und <i>Ptx3^{-/-}</i> Tieren	35
Abb. 8	Intraoperative Temperaturkontrolle bei unilateraler Ischämie-Reperfusion . . .	38
Abb. 9	Maus-Restrainer für intravenöse Injektionen	40
Abb. 10	Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate	41
Abb. 11	Aufteilung des Nierenparenchyms bei der Probennahme	43
Abb. 12	Beispiel Analytisches MOPS-Gel	45
Abb. 13	Funktionsweise der immunhistochemischen Färbestrategie	50
Abb. 14	Semi-quantitative Auswertung immunhistochemischer Färbungen	53
Abb. 15	Messverfahren für Kreatinin- und Stickstoff-Harnstoff-Bestimmung	55
Abb. 16	Gating-Strategie für Durchflusszytometriedaten zur Zellzählung	61
Abb. 17	Gating-Strategie für Durchflusszytometriedaten zur Identifikation von Leukozyten	62
Abb. 18	Funktionsweise des verwendeten Sandwich-ELISA-Assays	62
Abb. 19	Charakterisierung der GFR im Verlauf nach IRI	69
Abb. 20	Charakterisierung des strukturellen Schadens im Verlauf nach IRI	70
Abb. 21	Charakterisierung des intrarenalen mRNA Expressionsprofils im Verlauf nach IRI	71
Abb. 22	Durchflusszytometrische Quantifizierung intrarenaler Makrophagen im Verlauf nach IRI	72
Abb. 23	Intrarenale <i>Ptx3</i> mRNA Expression im Verlauf nach IRI	73
Abb. 24	Versuchsanordnung zur Testung des Effektes von rhPTX3 nach IRI	74
Abb. 25	Pharmakokinetik von rhPTX3 nach i.v. Injektion in C57BL/6N Mäuse	74
Abb. 26	Effekt der rhPTX3-Gabe während der Regenerationsphase nach IRI auf den histologischen Nierenschaden	76
Abb. 27	Effekt der rhPTX3-Gabe während der Regenerationsphase nach IRI auf die mRNA Expressionslevel von verschiedenen Nierenschadensmarkern.	77
Abb. 28	Effekt der rhPTX3-Gabe während der Regenerationsphase nach IRI auf die intrarenale Makrophagenpopulation	77
Abb. 29	Effekt der rhPTX3-Gabe während der Regenerationsphase nach IRI auf die mRNA Expressionslevel von pro-entzündlichen Mediatoren in der Niere.	78

Abb. 30	Effekt der Substitution mit rhPTX3 während der Regenerationsphase nach IRI in <i>Ptx3</i> ^{-/-} Mäusen auf den histologischen Nierenschaden.	79
Abb. 31	Effekt der Substitution mit rhPTX3 während der Regenerationsphase nach IRI in <i>Ptx3</i> ^{-/-} Mäusen auf den proximalen Tubulus.	80
Abb. 32	Durchflusszytometrische Quantifizierung intrarenaler Immunzellen mit und ohne Substitution mit rhPTX3 in <i>Ptx3</i> ^{-/-} Tieren während der Regenerationsphase nach IRI	81
Abb. 33	Versuchsordnung zur Testung des Effektes von therapeutischem rhPTX3 bei akuter Oxalatnephropathie	83
Abb. 34	Effekt der rhPTX3-Gabe auf die CaOx-Kristalldeposition bei akuter Oxalatnephropathie	84
Abb. 35	Effekt der rhPTX3-Gabe auf die exkretorische Nierenfunktion bei akuter Oxalatnephropathie	84
Abb. 36	Effekt der rhPTX3-Gabe auf das mRNA Expressionsprofil von Nierenschadens- und Entzündungsparametern bei akuter Oxalatnephropathie	85
Abb. 37	Effekt der rhPTX3-Gabe auf intrarenale Immunzellpopulationen bei akuter Oxalatnephropathie	86
Abb. 38	Versuchsordnung zur Testung der Rolle von endogenem Ptx3 bei akuter Oxalatnephropathie	87
Abb. 39	CaOx-Kristalldeposition bei akuter Oxalatnephropathie in <i>Ptx3</i> ^{+/+} und <i>Ptx3</i> ^{-/-} Mäusen	88
Abb. 40	Exkretorische Nierenfunktion bei akuter Oxalatnephropathie in <i>Ptx3</i> ^{+/+} und <i>Ptx3</i> ^{-/-} Mäusen	88
Abb. 41	mRNA Expressionsprofil von Nierenschadens- und Entzündungsmarker bei akuter Oxalatnephropathie in <i>Ptx3</i> ^{+/+} und <i>Ptx3</i> ^{-/-} Mäusen	89
Abb. 42	Intrarenale <i>Ptx3</i> mRNA Expression im Verlauf nach akuter Oxalatnephropathie	90
Abb. 43	Durchflusszytometrische Quantifizierung infiltrierender Leukozyten in <i>Ptx3</i> ^{+/+} und <i>Ptx3</i> ^{-/-} Mäusen bei akuter Oxalatnephropathie	91
Abb. 44	Kalziumoxalat-induzierte Nephrokalzinose in Mensch und Maus	92
Abb. 45	Versuchsordnung zur Generierung einer Hyperoxalurie-induzierten Nephrokalzinose	93
Abb. 46	Renale CaOx-Kristalldeposition und Plasmakreatininlevel in verschiedenen Mausstämmen nach Oxalat-reicher Diät	94
Abb. 47	Renale CaOx-Kristalldeposition in <i>Ptx3</i> ^{+/+} und <i>Ptx3</i> ^{-/-} Tieren bei Hyperoxalurie	95
Abb. 48	Phänotypisierung der Nierenpathologie bei <i>Ptx3</i> ^{+/+} und <i>Ptx3</i> ^{-/-} Tieren im Verlauf bei Hyperoxalurie	96
Abb. 49	Nierenfibrosierung in <i>Ptx3</i> ^{+/+} und <i>Ptx3</i> ^{-/-} Tieren bei Hyperoxalurie	97
Abb. 50	Ptx3-Proteinexpression bei Hyperoxalurie in <i>Ptx3</i> ^{+/+} Tieren	98
Abb. 51	<i>In chemico</i> Inhibierung der Kristallisation von CaOx durch rhPTX3	99
Abb. 52	Expression von Adhäsionsmolekülen in <i>Ptx3</i> ^{+/+} und <i>Ptx3</i> ^{-/-} Tubuluszellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> nach Oxalat-Stimulation	100
Abb. 53	Wirkmechanismen von Ptx3 bei renaler Nekroinflammation	103
Abb. 54	Ptx3 inhibiert Nekroinflammation	105

Abb. 55	Mögliche Wirkmechanismen von endogenem Ptx3 bei chronischer Oxalatnephropathie	112
Abb. 56	Publikationsanalyse zu PTX3	118

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Liste der verwendeten Primer	22
Tab. 2	Verwendete Mauslinien	31
Tab. 3	PCR-Mastermix zur Genotypisierung von <i>Ptx3</i> ^{-/-} Mäusen	33
Tab. 4	PCR-Programm zur Genotypisierung von <i>Ptx3</i> ^{-/-} Mäusen	33
Tab. 5	Bestandteile und Dosierung der antagonisierbaren Injektionsnarkose	36
Tab. 6	Ansätze für Narkose- und Antagonistenmix berechnet für 1000g KG	36
Tab. 7	RT-PCR-Mastermix zur Umschreibung von mRNA zu cDNA	45
Tab. 8	RT-PCR-Programm zur Umschreibung von mRNA zu cDNA	46
Tab. 9	qPCR-Programm für die Genexpressionsanalyse im LightCycler 480	46
Tab. 10	qPCR-Mastermix für die Genexpressionsanalyse im LightCycler 480	47
Tab. 11	Einbett-Protokoll für Formalin-fixierte Nierenschnitte	48
Tab. 12	Entparaffinisierung und Rehydrierung von Nierenschnitten	49
Tab. 13	Immunmarkierungsprotokoll für Adgre1, Ly6b und Acta2	51
Tab. 14	Immunmarkierungsprotokolle für Ptx3	52
Tab. 15	Färbestrategien zur Differenzierung intrarenaler Leukozytenpopulationen	59
Tab. 16	Statistische Kennzahlen der nicht normalisierten GFR-Messwerte aus Abb. 19	68

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Voller Name
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANV	akutes Nierenversagen
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
BUN	Blut-Harnstoff-Stickstoff (engl. blood urea nitrogen)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaOx	Calciumoxalat, bzw. Kalziumoxalat
CD (Cd)	cluster of differentiation
ci	Konfidenzintervall (engl.: confidence interval)
CNV	chronisches Nierenversagen
CP	Crossing Point
CpG-Nukleotid	Desoxycytidin-Phosphorsäure-Desoxyguanosin-Nukleotid
DAB	3'3-Diaminobenzidine
DAMPs	Gefahren- bzw. Schaden-assoziierte molekulare Strukturen (engl.: Danger/ Damage Associated Molecular Patterns)
DC	Dendritische Zelle (engl.: dendritic cell)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
(c)DNS/ (c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure (engl.: (complementary) deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E	Amplifikationseffizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
engl.	englisch
etc.	et cetera
FACS	Durchflusszytometrie (engl. fluorescence-activated cell scanning)
FBS	Fetales Rinderserum (engl.: fetal bovine serum)

Abkürzung	Voller Name
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. fibroblast growth factor)
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]carbazol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärts-Streulicht (engl. forward scatter)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1 (engl.: intercellular adhesion molecule 1)
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRAK-3	IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase 3
(r)IRI	(renaler) Ischämie- und Reperfusionsschaden (engl. renal ischemia reperfusion injury)
i.v.	intravenös
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
Kat.-Nr.	Katalognummer
Kap.	Kapitel
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
LTL	Lotus Tetragonolobus Lektin
MGI	Mouse Genome Informatics
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: messenger ribonucleic acid)
n	Anzahl Beobachtungen
n.a.	nicht verfügbar (engl. not available)
n.s.	nicht signifikant
NaOx	Natriumoxalat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NETs	Neutrophile extrazelluläre Fallen (engl. neutrophil extracellular traps)
NIC	Non-Invasive-Clearance
NLR	NOD-ähnlicher Rezeptor (engl.: NOD-like receptor)
NLRP3	NOD-like Rezeptor Protein 3
NOD	Nukleotid-bindenden Oligomerisierungsdomänen
NTC	non template control
OP	Operation
p.o.	peroral
PAMPs	Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (engl.: Pathogen Associated Molecular Patterns)
PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion (engl. Periodic Acid-Schiff)

Abkürzung	Voller Name
PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (eng.: polymerase chain reaction)
PerCP-Cy5.5	peridinin chlorophyll protein - cyan 5.5
PFA	Paraformaldehyd
PS	Penicillin-Streptomycin
PTCs	(murine primäre) proximale Tubulusepithelzellen (engl.: proximal tubular cells)
qPCR	quantitative (Real-Time) PCR
PRR	Mustererkennungszepetor (engl.: pattern recognition receptor)
(rh)PTX3	(rekombinantes humanes) Pentraxin 3
PZN	Pharmazentralnummer
rpm	rounds per minute (Umdrehungszahl pro Minute)
(r)RNS/ (r)RNA	(ribosomale) Ribonukleinsäure (engl.: (ribosomal) ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Standardabweichung
s.c.	subcutan, bzw. subkutan
SDS (-PAGE)	Natriumlaurylsulfat (-Polyacrylamidgelelektrophorese) (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. single nucleotide polymorphism)
SSC	Seitwärts-Streulicht (engl. sideward scatter)
SI	Internationale Einheitensystem (frz. Système international d'unités)
SPOCD1	spen paralogue and orthologue C-terminal domain containing protein 1
T3	3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl.: T-cell receptor)
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (engl.: Toll-like receptor)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMEDA	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (engl.: vascular cell adhesion molecule 1)
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
\bar{x}	arithmetisches Mittel
z.B.	zum Beispiel

Einheitenverzeichnis

	Symbol	Name	Definition in SI-Einheiten	Größe
SI-Einheiten	A	Ampere	-	elektrischer Fluss
	K	Kelvin	-	thermodynamische Temperatur
	kg	Kilogramm	-	Masse
	m	Meter	-	Länge
	mol	Mol	-	Stoffmenge
	s	Sekunde	-	Zeit
abgeleitete SI-Einheiten	°C	Grad Celsius	K - 273.15	Temperatur
	J	Joule	$N \times m [m^2 \times kg \times s^{-2}]$	Energie
	N	Newton	$[m \times kg \times s^{-2}]$	Kraft
	V	Volt	$W/A [m^2 \times kg \times s^{-3} \times A^{-1}]$	elektrische Spannung
	W	Watt	$J/s [kg \times m^2 \times s^{-3}]$	Leistung
Nicht-SI-Einheiten	Da	Dalton	$1.660 \times 10^{-27} kg$	atomare Masseneinheit
	g	Gravitationskraft	$9.81 \times m \times s^{-2}$	Beschleunigung
	bar	Bar	$1 \times 10^5 kg \times m^{-1} \times s^{-2}$	Druck
	min	Minute	60 s	Zeit
	h	Stunde	3600 s	Zeit
	d	Tag	86400 s	Zeit
	L, l	Liter	dm^3	Volumen
	M	molar	$mol \times dm^{-3}$	molar concentration
	U	Unit	-	biologische Aktivität

Vorsätze für Maßeinheiten

Symbol	Name	Faktor
k	kilo	10^3
d	deci	10^{-1}
c	centi	10^{-2}
m	milli	10^{-3}
μ	micro	10^{-6}
n	nano	10^{-9}

Verzeichnis im Text erwähnter Gene und Proteine

Beim Verfassen der vorliegenden Arbeit wurde Wert darauf gelegt, die thematisierten Proteine bzw. die zugrundeliegenden Protein-kodierenden Nukleinsäuren nach den aktuellen Vorgaben und Begrifflichkeiten der weithin akzeptierten Mouse Genome Informatics Datenbank (MGI, <http://www.informatics.jax.org/>) zu benennen^[35,78,25]. Die unten stehende Referenzliste enthält die weiter verbreiteten Aliasse der jeweiligen Moleküle um etwaige Missverständnisse zu vermeiden.

MGI-Gensymbol	MGI-Name	gängige Aliasse
Acta2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	Actvs, a-SMA, SMalphaA, alphaSMA, 0610041G09Rik
Adgre1	adhesion G protein-coupled receptor E1	Emr1, Ly71, F4/80, Gpf480, TM7LN3, DD7A5-7, EGF-TM7
Anxa2	annexin A2	Cal1h, AW215814
Apcs	serum amyloid P-component	Sap
C1qa	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	C1q
Ccl17	chemokine (C-C motif) ligand 17	Tarc, Abcd-2, Scya17, Scya17l
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	JE, HC11, MCAF, MCP1, MCP-1, Scya2, Sigje, SMC-CF, AI323594
Ccl22	chemokine (C-C motif) ligand 22	MDC, DCBCK, ABCD-1, Scya22
Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	SISd, Scya5, RANTES, TCP228, MuRantes
Ccr2	chemokine (C-C motif) receptor 2	Ckr2, Ccr2a, Ccr2b, Ckr2a, Ckr2b, mJer, Cmkbr2, Cc-ckr-2
Ccr4	chemokine (C-C motif) receptor 4	CC CKR-4, Cmkbr4
Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	CD195, Cmkbr5
Cd22	CD22 antigen	Lyb8, Lyb-8
Cd44	CD44 antigen	Ly-24, Pgp-1, HERMES, AU023126, AW121933, AW146109
Cfh	complement component factor h	Mud-1, Sas1, Sas-1, FH
Crp	C-reactive protein, pentraxin-related	-
Clu	clusterin	Cli, ApoJ, Sgp2, SP-40, Sgp-2, Sugp-2, AI893575, D14Ucla3
Cx3cr1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	-
Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Fsp, Gro1, KC, KC/GRO-alpha, Mgsa, N51, Scyb1

MGI-Gensymbol	MGI-Name	gängige Aliasse
Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	C7, IP10, CRG-2, INP10, IP-10, Ifi10, mob-1, Scyb10, gIP-10
Egf	epidermal growth factor	-
Fabp1	fatty acid binding protein 1, liver	Fabpl, L-FABP
Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I	CD64, FcgammaRI
Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	CD32, Fcgr2, Fcr-2, Fcr-3, Ly-17, LyM-1, Lym-1, fcRII, FcgrII, Fcgr2a, Ly-m20, AI528646, Fc[g]RII, F630109E10Rik
Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	CD16
Fgf	fibroblast growth factor	-
Fn1	fibronectin 1	Fn, Fn-1, E330027I09
Gdf9	growth differentiation factor 9	Gdf-9
Gsta1	glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya)	Gst2-1, α GST
Gstp1	glutathione S-transferase, pi 1	GstpiB, π GST
H2	histocompatibility-2, MHC	H-2, MHC-II
Mbl2	mannose-binding lectin (protein C) 2	MBL, MBL-C, MBP-C
Havcr1	hepatitis A virus cellular receptor 1	Tim1, KIM-1, TIM-1, Timd1, AI503787
Hmgb1	high mobility group box 1	amphoterin, DEF, Hmg1, HMG-1, p30, SBP-1
Ifng	interferon gamma	Ilg, IFN-gamma, IFN γ
Il1b	interleukin 1 beta	IL-1B, IL-1beta
Il17a	interleukin 17A	Ctla8, Ctla-8, Il17, IL-17A
Il18	interleukin 18	Igif, Il-18
Il4	interleukin 4	Il-4
Il10	interleukin 10	cytokine synthesis inhibitory factor, IL-10
Il6	interleukin 6	Il-6
IRAK-3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	4833428C18Rik, IRAK-M
Itgam	integrin alpha M	CR3, CR3A, MAC1, Cd11b, Ly-40, Mac-1, Mac-1a, CD11b/CD18, F730045J24Rik
Itgae	integrin alpha E, epithelial-associated	CD103, aM290, alpha-E1, A530055J10, alpha-M290
Itgax	integrin alpha X	Cr4, N418, Cd11c, AI449405
Lcn2	lipocalin 2	NRL, 24p3, Sip24, AW212229, NGAL
Ly6b	lymphocyte antigen 6 complex, locus B	Ly6B.2
Ly6g	lymphocyte antigen 6 complex, locus G	Gr1, Gr-1, Ly-6G
Mrc1	mannose receptor, C type 1	MR, CD206, AW259686
Ms4a1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	Cd20, Ly-44

MGI-Gensymbol	MGI-Name	gängige Aliasse
Nlrp3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3	Cias1, cryopyrin, Mmig1, NALP3, Pypaf1
Nptx1	neuronal pentraxin 1	D11Bwg1004e, Np1
Nptx2	neuronal pentraxin 2	narp, np2
Nptxr	neuronal pentraxin receptor	1200009K17Rik, 1700036C17Rik, 5730406O18Rik, D15Bwg0580e, NP-CD, NPR
Ptpnc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	loc, B220, Cd45, L-CA, Ly-5, T200, CD45R, Lyt-4
Ptx3	pentraxin related gene	pentraxin 3, TSG-14, AI607804
Ptx4	pentraxin 4	1110018H23Rik
Rela	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	p65
Rn18s	18S ribosomal RNA	-
S1pr1	sphingosine-1-phosphate receptor 1	Edg1, S1P, S1P1
Selplg	selectin, platelet (p-selectin) ligand	CD162, Psgl1, Psgl-1
Spocd1	Spen paralog and ortholog C-terminal domain containing 1	OTTMUSG00000009522
Tnf	tumor necrosis factor	DIF, Tnfa, TNF-a, TNFSF2, Tnlg1f, Tnfsf1a, TNFalpha, TNF-alpha
Tnfaip6	tumor necrosis factor alpha induced protein 6	Tnfip6, Tsg6, TSG-6
Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	Tgfb, Tgfb-1, TGFbeta1, TGF-beta1, TGF-beta 1

Für die Unterscheidung zwischen humanen und murinen Nukleinsäuren bzw. Proteinen wurden die gängigen Nomenklaturregeln angewandt, wie es hier am Beispiel des Moleküls Pentraxin 3 gezeigt wird.

Spezies	Nukleinsäure	Protein
Homo sapiens	<i>PTX3</i>	PTX3
Mus musculus	<i>Ptx3</i>	Ptx3

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit verfolgte die Ziele, durch den Einsatz diverser *in vitro* und *in vivo* Methoden, zum einen die Rolle des Proteins Pentraxin 3 bei entzündlichen Nierenerkrankungen über den Stand des Wissens hinaus zu beschreiben und zum anderen im Sinne eines translationalen Forschungsansatzes die sich daraus ergebenden Therapieoptionen im Tierexperiment auszuloten.

1.1 Anatomie und Funktion der Nieren

Die Nieren spielen in Wirbeltieren eine wichtige Rolle bei einer Reihe fundamentaler physiologischer Prozesse. Dazu gehören u.a. die Ausscheidung von Endprodukten des Stoffwechsels, die Regulierung des Blutdrucks und des Wasser- und Elektrolythaushalts, die Stimulierung der Produktion von Blutzellen, sowie die Aufrechterhaltung des Säure-Base-Haushaltes. Dementsprechend kann die Dysfunktion der Nieren akut und chronisch verlaufende Pathologien mit zum Teil hoher Mortalität zur Folge haben^[127].

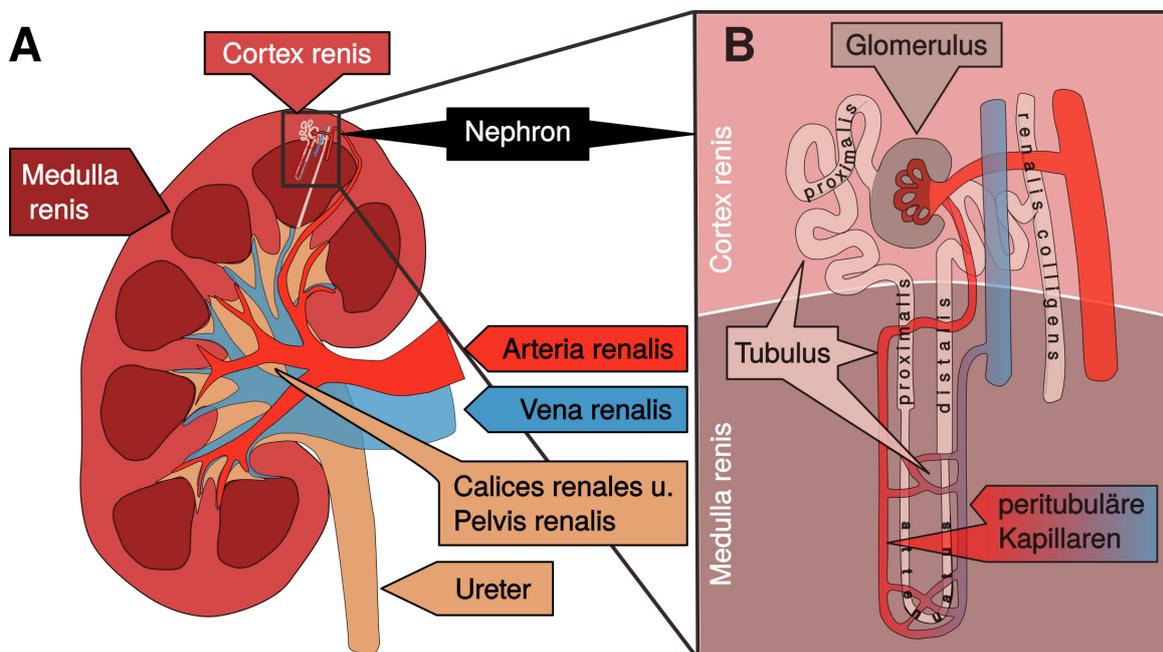


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der menschlichen Niere. (A) Die Niere ist ein retroperitoneal angelegtes, paariges Organ, das sich makroskopisch in *Cortex renalis*, *Medulla renalis* sowie die *Calices renales* und die *Pelvis renalis* aufteilen lässt. Im Gegensatz zur menschlichen Niere, die mehrere medulläre Pyramiden hat (hier gezeigt), ist die murine Niere unilobar (ein durchgehendes medulläres Segment). Die Blutversorgung erfolgt über die *Arteria* bzw. *Vena renalis*, der Abfluss von Endharn in die Blase über den *Ureter*. (B) Das Nephron ist die funktionelle Filtrationseinheit der Niere. Es durchzieht Kortex und Medulla und setzt sich aus einem Glomerulus und einem damit verbundenen Tubulusapparat zusammen, der sich wiederum in distinkte funktionelle Abschnitte untergliedern lässt.

Die Perfusion beider Nieren (Abb. 1A) erfolgt über je eine Nierenarterie (*Arteria renalis*, Zufluss) und eine Nierenvene (*Vena renalis*, Abfluss). Die funktionelle Einheit, die für die Filtration des Blutes, die Rückresorption stoffwechselrelevanter Moleküle und die Sezernierung überschüssiger Salze und Proteine verantwortlich ist, ist das Nephron (Abb. 1B). Ein gesunder Erwachsener hat in etwa eine Million Nephrone pro Niere^[23]. Hier wird in den Nierenkörperchen (*Glomeruli*) durch die Filtration des Blutes der Primärharn gebildet, welcher in den ableitenden Nierenkanälchen (*Tubuli*) weiter zum Endharn aufkonzentriert wird. In den Tubuli findet unter Energieaufwendung die Rückresorption essentieller Biomoleküle statt. Der Harn wird aus den Tubuli über die Nierenkelche (*Calices renales*) in die Nierenbecken (*Pelves renales*) abgeleitet und schließlich über die Harnleiter (*Ureteren*) in die Blase abgeführt.

Während sich der Großteil der Glomeruli und der geschwungen verlaufende Teil des Hauptstückes des ableitenden Tubulus (*Tubulus proximalis, Pars convoluta*) dem makroskopisch gut differenzierbaren Nierenkortex (*Cortex renis*) zuordnen lassen, bilden der gerade Teil des Hauptstückes (*Tubulus proximalis, Pars recta*), das Überleitungsstück (*Tubulus attenuatus*) und der größte Teil des Mittelstückes (*Tubulus distalis*) das Nierenmark (*Medulla renis*). Definitionsgemäß lässt sich der *Tubulus proximalis* weiterhin in drei distinkte, miteinander verbundene Segmente unterteilen. Das Segment S1 beinhaltet den Anfang und das Mittelstück der *Pars convoluta*, S2 deren Schlussstück sowie den Anfang der *Pars recta* und S3 ausschließlich die *Pars recta*.^[176,298] Aus funktioneller Sicht werden die geraden Teile des *Tubulus proximalis* und *distalis* sowie der *Tubulus attenuatus* zur Henle-Schleife zusammengefasst. Hier findet in der Hauptsache die transzelluläre Wasserrückresorption aus dem Primärfiltrat statt. Die Mittelstücke mehrerer Nephrone verbinden sich zu Sammelrohren (*Tubulus renalis colligens*), die sich durch Rinde und Mark ziehen und in die Nierenkelche münden^[127].

Die anatomischen Einheiten, die in der vorliegenden Arbeit pathophysiologisch im Vordergrund stehen, sind der *Tubulus proximalis* und *distalis*.

1.2 Akutes und chronisches Nierenversagen

Systematisch lassen sich Nierenerkrankungen in sterile und nicht-sterile Nierenentzündungen (Nephritiden), Systemerkrankungen mit Nierenbeteiligung, erblich bedingte Erkrankungen, Nierensteine, Nierentumore und Nephropathien nach Nierentransplantation einteilen^[127].

Ungeachtet ihrer Genese und des zugrundeliegenden Pathomechanismus können sich Nierenerkrankungen per Definition als akutes oder chronisches Nierenversagen präsentieren. Bei Akutem Nierenversagen (ANV) handelt es sich um ein klinisches Krankheitsbild, bei dem die Nierenfunktion abrupt einbricht^[167]. Persistieren diese Abweichungen in Struktur und/ oder Funktion für mehr als drei Monate spricht man von chronischem Nierenversagen (CNV)^[45].

Weltweit hat einer von fünf Erwachsenen eine ANV-Episode während eines Krankenhausaufenthaltes^[249]. Bereits eine einzelne ANV-Episode ist mit der Senkung der 10-Jahres-Überlebensrate nach Erkrankung assoziiert^[158]. Geht das ANV mit einer strukturellen Schädigung der Nieren einher, hängt das klinische Ergebnis letztlich davon ab, wie viele Nephrone während der Schädigung irreversibel verloren gegangen sind und wie gut dem Organ die Rekonstitution geschädigter Nephrone in der Regenerationsphase nach der Schädigung gelingt. Bei hohem Schadensmaß und/ oder nur geringfügiger Regeneration progrediert das akute zu einem chronischen Nierenversagen mit tubulärer Atrophie und interstitieller Fibrose^[46].

Laut der International Society of Nephrology (ISN) leiden zwischen 8 und 10 % der Erwachsenen weltweit an einer Form des CNV (<http://www.worldkidneyday.org/faqs/chronic-kidney-disease/>, Stand 12.08.2018). Solche Patienten haben ein drastisch erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz und letale, kardiovaskuläre Komplikationen^[263].

Gerade bei älteren Patienten, die zu der am schnellsten wachsenden Population chronisch Nierenkranker gehören, ist die Therapie mit dem geringsten Mortalitätsrisiko die Nierenersatztherapie (Dialyse)^[214], ein Verfahren, das kostenintensiv und daher besonders in Ländern mit geringem und mittlerem Einkommen nur begrenzt zur Verfügung steht^[185].

1.3 Entzündliche Nierenerkrankungen

Die Definitionen zu ANV und CNV basieren auf der Funktionseinschränkung der Nieren und sind entsprechend wichtig für die Einordnung der Schwere der Erkrankung, die entsprechende Prognose sowie die Wahl der geeigneten Therapie. Über den zugrundeliegenden Pathomechanismus sagen diese Definitionen nichts aus. Die Nieren sind sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen eng mit dem Immunsystem verknüpft^[257]. In der Homöostase reinigen die Nieren das Blut von zirkulierenden Immunmediatoren und bakteriellen Toxinen, was dazu beiträgt die Aktivität des Immunsystems zu regulieren. Darüber hinaus überprüft ein dichtes Netzwerk intrarenaler residenter Immunzellen das Primärfiltrat der Glomeruli auf die Anwesenheit körperfremder Komponenten (Antigene), was ebenfalls direkte Konsequenzen für die Aktivität des Immunsystems hat^[257]. Darüber hinaus tragen die intrarenalen, residenten Phagozyten zum Umsatz extrazellulärer Matrix durch die Sezernierung von Metalloproteinasen sowie zur Beseitigung apoptotischer Zellen bei^[194,143].

Durch diese physiologisch wichtige, sehr enge Verzahnung ziehen Entgleisungen des Immunsystems die Nieren oft in Mitleidenschaft, wie z.B. beim Goodpasture-Syndrom, Lupus erythematoses, der membranösen Glomerulonephritis oder der idiopathischen interstitiellen Nephritis^[257]. Je nach Schwere und Verlauf entwickeln Patienten mit solchen Erkrankungen des Immunsystems ein ANV bzw. CNV.

In umgekehrter Weise ziehen direkte Schädigungen des Nierenparenchyms, die nicht direkt vom Immunsystem vermittelt wurden, oft eine sterile Entzündungsreaktion nach sich. Dies kann durch Toxine und Medikamente wie z.B. Schwermetalle, Cisplatin oder Röntgenkontrastmittel, als auch durch ischämische Prozesse während einer Sepsis, einem Niereninfarkt oder einer Nierentransplantation vorkommen^[260]. Klinisch stellen sich solche Situation oft als ANV dar.

Ein wichtiger pathophysiologischer Zusammenhang, der bei immunassoziierten (Nieren-) Schädigungen zum Tragen kommt, ist, dass Entzündungen als Reaktion auf Gewebeschädigungen weitere parenchymale Schäden verursachen und die Entzündung somit nicht abklingt, ein Prozess der als Nekroinflammation bezeichnet wird^[277,183].

Sowohl bei akutem als auch chronischem Nierenversagen richtet sich die Therapie nach den Komplikationen und ist symptomatisch. Dies beinhaltet auch den Einsatz von Nierenersatzverfahren. Darüber hinaus werden im Sinne einer kausalen Therapieform bei Nierenerkrankungen mit Beteiligung des Immunsystems immunsuppressive Medikamente zur Reduktion intrarenaler Entzündungsprozesse eingesetzt^[281]. Dabei spielt zunächst keine Rolle, ob die Entzündung primär ursächlich für den Nierenfunktionsverlust war, oder sekundär als Antwort auf die Gewebeschädigung einsetzte.

Seit den ersten Behandlungserfolgen bei immunvermittelten Nierentransplantatabstoßungen mit Azathioprin in den 1960er Jahren^[37,184] wurden verschiedene Strategien entwickelt, um Entzündungsreaktionen bei Nephritiden verschiedener Genese entgegenzuwirken. Dabei wurde und wird versucht, auf verschiedene Komponenten des Immunsystems Einfluss zu nehmen, so z.B. T-Zellen (anti-TCR Antikörper, Calcineurin- und Kostimulations-Inhibitoren), B-Zellen (anti-MS4A1/CD22 Antikörper, B-Zell-Differenzierungs- und Plasmazell-Proteasom-Inhibitoren), Komplementproteine (anti-C5 Antikörper), Zytokine (Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten, Janus-Kinase-Inhibitoren, spezifische Antikörper), Chemokine (CCR4/ CCR5- Antagonisten) oder Zelladhäsionsmoleküle (S1P-Rezeptor 1 Modulatoren)^[281]. Diese Auflistung zeigt bereits, dass das Immunsystem viele Zielstrukturen bietet, die - auch im Rahmen entzündlicher Nierenerkrankungen - potentiell pharmakologisch moduliert werden können, um seine Aktivität zu regulieren.

Grundsätzlich hat das Immunsystem die Aufgabe, die funktionelle Integrität des Körpers aufrechtzuerhalten. Die Initialisierung und Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion ist entscheidend für die Beseitigung von pathogenen Mikroorganismen. Die dazu eingesetzten Effektormechanismen sind sehr potent und schädigen, bzw. töten nicht nur Pathogene sondern auch umliegendes Gewebe des Wirtes. Im Falle von Infektionen sind diese Kollateralschäden ein verhältnismäßig kleiner Preis für das in Schach halten einer potentiell lebensbedrohlichen Situation. Eine Immunreaktion im Kontext steriler Entzündungen - also in Abwesenheit von Pathogenen - induziert genauso parenchymale Schäden ohne jedoch gegen den primären, nicht-infektiösen Stimulus vorzugehen, sodass die dominante Auswirkung der Immunaktivierung in diesem Fall der Verlust gesunden Gewebes ohne zugrundeliegenden Schutz der Integrität des Wirtes ist^[216].

Diese maladaptive Reaktion des Immunsystems, die im Falle der Nieren einen gewichtigen Beitrag zur Entwicklung von ANV, CNV und terminalem Nierenversagen leisten kann, ist Gegenstand intensiver immunologischer und nephrologischer Forschung. *Web of Science* (<https://wcs.webofknowledge.com>) zählte allein im Jahr 2018 2177 Publikationen zum Thema Entzündung und Niere (Suchbegriffe "inflammation" und "kidney"). Das starke Interesse an diesem Themengebiet hängt vor allem damit zusammen, dass weiterhin ein großer medizinischer Bedarf an effektiven therapeutischen Ansätzen zur Eindämmung Immunsystem-vermittelter Nierenschäden besteht.

Auch die vorliegende Arbeit beschäftigt sich experimentell mit unterschiedlichen Nierenerkrankungen bei denen pro-entzündliche Prozesse und die Aktivierung des Immunsystems zu den grundlegenden Pathomechanismen gehören und deren Entstehung nicht mit dem Einfluss pathogener Mikroorganismen zusammenhängt.

1.4 Die Immunantwort bei akuter und chronischer Nierenschädigung

Klassischerweise wird das Immunsystem in die angeborene (innate) und die erworbene (adaptive) Immunität untergliedert (Abb. 2). Während erstere in allen Individuen zu jeder Zeit gegeben ist und eine schnelle und breit gefächerte Immunantwort vermittelt, ermöglicht zweitere durch die Selektion antigenspezifischer Lymphozytenklone und die Ausbildung eines Immungedächtnisses eine zeitlich versetzte, aber dafür spezifischere - und damit effizientere - Antwort auf einen immunogenen Stimulus^[122].

Polly Matzinger vertrat 1994 erstmalig die Hypothese, dass das Immunsystem nicht nur für die Unterscheidung zwischen körpereigenem und -fremden Material sondern auch für die Erken-

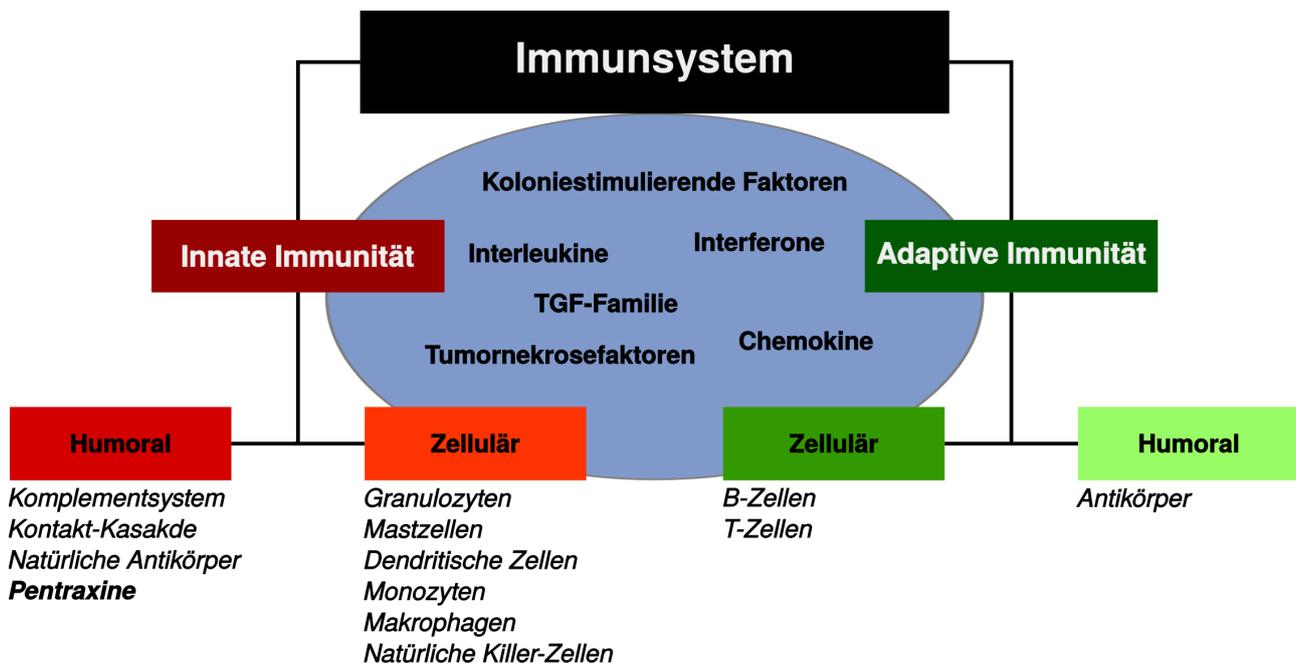


Abbildung 2: Systematische Untergliederung des Immunsystems in Mensch und Maus. Beide Arme des Immunsystems, die innate (links) und die adaptive Seite (rechts), beinhalten jeweils sowohl humorale als auch zelluläre Komponenten. Die einzelnen Zelltypen und löslichen Mediatoren beider Arme erfüllen im Organismus während Homöostase bzw. Immunantwort teils überlappende und teils sich ergänzende Funktionen, im Bezug auf zeitliche Dynamik, Lokalisation und Effektorfunktion.

nung körpereigener Gefahrensignale verantwortlich ist^[173]. Ein solches Gefahrensignal kann jedes körpereigene Molekül sein, das während, nach oder auf Grund einer Schädigung in einem Kompartiment vorkommt, in dem es normalerweise nicht anzutreffen ist, so z.B. nukleäres Material im Extrazellularraum^[235]. Diese Biomoleküle werden unter dem Begriff "Gefahren- bzw. Schaden-assoziierte molekulare Strukturen" zusammengefasst (engl.: danger/ damage associated molecular patterns, DAMPs). Dieser Name wurden analog zu den zuvor definierten "Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen" gewählt (engl.: pathogen associated molecular patterns, PAMPs), die als die klassischen körperfremden Stimuli verstanden werden, welche eine Abwehrreaktion einleiten können^[122]. Dazu zählen u.a. Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycane, Flagellin, mikrobielle Ribo- und Desoxyribonukleinsäuren (RNS bzw. DNS, engl.: RNA bzw. DNA) und Virushüllen und deren Kapside^[122].

Die Reaktion des Immunsystems auf PAMPs und DAMPs ist ein vielschichtiger Prozess, dessen Verlauf und Ergebnis vom betroffenen Organsystem sowie der Schwere des Pathogenbefalls bzw. des primären Schadens abhängen kann. Entsprechend dem Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden ein idealtypischer Verlauf einer ANV-assoziierten, sterilen, renalen Entzündungsreaktion beschrieben, wie er in der Literatur zu finden ist^[135,237,144,211,258].

Ausgehend von der Homöostase (Abb. 3A) erleidet die Niere z.B. im Rahmen einer ischämischen Episode oder einer Intoxikation mit Medikamenten einen parenchymalen Schaden. In dessen Folge setzen die geschädigten Zellen DAMPs, wie z.B. High-Mobility-Group-Protein B1, Histone, Hitzeschockproteine, Fibronektin und Biglykan^[144], in den Extrazellularraum frei (Abb. 3B). Sie haben sowohl direkte Auswirkungen auf den Verlauf der Organschädigung als auch auf den Entzündungsprozess. Über die Aktivierung des NOD-like Rezeptor Protein 3 (Nlrp3) und die nachgeschaltete Bildung des Nlrp3-Inflammasomes können manche DAMPs eine regulierte Form des Zelltods auslösen^[22]. Ebenso wirken extrazelluläre Histone über ihrer stark positive Gesamtladung,

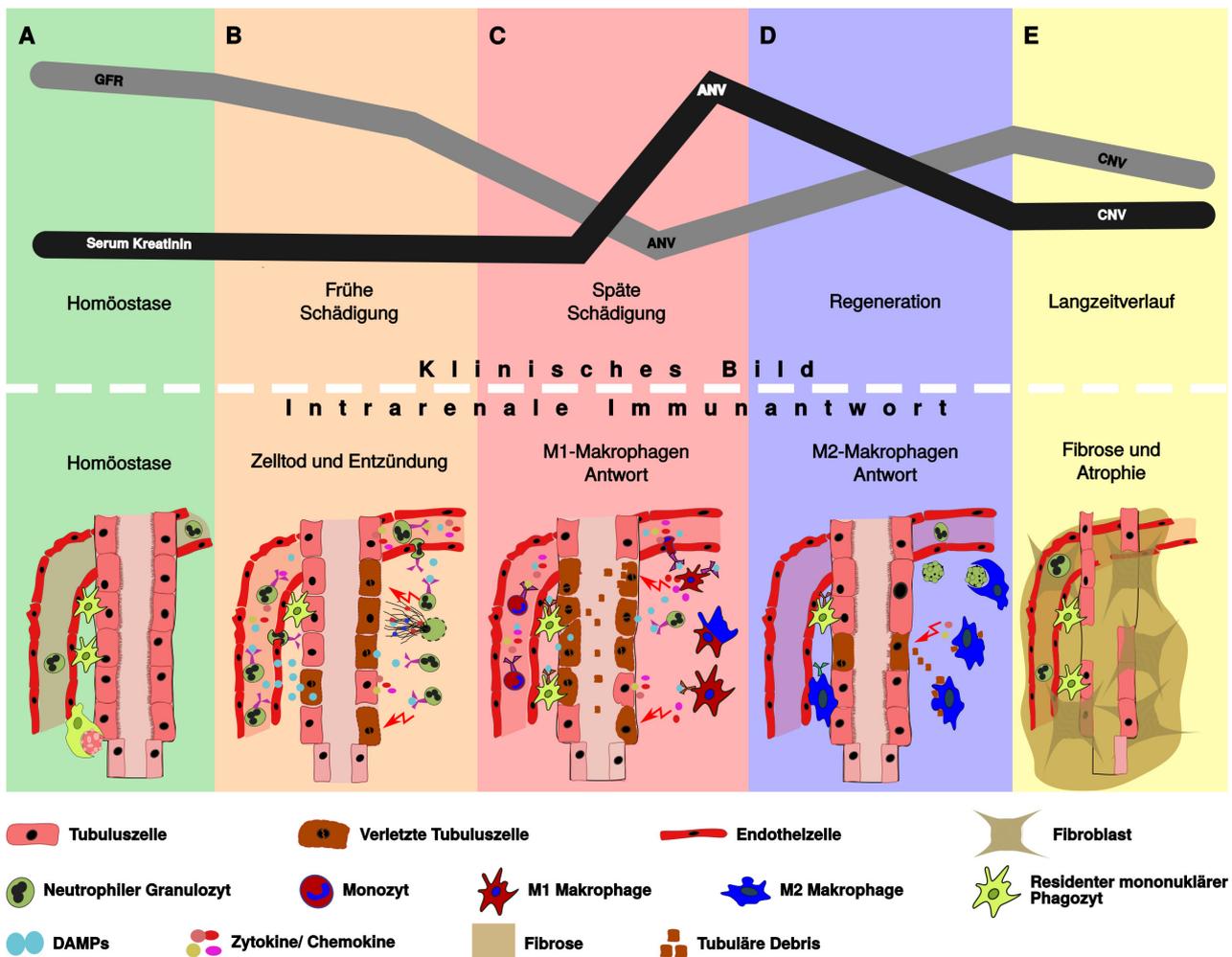


Abbildung 3: Idealtypischer Verlauf einer ANV-assoziierten, sterilen, renalen Entzündungsreaktion. Der obere Teil der Graphik zeigt den klinischen Verlauf der exkretorischen Nierenfunktionsparameter Serumkreatinin und Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bei einer zugrundeliegenden, sterilen Entzündungsreaktion, deren Ablauf im unteren Teil an Hand eines Tubulussegmentes mit peritubulärer Kapillare dargestellt ist. (A) Homöostase: Gesundes Nierenparenchym mit residenten Phagozyten, die apoptotische Nierenzellen beseitigen, und in den Gefäßen patrouillierenden Neutrophilen. (B) Frühe Schädigung/ Zelltod und Entzündung: Verletzte Tubuluszellen setzen DAMPs und Zytokine frei, die Neutrophile aus dem Endothel anlocken und Immun- und Parenchymzellen schädigen. Parallel fängt die exkretorische Nierenfunktion (GFR) an abzunehmen, das Serumkreatinin zeigt noch keine Veränderungen. (C) Späte Schädigung/ M1-Makrophagen Antwort: Infiltrierende Monozyten differenzieren im pro-entzündlichen Milieu der geschädigten Niere zu M1-Makrophagen, die wiederum pro-entzündlich wirken. Das Ende dieser Phase markiert der Phänotypen-Wechsel von M1- zu M2-Makrophagen. Klinisch bricht die Nierenfunktion durch die fortlaufende Entzündung und Gewebeschädigung vollständig ein. Die GFR erreicht ihren Tiefpunkt, das Serumkreatinin steigt auf seinen Höhepunkt. (D) Regeneration/ M2-Makrophagen Antwort: Die Transformation der Makrophagen zu einem M2-Phänotyp bringt Entzündungsresolution und Beseitigung von geschädigten Immun- und Nicht-Immunzellen sowie deren Zelldebris. Verlorene Parenchymzellen werden - soweit möglich - durch Hyperplasie oder Hypertrophie benachbarter Zellen ersetzt. Die Nierenfunktionen beginnen sich zu erholen. (E) Langzeitverlauf/ Fibrose und Atrophie: Parallel zur epithelialen Heilung (hier nicht dargestellt) expandieren eingewanderte Fibroblasten und sezernieren Bestandteile extrazellulärer Matrix (Fibrose) zur Stabilisierung erhaltener und zur räumlichen Kompensation verlorengegangener Strukturen. Verändert nach Kundert et al.^[143]

die zu einer Depolarisation der Zellmembran und einer Zellyse führen kann, direkt zytotoxisch^[240]. Diese Zusammenhänge werden in der Literatur als positiver Feedback-Loop verstanden, in dem jede Form von Zelltod, die zur Freisetzung von DAMPs in den Extrazellularraum führt weiteren Zelltod induziert (Abb. 3B)^[183].

Darüber hinaus - und im Einklang mit der Hypothese von Polly Matzinger - werden DAMPs genauso wie PAMPs von Keimbahn-kodierten Mustererkennungsrezeptoren (engl.: pattern recognition receptors, PRRs) des angeborenen Immunsystems erkannt und als Signale verarbeitet^[254]. Diese Rezeptoren können membrangebunden, intrazellulär oder auch in löslicher Form vorkommen^[140]. Zu den wichtigsten zählen die membranständigen Toll-ähnlichen Rezeptoren (Toll-like receptors, TLRs)^[253], die bereits erwähnten zytosolischen NOD-ähnlichen Rezeptoren (nucleotid-binding oligomerization domain-like receptors, NLRs)^[39] und eine Reihe Zell-ungebundener, löslicher Moleküle, wie etwa die Proteine des Komplementsystems, natürliche Antikörper und Pentraxine^[138]. Dabei werden diese PRRs nicht nur von Immun- sondern auch von Nicht-Immunzellen exprimiert, so z.B. von renalen Parenchymzellen^[255,89,99].

Die Aktivierung von PRRs in und auf renalen Parenchymzellen sowie intrarenalen mononukleären Phagozyten leitet die Immunantwort auf den parenchymalen Gewebeschaden ein^[144,12]. Die Zellen sezernieren Chemokine, wie z.B. CXCL1, CXCL8, CCL2 und CCL5, die eine pro-entzündliche Reaktion und die Rekrutierung von weiteren Immunzellen - welche die entsprechenden Chemokinrezeptoren exprimieren - aus der Blutzirkulation sowie den lymphatischen Organen in die geschädigten Nieren vermitteln (Abb. 3B&C)^[26,144].

Die Rekrutierung von Immunzellen jeder Art in die Nieren wird durch die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf der luminalen Seite renaler Endothelzellen ermöglicht. Dazu gehören vornehmlich das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1 (engl.: intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1), das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (engl.: vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1), Selektine und der Fraktalkinrezeptor CX3CR1^[135,213].

Die evolutionär und phylogenetisch übergreifend konservierte, primäre Funktion der infiltrierenden Immunzellen ist es, den schädlichen Stimulus zu erkennen und zu beseitigen^[122]. Sind Pathogene die primäre Ursache für diese Aktivierung, schützen die Effektorzellen vor der weiteren Ausbreitung des Mikroorganismus und den damit verbundenen Schäden. Im Falle steriler Entzündungen können die Zellen diese Aufgabe nicht erfüllen, da ein zu bekämpfender Fremdkörper fehlt^[216].

Zu den Immunzellen, die in der frühen Phase der Entzündung in das geschädigte Organ einwandern, werden klassischerweise neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen und Monozyten gezählt, Zellen der innate Immunität (Abb. 3B)^[211,279]. Zellen der adaptiven Immunität folgen zeitverzögert, wobei T-Lymphozyten wiederum die ersten Zellen dieser Art sind, die in die entzündeten Nieren einwandern^[159]. Neutrophile sezernieren unter entzündlichen Bedingungen weitere pro-entzündliche Zytokine, Chemokine und reaktive Sauerstoffspezies, die ihrerseits noch mehr Immunzellen in die Niere locken, oder direkt zytotoxisch auf das umliegende Gewebe wirken^[143,161]. Neutrophile können auch eine besondere Form des Zelltodes zeigen, welche zur plötzlichen Ausschüttung sämtlicher Zellbestandteile in den Extrazellularraum führt. Dort fungieren diese wiederum als DAMPs (Abb. 3B)^[190]. Dies kann unter anderem als Reaktion auf pro-entzündliche Zytokine wie etwa den Tumornekrosefaktor (TNF) oder Interleukin 18 (IL-18) geschehen^[161]. Diese Prozesse treiben den positiven feedback-loop aus Zelltod und Rekrutierung von Immunzellen - die Nekroinflammation - zunächst weiter an^[183] und weiten damit die Kollateralschäden auf umliegendes, primär nicht geschädigtes Gewebe aus. Tatsächlich betrifft diese Ausweitung nicht nur die Niere, sondern auch andere Organsysteme. In den Nieren freigesetzte DAMPs können mit der Blutzirkulation z.B. in die Lunge gelangen, wo sie ebenfalls Zelltod und eine Aktivierung des Immunsystems induzieren können^[213,94,189].

In der späten Schädigungsphase werden CC-Chemokin Rezeptor 2 (Ccr2) exprimierende Monozyten durch die freigesetzten DAMPs und Zytokine in die Nieren gelockt (Abb. 3C). In dem pro-entzündlichen Mikromilieu, das von sterbenden Parenchymzellen und aktivierten Immunzellen generiert wird, differenzieren die Monozyten zu sogenannten M1-Makrophagen, die ihrerseits wiederum pro-entzündlich wirken^[92,170]. Die andauernde Nekroinflammation in den Nieren macht sich spätestens hier klinisch als kritischer Abfall der Nierenfunktionen bemerkbar, was in Abbildung 3 an Hand der exkretorischen Nierenparameter der glomerulären Filtrationsrate und dem Serumkreatinin exemplarisch gezeigt ist (Abb. 3C).

Das herrschende Mikromilieu in den Nieren ändert sich über die Zeit (Abb. 3D), wobei die molekularen Ursachen zum Teil noch nicht vollständig verstanden sind^[143,258]. Die Expression und Aktivität pro-entzündlicher Mediatoren (z.B. TNF, Interferon γ (IFN γ), Interleukine (IL-) 1b, 6, 17a und 23, Komplementfaktoren) nimmt zu Gunsten einer gesteigerten Expression anti-inflammatorischer und pro-regenerativer Biomoleküle (z.B. IL-4 und 10, Transforming Growth Factor β 1, Hämoxygenase 1) ab^[106,290]. Diese Faktoren werden ebenso von residenten als auch infiltrierten Immunzellen sezerniert und begünstigen die Entzündungsresolution und Heilung des verletzten Gewebes^[143]. Nach heutigem Verständnis ist die Balance aus pro- und anti-entzündlichen Mediatoren für das Ausmaß des Schadens und die Kapazität zu Regeneration bei einer akuten Nierenschädigung ausschlaggebend^[144]. Ein wichtiges Ereignis in der Veränderung des Mikromilieus stellt der Phänotypenwechsel von M1-Makrophagen zum sogenannten alternativ aktivierten M2-Phänotyp dar. Für die Niere konnte gezeigt werden, dass die IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase 3 (IRAK-3) eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielt^[150,247]. Die Kapazität der Makrophagen diesen Phänotypenwechsel zu vollziehen, beeinflusst den weiteren Verlauf maßgeblich, da die M2-Makrophagen zu Entzündungsresolution, Angiogenese, Beseitigung von Zelldebris und Geweberestrukturierung beitragen können (Abb. 3D)^[95,143]. Es wird diskutiert, ob ein möglicher Auslöser für den M1-M2-Übergang u.a. die Beseitigung apoptotischer Neutrophilen ist^[278,143]. Hier ist wichtig zu erwähnen, dass das M1-M2-Makrophagen-Paradigma vornehmlich aus Zellkulturexperimenten heraus entwickelt wurde und sich nach Stand des Wissens *in vivo* weniger extreme Phänotypen sondern vielmehr ein Kontinuum aus Zuständen zwischen dem pro-entzündlichen M1 und dem anti-entzündlichen M2 darstellen^[172]. Das Konzept behält in der gängigen Fachliteratur jedoch immer noch seine Gültigkeit.

Die Resolution der Entzündung ist die Grundvoraussetzung für das Einsetzen von epithelialer Heilung und der Wiederherstellung der kompromittierten Barrierefunktion^[149,10]. Nach heutigem Verständnis besteht die Regeneration von renalen Tubuluszellen aus zwei Aspekten. Zum einen durchlaufen differenzierte Zellen, die den akuten Schaden überlebt haben, mehrfach unvollständige Zellzyklen (Endozyklen)^[148]. Dies führt zum Zellwachstum und einer erhöhten Funktionalität der Zelle (Hypertrophie). Zum anderen kommt es zu Proliferation vereinzelter renaler Vorläuferzellen, was einen wichtigen Beitrag zur Kompensation verlorener Nierenzellen leistet (Hyperplasie)^[148]. Neben der epithelialen und endothelialen Regeneration spielt die mesenchymale Heilung eine wichtige Rolle (Abb. 3E). Die Sekretion von Kollagenen und anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix durch Fibroblasten ist für die Stabilisierung der übriggebliebenen Nephrone unabdingbar. Fibrose schließt die Lücken im Gewebe, die durch den Verlust von Tubulusabschnitten entstanden sind^[285,11]. Der funktionale Langzeitverlauf hängt maßgeblich davon ab, wie schwer der initiale Schaden und die anschließende Immunantwort waren^[211], also davon, wie viele Nephrone überlebt haben oder regeneriert werden konnten^[143]. Bei einer schweren ANV-Episode, die mit großflächiger mesenchymaler

Heilung verbunden ist, ist die Entwicklung einer subsekquenten chronischen Niereninsuffizienz, die sich in einer progredienten Funktionsverschlechterung äußert, sehr wahrscheinlich^[144,47].

Therapeutische Ansätze zu finden, die das Fortschreiten von ANV zu CNV aufhalten, oder zumindest verlangsamen, ist ein wichtiges Ziel der translationalen Nierenforschung. Hierbei ist die Modulation der Immunantwort ein naheliegender und potentiell vielversprechender Ansatz. Auf Grund der Komplexität und Plastizität des Immunsystems ist jedoch die Entzündung als solche in ihrer Gänge von Initiation bis zur Resolution noch nicht abschließend verstanden^[212,183], sodass die Identifikation neuer therapeutischer Ziele andauert. Weiterhin ist auch die Re-Evaluierung bereits bekannter Therapeutika im Kontext anderer Erkrankungen als der ursprünglich avisierten ein andauerndes Thema^[52], mitunter auch in der Nephrologie^[245]. Zu diesem Prozess zählt auch zu hinterfragen, ob ein Therapeutikum in unterschiedlichen Erkrankungsmodellen mit ähnlichen Pathomechanismen oder in unterschiedlichen Mausstämmen vergleichbare Ergebnisse liefert. Dadurch lassen sich verlässlichere Rückschlüsse auf die Generalisierbarkeit des zugrundeliegenden Wirkmechanismus ziehen. Dieses Konzept wurde in der vorliegenden Arbeit für das Protein Pentraxin 3 verfolgt.

1.5 Pentraxin 3

Das Akute-Phase Protein Pentraxin 3 (Ptx3) wurde erstmalig 1990 durch Lee et al.^[154] beschrieben. Heute ist es als PRR des humoralen Arms des angeborenen Immunsystems mit nicht-redundanten Funktionen etabliert^[59].

Ptx3 gehört zur Familie der Pentraxine, die allesamt den Akute-Phase-Proteinen zuzuordnen sind. Sie sind phylogenetisch stark konserviert, mit nachgewiesenen orthologen Proteinen in Mensch, Maus (*Mus musculus*), Huhn (*Gallus gallus*) sowie andern Vertebraten wie z.B. Zebrafisch (*Danio rerio*) und Eidechse (*Anolis carolinensis*)^[171]. Gemeinsam haben sie eine etwa 200 Aminosäuren (AS) lange Domäne mit der sogenannten Pentraxin-Signatur aus Histidin-X-Cystein-X-Serin/Threonin-Tryptophan-X-Serin (X=beliebige AS)^[85]. Die Primärsequenzen von humanem und murinem Ptx3 decken sich zu 92%, was auf einen starken evolutionären Druck dafür hindeutet, Struktur und Funktion des Proteins zu erhalten^[115,86]. Eine substantielle Sequenzhomologie zwischen Mensch und Maus zeigt sich in ähnlicher Weise in anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie, namentlich dem C-reaktiven Protein (CRP) und dem Serum Amyloid P (SAP, bzw. APCS)^[85].

Die Familie wird grundsätzlich in kurze und lange Pentraxine untergliedert. Die kurzen Pentraxine CRP (Abb. 4A-B) und SAP liegen bei Maus und Mensch auf dem gleichen Genabschnitt des Chromosoms 1^[156]. Wie auch andere Akute-Phase Proteine wird CRP ausschließlich in der Leber produziert und ins Blut sezerniert, wo es als Opsonin im Extrazellularraum Fremdproteine bindet^[225]. Bindet CRP an Zellmembranen leitet es entweder direkt eine Zytolyse ein oder markiert die Zellen für die Beseitigung durch Phagozytose^[88]. Die Expression von CRP wird spezifisch durch LPS, IL-1b oder TNF stimuliert^[225]. Bei Entzündungsprozessen steigt der CRP-Serumspiegel innerhalb weniger Stunden signifikant an, was es zu einem weit verbreiteten Entzündungsmarker in der klinischen Biochemie macht^[201]. Sein Sekretionsverhalten, die Fähigkeit zur Opsonisierung und die zytolytischen Effekte ähneln sehr dem der Komplementfaktoren, mit welchen CRP gemeinsam wichtige Funktionen bei der Pathogenbekämpfung, Entfernung toter Zellen und Regulation von Entzündungsprozessen hat^[225].

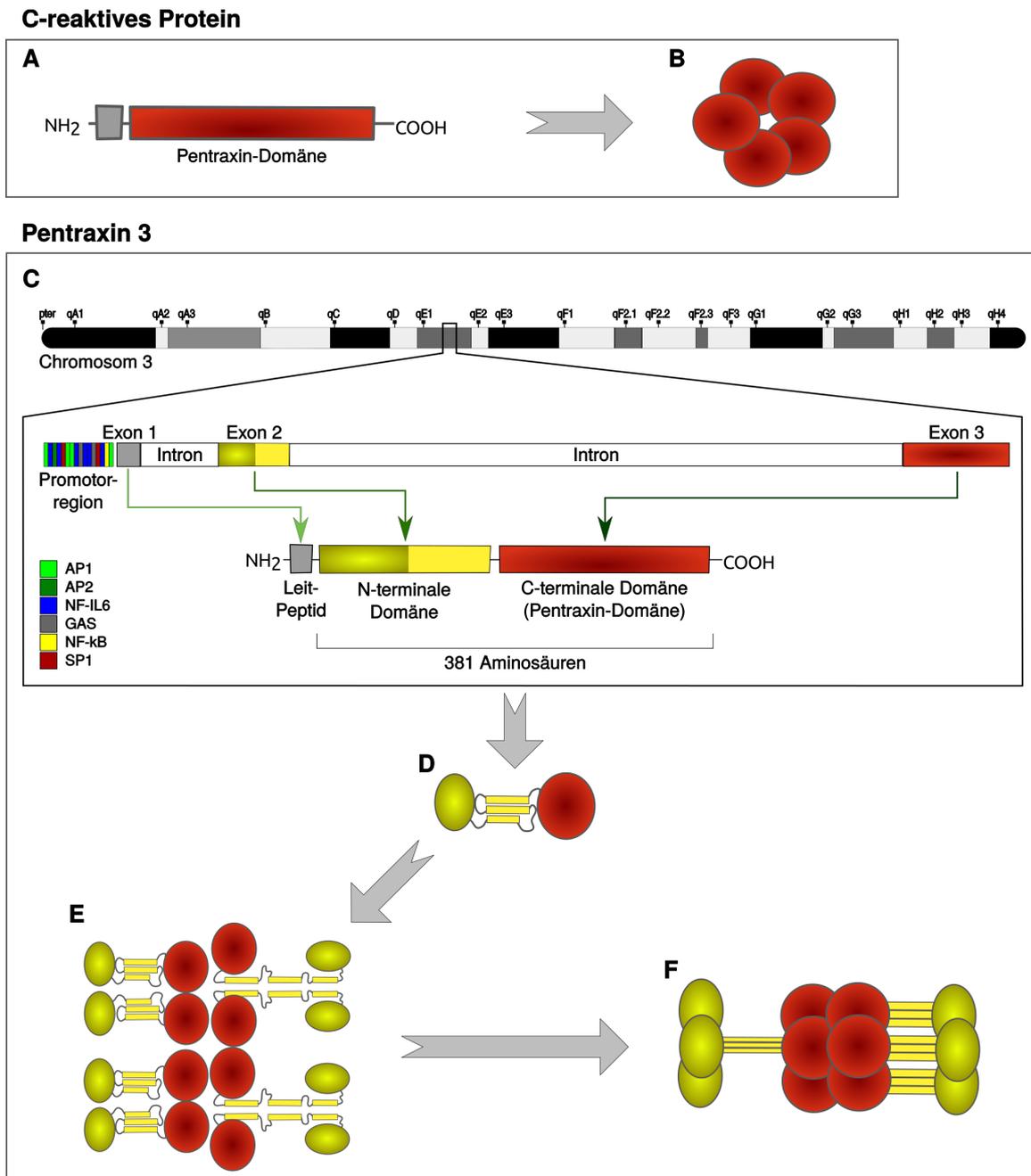


Abbildung 4: Strukturmodelle der Pentraxine CRP und PTX3. (A) CRP ist das prototypische kurze Pentraxin, an Hand dessen die Pentraxin-Domäne definiert wurde. (B) Die Quartärstruktur von CRP setzt sich aus fünf ringförmig angeordneten, globulären Monomeren zusammen. (C) Das *PTX3*-Gen liegt auf Chromosom 3 und wird auf Grund seiner C-terminalen Aminosäuresequenz (Exon 3), die fast vollständig homolog zu der von CRP ist, der Pentraxin-Familie zugeordnet. Die N-terminale Region ist zu keiner bekannten Aminosäuresequenz homolog (Exon 2)^[31]. Acht *PTX3*-Monomere (D) verbinden sich über Disulfidbrücken zu einer asymmetrischen Quartärstruktur mit zwei unterschiedlich großen Domänen (E-F). Verändert nach Daigo et al.^[59].

Ptx3 ist das prototypische Mitglied der Unterfamilie der langen Pentraxine (Abb. 4C-F)^[116,86]. Darüber hinaus zählen hierzu auch Pentraxin 4 (Ptx4)^[171], die neuronalen Pentraxine 1 und 2 (Nptx1, Nptx2)^[230,105,199] sowie der neuronale Pentraxinrezeptor (Nptxr)^[13]. Nptx1, Nptx2 sowie Nptxr werden ausschließlich in Zellen des Nervensystems exprimiert und sind bei Mensch und Maus auf unterschiedlichen Chromosomen zu finden. Alle drei Proteine wurden als Regulatoren neuronaler Plastizität identifiziert und spielen bei Neuroinflammation nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung

eine Rolle^[286,104,209,153,251]. Über Ptx4 ist noch nicht viel bekannt, außer dass es unabhängig von Ptx3 reguliert wird und nicht oder nur geringfügig durch LPS oder IL-1b induzierbar ist^[171]. Unter den langen Pentraxinen ist Ptx3 das am besten charakterisierte und in seiner Funktion bisher am besten verstandene.

Das Gen des langen Ptx3 liegt bei Mensch und Maus auf dem Chromosom 3^[85]. In beiden Spezies besteht das Gen aus 3 Exonen, die für das Leitpeptid (Exon 1), eine spezifische N-terminale Domäne (Exon 2, 160 AS) und die C-terminale Pentraxin-Domäne (Exon 3, 202 AS) kodieren (Abb. 4C). Während sich die Monomere des kurzen Pentraxins CRP zu einem namensgebenden, ringförmigen Pentamer zusammenschließen (Abb. 4B), aggregieren die je 381 AS langen Ptx3-Monomere zu einem asymmetrischen, als kelchförmig beschriebenen Oktamer von insgesamt ca. 340 kDa, wie Strukturanalysen aus Small-angle X-ray Scattering-Experimenten zeigen (Abb. 4F)^[113,110]. Ptx3 ist nur an einer Stelle seiner Aminosäuresequenz glykosyliert (Asn220) und weist hier einen komplexen, mehrfach verzweigten fucosylierten und sialinierten Zuckerbaum auf^[111].

In den proximalen Promotoren des humanen und des murinen *Ptx3*-Gens finden sich verschiedene regulatorische Elemente, wie z.B. *AP1*, *AP2*, *NF-IL6*, *GAS*, *NF-κB* und *SP-1* (Abb. 4C). Während *AP1* die basale *Ptx3*-Expression vermittelt, sorgt die NF-κB-Bindungsstelle für seine Hochregulation unter pro-entzündlichen Bedingungen^[34,8,19]. Ptx3 wird während Homöostase und Entzündung nicht wie CRP in der Leber, sondern von Leukozyten, Adipozyten, Endothelzellen sowie Epithelzellen der Lunge und des Urogenitaltraktes gebildet und sezerniert (Abb. 5)^[85]. Neutrophile Granulozyten exprimieren *Ptx3* mRNA nur während ihrer Differenzierung im Knochenmark und speichern das Protein dann in großen Mengen in Laktoferrin-positiven Vesikeln^[120]. Dies führt dazu, dass überall dort, wo aktivierte Neutrophile degranulieren sehr hohe lokale Konzentrationen von Ptx3 erreicht werden können, so z.B. in der frühen Phase nach akutem Myokardinfarkt^[175]. T- und B-Lymphozyten, sowie natürliche Killerzellen produzieren zu keiner Zeit Ptx3^[7].

Bekannte Auslöser der Ptx3-Expression und Sekretion in Immun- und Epithelzellen sind pro-entzündliche Zytokine (z.B. IL-1b, TNF), mikrobielle Strukturen (z.B. LPS, CpG-Nukleotide) sowie intakte Mikroorganismen (z.B. humane und murine Stämme des Influenzavirus)^[75]. Endothelzellen und glatte Muskelzellen exprimieren das Protein nach Stimulation mit oxidierten Lipoproteinen niedriger Dichte sowie anti-inflammatorischen Lipoproteinen höherer Dichte^[208]. IFN γ hingegen reduziert seine Transkription und die Stabilität des *Ptx3*-Transkriptes in dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen^[207,91,72].

Für Ptx3 wurden im Rahmen von *in vitro* und *in vivo* Experimenten in den vergangenen 20 Jahren eine Reihe von Funktionen beschrieben, an Hand derer sich das Protein zunehmend als wichtiges Biomolekül in Immunität und Entzündung, aber auch in Regeneration, Gewebestrukturierung und Tumorbilogie herauskristallisierte (Abb. 5).

In seiner Funktion als Opsonin vermittelt Ptx3 die Erkennung und verbessert die Phagozytose von immunogenen Fremdpartikeln, was experimentell bisher für eine Reihe von pathogenen Pilzen, Bakterien und Viren gezeigt werden konnte^[86,70,242,178,119]. Die genaue Ligand-Ptx3-Interaktion ist dabei bisher nur für *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* und den Influenza-A-Virus beschrieben^[121]. Passend zu den *in vivo*-Befunden wurde beim Menschen eine Assoziation zwischen unterschiedlichen *PTX3*-Allelen und der Suszeptibilität für Aspergillosen festgestellt^[57]. Opsonin-ähnliche Funktionen von Ptx3 - abseits von Mikroorganismen und davon abgeleitet Biomolekülen - wurden auch für apoptotische Zellen gezeigt^[17,118,220].

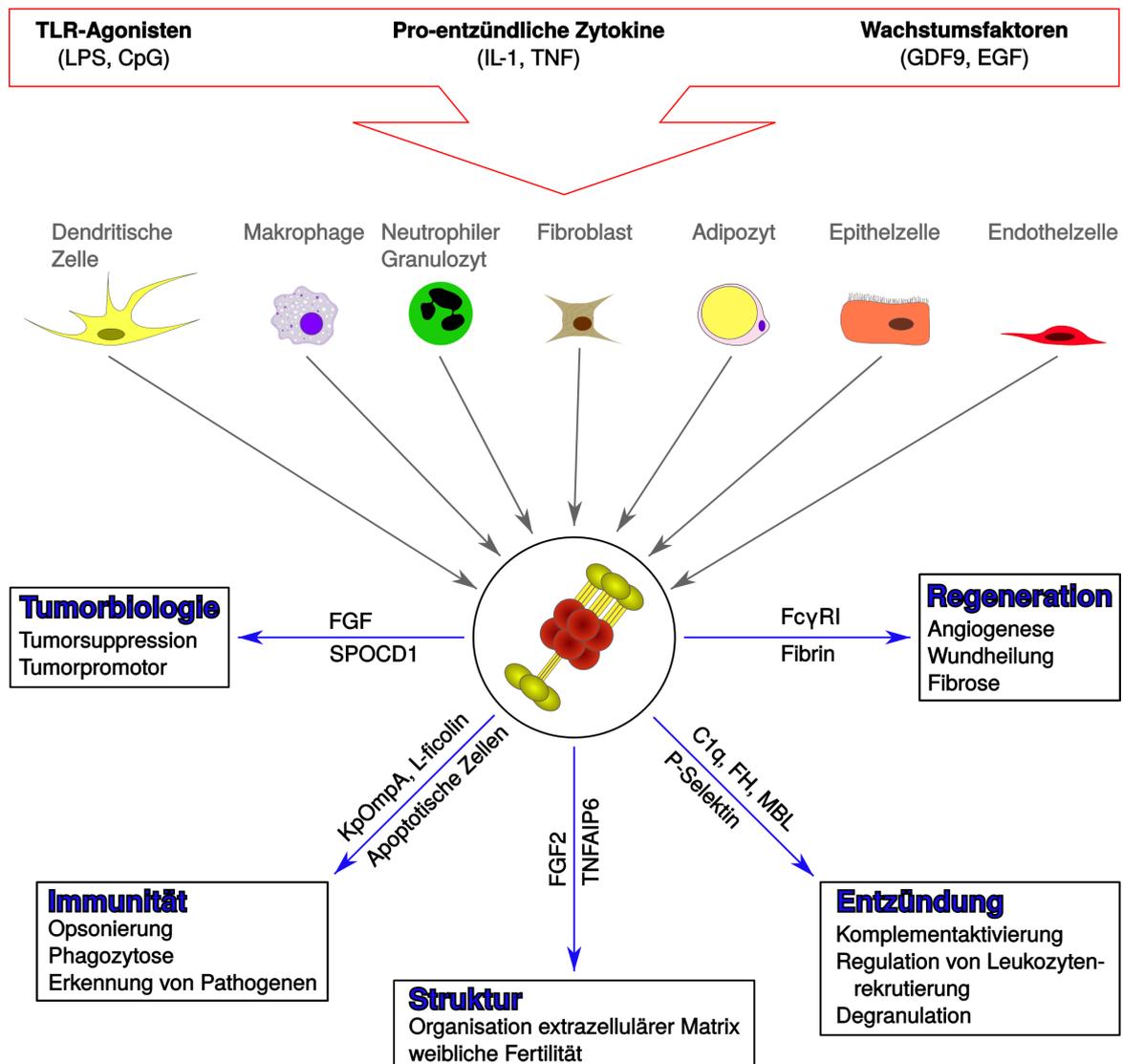


Abbildung 5: Quellen und biologische Effekte von Ptx3. Ptx3 wird als Reaktion auf diverse Agonisten (oben) von einer Vielzahl verschiedener Zellen (Mitte) sezerniert. Über die direkte Interaktion mit anderen Biomolekülen (blaue Pfeile) nimmt Ptx3 Einfluss auf die Bereiche Tumorbilogie, Immunität, strukturelle Stabilität, Entzündung und Regeneration. Verändert nach Garlanda et al.^[87]. Abkürzungen (sofern noch nicht im Text verwendet): GDF9, growth differentiation factor 9; EGF, epidermal growth factor; FGF, fibroblast growth factor; SPOCD1, Spen paralog and ortholog C-terminal domain containing 1; FcγRI: Fc receptor, IgG, high affinity I; KpOmpA, *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A; Tnfaip6, tumor necrosis factor alpha induced protein 6.

Über die direkte Interaktion mit den Komplementproteinen C1q, Faktor H (FH) und dem Mannose-bindenden Lektin (MBL) kann Ptx3 sowohl als Komplement-Aktivator als auch als -Repressor fungieren^[192]. Repressiv auf entzündliche Prozesse wirkt Ptx3 auch über die Blockierung von P-Selektin-Bindungsstellen, die es Immunzellen ermöglichen aus dem Endothel in geschädigtes Gewebe zu infiltrieren^[66].

Zwei Arbeitsgruppen, die unabhängig voneinander *Ptx3*-defiziente Mäuse entwickelten, stellten übereinstimmend fest, dass weibliche *Ptx3*^{-/-} Tiere unfruchtbar sind^[86,269]. Ptx3 bindet im Cumulus oophorus an extrazelluläre Matrixproteine, wie z.B. das TNF-induzierte Protein 6 (TNFAIP6), und ist hier essentiell für die Organisation und Stabilität der Eizellen-umgebenden Matrix^[227].

Die noch wenig umfangreiche Datenlage zur Rolle von Ptx3 in der Tumorbilogie scheint widersprüchlich, da das Protein *in vitro* als Tumorsuppressor^[29] als auch als Tumorpromotor^[292] identifiziert wurde. *In vivo* Experimente stützen derzeit das zweite Ergebnis^[292].

Ptx3 interagiert mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (engl. fibroblast growth factor 2, FGF2) und inhibiert so *in vitro* endotheliale Zellproliferation und analog dazu *in vivo* eine Neovaskularisierung^[196]. Auf der anderen Seite markiert Ptx3 bei leicht saurem pH, wie er in offenen Wunden zu finden ist, den Komplex aus Fibrinogen und Fibrin zum Abbau^[73]. Dies wiederum ist die Grundvoraussetzung für eine effektive epitheliale und endotheliale Regeneration.

Abseits der translationalen Forschung rückt PTX3 seit etwa zehn Jahren zunehmend in den Fokus klinischer Studien. Als Biomarker wird PTX3 bei ischämischem Schlaganfall^[296], akutem Myokardinfarkt^[147], akuter Graft-versus-Host-Reaktion^[61], instabiler Angina pectoris^[114], chronischer Herzinsuffizienz^[139], Takayasu-Arteriitis^[58] und anderen vaskulären Entzündungsreaktionen^[28] diskutiert.

Im Zusammenhang mit sterilen Entzündungen sind die Berichte zur Rolle von Ptx3 in Tierexperimenten nicht eindeutig. Während Ptx3 die Entzündung und Schädigung der intestinalen Mukosa bei akuter mesenterialer Ischämie signifikant verschlimmert^[244,243], scheint es beim experimentellem Myokardinfarkt protektiv zu wirken^[226]. Beide Studien basierten auf der Verwendung von *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Tieren, sowie der Substitution der Defizienz in *Ptx3^{-/-}* Mäusen mit rekombinantem Protein.

1.6 Rolle von Ptx3 bei entzündlichen Nierenkrankheiten

Im Kontext realer Erkrankungen wurde gezeigt, dass Hämodialyse die PTX3-Plasmakonzentration erhöht^[288] und als Indikator für eine peritoneale Entzündung^[132] sowie ein substantiell erhöhtes Risiko für Komorbiditäten fungiert^[74]. Suliman et al.^[248] und Uzun et al.^[265] berichteten über eine unabhängige Assoziation von PTX3-Konzentrationen mit Albuminurie bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Im Kontext von Lupus erythematosus ist eine geringere Prävalenz von anti-PTX3-Autoantikörpern mit einer stärkeren Nierenbeteiligung der Erkrankung assoziiert^[294].

TNF stimuliert humane Mesangialzellen *in vitro* zur Expression von Ptx3, was zur Sekretion proinflammatorischer Mediatoren führt^[36]. Passend dazu ließ sich PTX3 in den Nierenbiopsien von Patienten mit steriler Nierenentzündung (v.a. mesangioproliferativer IgA-Nephritis) vermehrt in glomerulären Endothelzellen, Mesangialzellen und interstitiellen Makrophagen anfärben^[36].

Vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Anders zur Rolle von Ptx3 bei entzündlichen Nierenerkrankungen^[152,151] lieferten die ersten funktionellen Daten in diesem Kontext und zeigten die nicht-redundante Rolle von endogenem Ptx3 bei verschiedenen entzündlichen Pathomechanismen.

Im Lupus Erythematosus-ähnlichen Phänotyp, den B6^{lpr} Tiere spontan entwickeln, führte die Ptx3-Defizienz zu einer Aggravierung der Lungenbeteiligung, die Nierenpathologie hingegen blieb im Vergleich zu Ptx3-kompetenten Kontrolltieren unverändert^[152]. Die Autoantigenlast in B6^{lpr} *Ptx3^{-/-}* Mäusen war deutlich erhöht, was sich dadurch erklären ließ, dass Ptx3 die Phagozytose von potentiell auto-reaktiven T-Zellen unterstützt und so die Autoantigenlast verringert. Die Präsenz von mehr Autoantigenen begünstigt die Entzündungsreaktion und führt zur verstärkten Beteiligung von Immunzellen. Ob die erhöhte Leukozytenzahl in den Lungen von B6^{lpr} *Ptx3^{-/-}* Tieren nur auf die erhöhte Antigenlast oder auch auf Absenz einer Ptx3-vermittelten P-Selektin-Inhibierung zurückzuführen ist, bleibt zunächst unklar.

Für das Modell des renalen Ischämie- und Reperfusionsschadens (engl. renal ischemia reperfusion injury, rIRI), einem etablierten Operations-Verfahren, welches eine profunde sterile Entzündung in der Niere hervorruft, konnte gezeigt werden, dass der aggravierte Phänotyp in *Ptx3*^{-/-} Mäusen durch eine Antikörper-vermittelte P-Selektin-Blockade fast vollständig reversibel ist^[151]. Dieser Befund untermauert vorangegangene Arbeiten von Deban et al.^[66], die zeigen konnten, dass Ptx3 an P-Selektin binden kann und in unterschiedlichen entzündlichen Lungenerkrankungsmodellen P-Selektin-abhängige Neutrophileninfiltration in geschädigtes Gewebe zu unterbinden vermag. Interessanterweise berichteten Chen et al.^[49] bei deutlich milderer ischämischer Schädigung der Nieren ebenfalls eine signifikante Ptx3-Endothel-Interaktion, die den Beobachtungen von Lech et al.^[151] ähnelt. Die geringe strukturelle Schädigung der Nieren sowie die korrespondierende Funktionsverschlechterung, die die Autoren in *Ptx3*^{+/+} Tieren beobachten konnten, war im Gegensatz zum Befund von Lech et al. in *Ptx3*^{-/-} Tieren allerdings noch weniger stark ausgeprägt. Weitere Daten zur Rolle von endogenem Ptx3 in diesem Modell liegen bisher nicht vor, sodass diese Diskrepanz bisher nicht aufgeklärt werden konnte.

Zusammengenommen zeigen diese und die vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe Anders bereits, dass die Rolle von Ptx3 in entzündlichen Nierenpathologien vielschichtig sein kann. Dabei handelt es sich bei dem Protein ohne Zweifel um einen wichtigen Immunmodulator und damit auch um ein potentiell sehr wertvolles Zielmolekül für die Therapie entzündlicher Nierenerkrankungen. Zur besseren Abschätzung der pharmakologischen Relevanz von Ptx3 bei akutem und chronischem Nierenversagen ist allerdings mehr Grundlagenforschung nötig. Es ist davon auszugehen, dass die multiplen immunregulatorischen Effekte von Ptx3 bei unterschiedlichen Nierenkrankheiten additive oder auch sich aufhebende Effekte haben können. Ein Grund dafür könnte auch die P-Selektin-abhängige Blockade der Rekrutierung pro- und anti-entzündlicher Leukozyten sein.

Ob allerdings Ptx3 die Migration anti-inflammatorischer Immunzellen und Fibrozyten in die geschädigte Niere beeinflusst, ist derzeit völlig unbekannt. Es ist an Hand der Datenlage vorstellbar, dass es sich im Gegensatz zu dem durch die Vielzahl von Liganden und Rezeptoren sehr spezifisch organisierten Chemokinsystem bei Ptx3 um einen eher unselektiven Inhibitor der Selektin-vermittelten Zellinfiltration handelt. Dementsprechend wäre denkbar, dass dieses Ptx3-vermittelte und unspezifische Rekrutierungsblockade sowohl in der akuten Schädigungs- als auch in der nachgeschalteten Regenerations- und Entzündungsresolutionsphase aktiv und biologisch relevant ist. Die Arbeit von Lech et al.^[151] belegt, dass Ptx3 in der Akutphase die gerichtete Migration von Leukozyten in die post-ischämische Niere unterdrückt, was die Nierenschädigung begrenzt und durch den Einsatz von rekombinantem humanem PTX3 (rhPTX3) in der Maus therapeutisch nutzbar ist. Die Wirksamkeit dieses Mechanismus wäre auch in anderen entzündlichen Nierenmodellen- als der von Lech et al. untersuchten postischämischen Schädigung - vorstellbar und möglicherweise ebenfalls therapierelevant.

Analog dazu würde die unselektive Inhibierung der Rekrutierung von pro-regenerativen und anti-entzündlichen Immunzellen durch Ptx3 die Heilung verzögern und den Phänotyp insgesamt verschlechtern. Lech, Römmele, Gröbmayer, Eka Susanti, Kulkarni, Wang, Gröne, Uhl, Reichel, Krombach, Garlanda, Mantovani and Anders konnten zeigen, dass die Applikation von rhPTX3 bis zu 6 Stunden nach Reperfusion den Phänotyp immer noch messbar beeinflusst^[151]. Die offensichtliche Frage ist also: Wie groß ist das therapeutische Fenster tatsächlich und welche Effekte würde eine deutlich spätere Intervention mit rhPTX3 nach sich ziehen? Basierend auf den obigen Überlegungen

wäre eine therapeutische Intervention mit rhPTX3 bei zu später Gabe nach entzündlicher Nierenschädigung sogar nicht nur nutzlos sondern sogar kontraproduktiv. Im Hinblick auf die Validierung von rhPTX3 als mögliches Pharmakon zur Therapie von entzündlichen Nierenerkrankungen ist die Präzisierung des therapeutischen Fensters ein wichtiger Gesichtspunkt.

Ebenfalls entzündlich verlaufende Nierenschädigungen, die einen chronischen Charakter aufweisen, folgen einer anderen Dynamik. Hier sind Schädigung und Regeneration Prozesse, die fortwährend parallel zueinander ablaufen^[11]. Entsprechend verhält sich die Infiltration von Immunzellen. In so einem Kontext ist unter Annahme der unspezifischen Inhibierung der Leukozytenrekrutierung durch Ptx3 eine Prognose über den Effekt einer therapeutischen Intervention mit rhPTX3 nicht abzuschätzen. Nichts desto weniger bleibt die Frage relevant, ob Ptx3 auch bei CNV ein therapeutisches Zielmolekül bzw. mögliches Pharmakon darstellt.

1.7 Zielsetzung der Arbeit und Hypothesen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, basierend auf den Vorarbeiten zu Ptx3 bei post-ischämischen Nierenversagen, die Rolle des Akute-Phase Proteins in einem weiter gefassten Kontext entzündlicher Nierenerkrankungen und unter Einbeziehung zeitlicher Aspekte zu beschreiben. Die Hypothesen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, sind:

- (A) Therapeutisch eingesetztes rhPTX3 wirkt nicht nur im Modell der rIRI, sondern auch in anderen entzündlichen Nierenmodellen, protektiv.
- (B) Dieser Effekt tritt nur bei Intervention in der akuten Schädigungsphase in Kraft, während die therapeutische Intervention mit rhPTX3 in der Regenerationsphase nach der Schädigung ungünstige Effekte zeigt.
- (C) Bei einem entzündlichen, chronisch verlaufenden Modell ist die Rolle von Ptx3 komplexer und andere immunmodulatorische Eigenschaften von Ptx3 jenseits seines Einflusses auf die Immunzellrekrutierung beeinflussen den Phänotyp.

1.8 Arbeitsplan und Strategie

Zur Überprüfung der aufgestellten Hypothese, dass therapeutisch eingesetztes rhPTX3 nur bei Intervention in der akuten Schädigungsphase nicht aber in der Regenerationsphase nach der Schädigung günstige Effekte zeigt, sollte die rIRI als Modell dienen. Während toxisch-entzündliche Nierenmodelle oftmals einen Verlauf mit progredienter Schädigung nach Modellinduktion zeigen, in dem sich Schädigungs- und Regenerationsprozesse noch vor Erreichen des maximalen Schadens parallel ereignen, ist die Schädigung bei IRI zeitlich schärfer begrenzt, sehr gut titrierbar und eine Abgrenzung von Schädigungs- und Regenerationsphase leichter möglich.

Um eine hohe Reproduzierbarkeit des renalen Schadens nach IRI zu gewährleisten wurden zunächst Anstrengungen zur Optimierung der technischen Durchführung des Modells unternommen. Basierend darauf wurde der Verlauf nach IRI charakterisiert um den Beginn der Regenerationsphase zu definieren. Diese Vorarbeiten ermöglichten schließlich, die Effekte einer therapeutischen Intervention mit rhPTX3 während der Regenerationsphase nach IRI zu untersuchen.

Zur Identifizierung etwaiger protektiver Effekte von rhPTX3 bei entzündlicher Nierenschädigung über das Modell der renalen IRI hinaus wurden die Rolle von Ptx3 im akuten^[182] und chronischen Oxalatmodell^[181] sowie therapeutische Effekte von rhPTX3 untersucht. Auf Grund der IRI-Vordaten erschien ein protektiver Effekt von rhPTX3 im akuten Oxalatmodell sehr wahrscheinlich. Die Auswirkungen der Ptx3-abhängigen Modulation der Leukozytenrekrutierung bei einem langwierigen entzündlichen Geschehen, in dem sich Schädigungs- und Regenerationsprozesse überlappen, wie es beim chronischen Oxalatmodell der Fall ist, waren im Vorfeld hingegen schwer abzuschätzen. Zudem war zu vermuten, dass andere immunmodulatorische Funktionen von Ptx3 während eines chronisch-entzündlichen Verlaufs eine Rolle spielen könnten.

2 Material

2.1 Tierexperimentelle Methoden

2.1.1 Tierhaltung

Zusammensetzung Standardfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH)

Inhaltsstoffe	Menge
Rohprotein	22,0 %
Rohfett	4,5 %
Rohfaser	3,9 %
Rohasche	6,7 %
Kalzium	1,0 %
Phosphor	0,7 %
Vitamin A	25000 U/kg
Vitamin D ₃	1500 U/kg
Vitamin E	125 mg/kg
Eisen-(II)-sulfat Monohydrat	100 mg/kg
Zinksulfat Monohydrat	50 mg/kg
Mangan-(II)-sulfat Monohydrat	30 mg/kg
Kupfer-(II)-sulfat Pentahydrat	5 mg/kg
Natriumselenit	0,1 mg/kg
Kalziumiodat Anhydrat	2,0 mg/kg

Sonstige Materialien für Tierhaltung

Name	Katalognummer	Firma
H-Temp Polysulfon-Käfig Eurostandard Typ II Long	1284L-00SU	Tecniplast
Innenliegender Gitterdeckel	1284L-116	Tecniplast
Polysulfon (PSU) H-Temp Filterhaube	-	Tecniplast
Autoklavierbare Filterhaube mit Verschlussklammer	1284L-400SUC	Tecniplast
Polycarbonat-Tränkeflaschen	ACBT0252	Tecniplast
Standard Tränkekappe aus Edelstahl	ACCP2521	Tecniplast
Mouse House rot	-	Tecniplast
Einstreu aus Espenholz [190 g/L]	H0234-473	ssniff Spezialdiäten GmbH
Nestlets	NES3600	Ancare
Nagestäbchen aus Espenholz (S-Bricks)	-	Tapvei

2.1.2 Genotypisierung Ptx3-defizienter Mäuse

Probenaufbereitung

Name	Katalognummer	Firma
DirectPCR [®] Lysis Reagent Tail	VIAG102-T	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Proteinase K	1019499	Qiagen GmbH

Ptx3-Primer für genomische DNA

Genotyp	Primersequenz [5' → 3']		Produktlänge [bp]
	Forward primer	Reverse primer	
<i>Ptx3</i> ^{+/+}	CCTGCTTTGTGCTCTCTGGT	GTCCTCGGTGGGATGAAGT	150
<i>Ptx3</i> ^{-/-}	GGGTGGGGTGGGATTAGATA		400

PCR-Materialien

Name	Katalognummer	Firma
Quali-PCR-Tubes	G006-TUCA	Kisker Biotech GmbH
Taq DNA Polymerase	M0273X	New England Biolabs [®] Inc.
10X Standard Taq Reaction Buffer	B99014S	New England Biolabs [®] Inc.
dNTP Set	R0186	Thermo Fisher Scientific Inc.
PTX3 Primer	-	metabion international AG

Agarosegelelektrophorese

Name	Katalognummer	Firma
Agarose	15510-500	Invitrogen Ltd.
peqGREEN DNA/ RNA dye	37-5000	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Low MW DNA Ladder	N3233S	New England Biolabs [®] Inc.
6X DNA Loading	R0611	Thermo Fisher Scientific Inc.

Rezept für 5X TBE-Puffer

Substanz	Konzentration [mM]
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	890
Ethylendiamintetraacetat Natriumsalz	20
Borsäure	890

in ddH₂O, einstellen auf pH 8,3

2.1.3 Narkotisierung, Antagonisierung und Analgesie im Rahmen operativer Eingriffe

Name	Handelsname	Kat.-Nr./ PZN	Firma
Fentanyl	Fentanyl-Janssen [®]	2084366	Janssen-Cilag GmbH
Midazolam	Doricum [®]	4921530	ratiopharm GmbH
Medetomidin	Dorbene vet [®]	07725752	Zoetis GmbH
Naloxon	Naloxon-ratiopharm [®]	4788930	ratiopharm GmbH
Atipamezol	Revertor [®]	8-00732	CP-Pharma
Flumazenil	Anexate [®]	4470990	Hexal AG
Buprenorphin	Buprenovet	01498870	Bayer Vital GmbH
Metamizol-Natrium 1 H ₂ O	Novalgin [®]	0731672	Sanofi-Aventis GmbH

2.1.4 Intraoperative Temperaturkontrolle

Name	Kat.-Nr.	Firma
Thermes-USB Temperature Data Acquisition Seven channel unit	NA	Physitemp Instruments Inc.
RET-3-ISO Isolated Rectal Probe for Mice	NA	Physitemp Instruments Inc.
Kleintier-OP-Tisch	M12511	Medax GmbH
Brutmaschine Brinsea Octagon 20 Advance	32150	J.Hemel Brutgeräte GmbH & Co.KG
Philips INFRARED R95E 100W E27 Wärme-Strahler Health-care	14559840	Philips GmbH

2.1.5 Renale Ischämie- und Reperfusionsoperation

Name	Kat.-Nr.	Firma
Vicryl™ 5-0	V493H	Ethicon Deutschland
Ethibond Excel 5-0	EH7260H	Ethicon Deutschland
Yasargil Aneurysm Clip	58.54.10	Medicon eG
Eye forceps, dressing, half curved	355-101	Integra LifeSciences Services
Knapp iris scissors, curved	360-095	Integra LifeSciences Services
Deba key vascular forceps, cardio-grip, tissue angled	320-105	Integra LifeSciences Services
Panthenol-Augensalbe JENAPHARM®	03524531	mibe GmbH Arzneimittel
BD Microlance™ 3, 30G ½"	304000	Becton, Dickinson and Company Ltd.

2.1.6 Akute und chronische Oxalatnephropathie

Natriumoxalat und Oxalatfutter

Name	Kat.-Nr.	Firma
Natriumoxalat	sc-203396A	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Kontrollfutter (low calcium, 10mm)	S7042-E005	Ssniff Spezialdiäten GmbH
Oxalatfutter (low calcium + 6.7 g Na-Oxalat/kg, 10mm)	S7042-E010	Ssniff Spezialdiäten GmbH

Zusammensetzung Ssniff-Spezialfutter

Inhaltsstoffe	Menge	Kontrollfutter	Oxalatfutter
Rohprotein	17,7 %	+	+
Rohfett	6,1 %	+	+
Rohfaser	4,0 %	+	+
Rohasche	2,4 %	+	+
Stärke	31,1 %	+	+
Zucker	33,8 %	+	+
Kalzium	0,4 %	+	+
Vitamin A	19800 U/kg	+	+
Vitamin D ₃	2200 U/kg	+	+
Vitamin E	120 mg/kg	+	+
Vitamin K ₃	45 mg/kg	+	+
Vitamin C	350 mg/kg	+	+
Kupfer	8 mg/kg	+	+
Natriumoxalat	50 mmol/kg	-	+

2.1.7 Intravenöse und intraperitoneale Injektionen

Name	Kat.-Nr.	Firma
BD Microlance™ 3, 30G ½"	304000	Becton, Dickinson & Company Ltd.
BD Plastipak™ Spritze	303172	Becton, Dickinson & Company Ltd.

2.1.8 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

Name	Kat.-Nr.	Firma
Isofluran CP®	798-932	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH
FITZ-Sinistrin	NA	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Leukoplast® hospital	01757-00	BSN medical GmbH
NIC-Kidney Patches 3x3cm	003	MediBeacon GmbH
Rechargeable batteries for NIC-Kidney devices	004	MediBeacon GmbH
Sterile Mulltupfer	732220	Verbandmittel Danz GmbH
Transdermal GFR Monitor	TDM-MH-001	MediBeacon GmbH

2.1.9 Blutabnahme

Name	Kat.-Nr.	Firma
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	8043.2	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kapillaren beidseitig offen 32 x 0,8 mm Ø, nicht heparinisiert	8080803	neoLab Migge GmbH

2.1.10 Entnahme der Nieren

Name	Kat.-Nr.	Firma
D(+)-Saccharose	4621.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Disposable scalpel No. 11 pfm	02.001.30.011	Feather Safety Razor Co. Ltd.
Einbettkassetten	7-0015	neoLab Migge GmbH
Formalin, 4 % neutral gepuffert	10192.05000	Morphisto GmbH
Paraformaldehyd	8187150100	Merck KGaA
RNAlater	AM7021	Ambion, Inc.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Gesamt-RNA Isolation

Name	Kat.-Nr.	Firma
2-Mercaptoethanol	M6250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethanol 96% EMSURE®	159010	Merck KGaA
Falcon® 5ml Polypropylene Round-Bottom Tube	352063	Corning Science
Lysing Matrix D, 2 mL Tube	116913050	MP Biomedicals, LLC
PureLink™ RNA Mini Kit	12183018A	Invitrogen Ltd.
RNase AWAY®	83931	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RNase-Free DNase Set (50)	79254	Qiagen GmbH

2.2.2 Analytisches MOPS-Gel

Rezept für 10X MOPS-Puffer

Substanz	Konzentration [mM]
3-[N-Morpholino]propansulfonsäure	200
Natriumacetat	50
Ethylendiamintetraacetat	10
in ddH ₂ O, einstellen auf pH 7,0 und lichtgeschützt lagern	

Rezept für MOPS-Gel Probenpuffer für eine Probe

Substanz	Volumen [µl]
Formamid p.a.	10
37% Formaldehyd	4
10X MOPS-Puffer	2
Ethidiumbromid (1mg/ml)	1
Gesamt	17

2.2.3 Reverse Transkriptase PCR

Name	Kat.-Nr.	Firma
dNTP Set	R0186	Thermo Fisher Scientific Inc.
Hexanucleotide Mix	11277081001	Roche Diagnostics GmbH
Linear Acrylamide (5 mg/ml)	AM9520	Thermo Fisher Scientific Inc.
RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor	N2515	Promega GmbH
SuperScript [™] III Reverse Transcriptase (including 5x First Strand Buffer and 0,1 M DTT)	18080085	Thermo Fisher Scientific Inc.

2.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Materialien

Name	Kat.-Nr.	Firma
10X Taq Buffer without Detergent	B55	Thermo Fisher Scientific Inc.
96 Well Lightcycler Platte	72.1982.202	Sarstedt AG & Co. KG
BioStab PCR Optimizer	62508.5	Biomol GmbH
Bovine Serum Albumin PCR grade	B14	Thermo Fisher Scientific Inc.
dNTP Set	R0186	Thermo Fisher Scientific Inc.
Klebefolie, optisch klar	95.1994	Sarstedt AG & Co. KG
MgCl ₂ 25mM	R0971	Thermo Fisher Scientific Inc.
SYBR [®] Green I nucleic acid gel stain	86205	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Taq DNA Polymerase	M0273X	New England Biolabs GmbH

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primer. Alle Primer-Paare wurden von metabion international AG in einer Konzentration von 100 µM synthetisiert. Die Primer wurden mit Hilfe von Primer-BLAST (NCBI, [291]) konzipiert und validiert

Gen	NCBI Referenz	Primer-Paare [5' → 3']	Exon- übergreifend	Intron- flankierend	Produkt- länge [bp]	Schmelz- temperatur [°C]	Effizienz
<i>Anxa2</i>	NM 007585.3	CAGCAAC TTCGATGCTGAGAGG CACATTGCTGCGGTTTGTCTAG	-	+	110	61.25 60.93	n.a.
<i>Ccl17</i>	NM 011332.3	TGCTTCTGGGAC TTTCTG ATAGGAATGGCCCTTTGAA	-	+	97	57.72 56.45	n.a.
<i>Ccl2</i>	NM 011333.3	CCTGCTGTTACAGTTGCC ATTGGATCATCTTGCTGGT	-	+	108	59.34 56.86	2,01
<i>Ccl22</i>	NM 009137.2	TCTGGACCTCAAAATCCTGC TGGAGTAGCTTCTCACCCCA	-	+	106	57.50 57.98	n.a.
<i>Ccl5</i>	NM 013653.3	CCTGCTGCTTGCCTACCTCTC ACACACTTGGCGGTTCCCTCGA	-	+	125	63.20 64.64	n.a.
<i>Cd44</i>	NM 001177787.1	CAAGTTTTGGTGGCACACAG AGCGGACGTTACATTCAAA	-	+	95	58.07 58.10	n.a.
<i>Clu</i>	NM 013492.3	AAAAGCCGTCCGGAATGAGA TCGCAAGGCGGCTTTATTG	+	-	242	60.61 59.83	n.a.
<i>Cxcl10</i>	NM 021274.2	ATGGATGGACAGCAGAGAGC GGCTGGTCACTTTCAGAAAG	-	-	95	59.53 58.47	1,98
<i>Fabp1</i>	NM 017399.4	AGGCAATAGTCTGCCCGAGGAC CCAGTTCGCACCTCTCCCCCA	+	-	156	66.10 66.20	2,03
<i>Fn1</i>	NM 001276413.1	ACCTCTGCAGACCTACCCAG TTGGTGATGTGTGAAGGCTC	-	+	120	60.62 58.10	n.a.
<i>Gsta1</i>	NM 008181.3	CAATGGCCGGGAAGCCCGTG CTTCAAACCTCCACCCTGCTGC	-	-	96	66.49 63.92	n.a.
<i>Gstp1</i>	NM 013541	CGCAGCACTGAATCCGGACC ACACCGCCCTCGAACTGGGAA	-	+	73	64.63 66.11	n.a.
<i>Havcr1</i>	NM 001166632	TGTTGCCCTCCGTGTCTCT TCAGCTCGGGAATGCACAA	+	-	67	61.41 59.63	1,96
<i>Il6</i>	NM 031168	CCGGAGAGGAGACTTCACAG GGAAATTGGGGTAGGAAGGA	-	+	421	59.19 56.48	1,97
<i>Lcn2</i>	NM 008491.1	ATGTCACCTCCATCCTGG GCCAC TTGCACATTGTAG	-	+	145	55.50 54.09	2,03
<i>Mrc1</i>	NM 008625.2	GGCTGATTACGAGCAGTGGAA TGGTTCACCGTAAGCCCAAT	+	+	131	60.41 59.60	n.a.
<i>Ptx3</i>	NM 008987.3	GGACAACGAAATAGACAATGGA GAGTGGACAAAGCTGTCA	-	+	92	58.95 57.25	n.a.
<i>Rela</i>	NM 009045.4	GAGTCTCCATGCAGCTACGG CGCTTCTTCAATCCGGT	-	+	106	60.25 57.56	n.a.
<i>Rn18s</i>	NR 003278.3	GCAATTATCCCCATGAACG AGGGCCTCACTAAACCATCC	n.a.	n.a.	125	55.09 59.08	1,89
<i>Tnf</i>	NM 013693.3	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC AGGGTCTGGGCCATAGAACT	-	+	103	59.96 60.40	2,05

Rezept für qPCR SYBRgreen-Mix

Substanz	Volumen [ml]
PCR Optimizer	20
10X Taq Buffer without Detergent	10
MgCl ₂ 25mM	12
ddH ₂ O	6,05
BSA PCR grade	1
dNTPs (25mM je Base)	0,75
SYBR [®] Green I	0,2
Gesamt	50

Ptx3-Primer für mRNA aus Ptx3^{+/+} und Ptx3^{-/-} Mäusen

Genotyp	Primersequenz [5' → 3']		Produktlänge [bp]
	Forward primer	Reverse primer	
Ptx3 ^{+/+} / Ptx3 ^{-/-}	GGACAACGAAATAGACAATGGA	TGAACAGCTTGTCCCACTC	92

2.2.5 Protein-Isolation

Name	Kat.-Nr.	Firma
Pierce [™] Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets	88668	Thermo Fisher Scientific Inc.
RIPA Buffer	R0278-50ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

2.3 Histologische Methoden

2.3.1 Aufbereitung des Nierengewebes und Herstellung histologischer Präparate

Name	Katalognummer	Firma
Aceton	1000141011	Merck KGaA
Ammoniumperoxodisulfat	9592.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol EMSURE [®] ACS,ISO,Reag. Ph Eur	100983	Merck KGaA
Menzel Deckgläser für Mikroskopie	CS2250100	Thermo Fisher Scientific Inc.
Objektträger	J4800AMNZ	Thermo Fisher Scientific Inc.
Paraplast [®] for tissue embedding	P3558	Merck KGaA
Xylol	X/0250/17	Fisher Scientific UK Ltd

2.3.2 Histochemische und immunhistochemische Färbungen

Färbereagenzien

Name	Katalognummer	Firma
3,3'-Diaminobenzidine	D8001	Merck KGaA
Antigen Unmasking Solution	H-3300	Vector Laboratories
Avidin/Biotin Blocking Kit	SP-2001	Vector Laboratories
Biotinylated Lotus Tetragonolobus Lectin	B-1325	Vector Laboratories
Essigsäure 99-100 %	8187551000	Merck KGaA
hämatoxylinhaltigen Farblösungen	HHS80	Sigma
MACH 1 Universal HRP-Polymer Detection	M1U539 G, L10	Biocare Medical
Magermilchpulver	70166	Merck KGaA
Methanol	32213-M	Merck KGaA
Methylgrün	67069	Fluka
Natriumacetat-Trihydrat	1062671000	Merck KGaA
Nuclear Fast Red solution	N3020	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Periodsäure	3257.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Proteinase K	1019499	Qiagen
Salzsäure	0281.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Schiffsches Reagenz	3952016	Sigma
Silbernitrat	6874.2	Carl Roth GmbH & Co. KG
VectaMount Permanent Mounting Medium	H-5000	Vector Laboratories
VECTASTAIN [®] Elite [®] ABC-HRP Kit	PK-6100	Vector Laboratories
Wasserstoffperoxid	9681.1	Carl Roth GmbH & Co. KG

Primäre Antikörper

Name	Antikörper-Klon (Wirt)	Kat.-Nr.	Firma
Acta2	1A4 (Maus)	M0851	Dako Denmark A/S
Adgre1	Cl:A3-1 (Ratte)	MCA497G	AbD Serotec
Ly6b2	7/4 (Ratte)	MCA771GA	AbD Serotec
Ptx3	polyklonal (Hase)	ALX-210-365-C050	Enzo Life Sciences Inc.
Ptx3	polyklonal (Hase)	PTX31-A	Alpha Diagnostic Intl. Inc.
Ptx3	2C3 (Maus)	HM1130	Hycult Biotech Inc.

Sekundäre Antikörper

Immunogen	Wirt	Konjugat	Kat.-Nr.	Firma
Hase IgG (H+L)	Ziege	Biotin	ZRB1001	Linaris Biologische Produkte
Maus IgG1	Ratte	Biotin	406603	BioLegend
Maus IgG2a	Ziege	Biotin	M32315	Invitrogen
Ratte IgG (H+L)	Hase	Biotin	BA-4001	Vector Laboratories

DAB-Arbeitslösung

Substanz	Menge
3'3'-Diaminobenzidine	5 g
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	132 ml
1M Salzsäure	60-80 ml

Zugabe von Salzsäure und vortexen bis die Lösung klar wird

Methylgrün

Substanz	Menge
0,1 M Essigsäure	735 ml
0,1 M Natriumacetat	265 ml
Einstellen der Lösung auf pH 4,2	
Methylgrün	20 g
Methylgrün in Lösung bringen und abfiltrieren	

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Photometrische Messmethodik

Name	Katalognummer	Firma
96F microwell plate without lid	269620	Thermo Fisher Scientific Inc.
Creatinine FS	117119910021	DiaSys GmbH
Urea FS	131019910021	DiaSys GmbH
Kalzium Colorimetric Assay	MAK022-1KT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Oxalic Acid	CC02410	LTA S.r.l.
Advanced™ Protein Assay Reagent 5X Conc.	ADV01	Cytoskeleton Inc.
BSA Fraction V	10 735 086 001	Roche Diagnostics GmbH
Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer	39000	Thermo Fisher Scientific Inc.

2.4.2 SDS-PAGE

Name	Katalognummer	Firma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	1.08382.1000	Merck KGaA
Natriumlaurylsulfat (SDS)	4360.2	Roth GmbH & Co. KG
Glycin	3790.3	Roth GmbH & Co. KG
Acrylamid	3029.1	Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592.2	Roth GmbH & Co. KG
Tetramethylethyldiamin (TMEDA)	161-0800	Bio-Rad Laboratories, Inc.
MagicMark™ XP Western Protein Standard	LC5602	Invitrogen Ltd.

Pufferrezepturen

Alle Puffer wurden in ddH₂O angesetzt und mit HCl oder NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

Puffer	TRIS	SDS	Glycin	Endvolumen	pH
Laufpuffer	30 g	5 g	144 g	1000 ml	8,3
Sammelgel	6,05 g	0,4 g	-	500 ml	8,8
Trenngel	91 g	2 g	-	100 ml	6,8
Transfer	1,5 g	-	7,2 g	500 ml	-

Gelrezepturen

Alle Angaben gelten für die Herstellung von einem Gel.

Gel	Puffer	ddH ₂ O	Acrylamid (30 %ig)	APS (10 %ig)	TMEDA
Sammelgel(5 %ig)	1,25 ml	2,9 ml	830 µl	40 µl	18 µl
Trenngel (12 %ig)	2,25 ml	3,2 ml	3,6 ml	40 µl	18 µl

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Durchflusszytometrie

Alle Lösungen, die zum Betrieb des BD FACSCanto™ notwendig sind, wurden bei BD Biosciences erworben.

Probenaufbereitung

Name	Kat.-Nr.	Firma
PBS	P04-36500	PAN-Biotech GmbH
Kollagenase (Clostridium histolyticum)	C2674	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DNase I (bovines Pankreas)	D5025	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
BD Microlance™ 3, 20G 1½"	301300	Becton, Dickinson & Company Ltd.
BD Microlance™ 3, 25G 1"	300400	Becton, Dickinson & Company Ltd.
Pre-Seperation Filter (70 µm)	130-095-823	Miltenyi Biotec GmbH
Nykodenz AG	1002424	Axis-Shield PoC
FBS	S0115	Biochrom GmbH
5ml Polystyren-Falcon®	352008	Corning Inc.
Zombie NIR™ Fixable Viability Kit	423105	BioLegend, Inc.
BSA Fraction V	10735086001	Roche Diagnostics GmbH
Natriumazid	K305.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
AccuCheck Counting Beads	PCB100	Thermo Fisher Scientific Inc.
AbC™ Anti-Rat/Hamster Bead Kit	A10389	Thermo Fisher Scientific Inc.

Rezept für Nykodenz-Lösung

	Nykodenz-Puffer		Nykodenz-Stock	
	Chemikalie	Menge [g]	Chemikalie	Menge [g]
Einzelkomponenten	NaCl	9,0	Nykodenz AG	30,55
	TRIS	0,601		
	KCl	0,227		
	EDTA	0,112		
in ml ddH ₂ O	1120		100	
pH anpassen auf	7,5		—	
Nykodenz-Lösung	54 %		46 %	

Antikörper (Reaktivität Maus)

Antigen	MGI-Symbol	Fluorochrom	Klon	Kat.-Nr.	Firma
CCR2	Ccr2	FITC	475301	FAB5538F	R&D Systems
CD103	Itgae	APC	2E7	17-1031-82	eBiosciences
CD11b	Itgam	BV510	M1/70	562950	BD Biosciences
CD11b	Itgam	V450	M1/70	560455	BD Biosciences
CD11c	Itgax	V450	HL3	560521	BD Biosciences
CD16/CD32	Fcgr3/Fcgr2b	—	2.4G2	553142	BD Biosciences
CD206	Mrc1	FITC	MR5D3	MCA2235FB	AbD Serotec
CD45	Ptprc	PE-Cy™5	30-F11	553082	BD Biosciences
CX3CR1	Cx3cr1	PE	SA011F11	149006	BioLegend
F4/80	Adgre1	APC	Cl:A31	MCA497APC	AbD Serotec
Ly6G	Ly6g	PE-Cy™7	1A8	560601	BD Biosciences
MHCII (I-A/I-E)	H2	BV510	M5/114.15.2	742893	BD Biosciences

2.5.2 Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Name	Antikörper-Klon	Kat.-Nr.	Firma
Human Pentraxin 3/TSG-14 Quantikine ELISA Kit	n.a.	DPTX30	R&D Systems Inc.

2.5.3 Western Blot

Name	Katalognummer	Firma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	1.08382.1000	Merck KGaA
Immobilon [®] -P Membran	IPVH00010	Merck KGaA
Grade 3MM Chr Cellulose Chromatography Papers	3030-917	GE Healthcare Life Sciences
Methanol	32213	Honeywell International
Salzsäure	0281.1	Roth GmbH & Co. KG
Tween20	93773	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Magermilchpulver	70166	Merck KGaA
Amersham ECL [™] Prime Western Blotting Detection Reagent	RPN2232	GE Healthcare Life Sciences
Film Amersham Hyperfilm [™] ECL	28906837	GE Healthcare Life Sciences
Developer	G153	AGFA
Ponceau S solution	P7170	Merck KGaA

TBST Pufferrezeptur

Substanz	Menge
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	24,23 g
Natriumchlorid	80,06 g
Salzsäure (6 N)	17,5 ml
in 500 ml ddH ₂ O lösen, auf pH 7,6 einstellen und auf Endvolumen 10 L mit ddH ₂ O auffüllen	
Tween20	1 ml

Antikörper (Reaktivität Maus)

Antigen	Antikörper-Klon (Wirt)	Kat.-Nr.	Firma
Ptx3	2C3 (Maus)	HM1130	Hycult Biotech Inc.
IgG (HRP-linked)	- (Maus)	7076S	Cell Signaling Technology

2.6 Zellkultur Methoden

2.6.1 Isolation von PTCs

Name	Katalognummer	Firma
Collagenase D	1108886600	Roche Diagnostics GmbH
BD Microlance [™] 3, 20G 1½"	301300	Becton, Dickinson and Company Ltd.
Pre-Separation Filters (70 µm)	130-095-823	Milltenyi Biotec GmbH
Percoll [®]	P1644	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
10X PBS	D1408	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
1X PBS	P04-36500	PAN-Biotech GmbH

2.6.2 *In vitro* Kultivierung von PTCs

Name	Katalognummer	Firma
DMEM (1X) + GlutaMAX™I	21885-025	Thermo Fisher Scientific Inc.
HEPES Cell culture grade	A3268,9025	AppliChem GmbH
FBS	S0115	Biochrom GmbH
HBSS	14025-092	Thermo Fisher Scientific Inc.
Prostaglandin E1	P7527	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt (T3)	T5516	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hydrocortisone	H0888	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Insulin transferrin-sodium selenite supplement	11074547001	Roche Diagnostics GmbH
Epidermal growth factor	Z02972	Genscript
Penicillin-Streptomycin	P06-07100	PAN-Biotech GmbH
Zellkulturschalen 15 cm	93150	TPP Techno Plastic Products AG
Zellkulturplatten 6 Well	92006	TPP Techno Plastic Products AG
Trypsin 0.05 %/EDTA 0.02 % in PBS, w/o: Ca and Mg	P10-023100	PAN-Biotech GmbH
Zählkammern Neubauer improved	T729.1	Roth GmbH & Co. KG

Rezept für Hormon-Mix

Komponente	Volumen
HBSS	50 ml
Hydrocortisone 1,8 µg/ml in Ethanol	500 µl
T3 3,4 ng/ml in Ethanol	50 µl
Prostaglandin E1 125 ng/ml in Ethanol	12,5 µl

Rezept für K1-Medium

Komponente	Volumen [ml]
DMEM (1X) + GlutaMAX™I	450
FBS	50
HEPES 1M pH 7.55	12,5
Penicillin-Streptomycin	5
Hormon-Mix	5
Epidermal growth factor 12,5 mg/ml	1
Insulin transferrin-sodium selenite supplement 10 mg/ml	0,5

2.7 *In chemico* Methoden

Name	Katalognummer	Firma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	1.08382.1000	Merck KGaA
Salzsäure	0281.1	Roth GmbH & Co. KG
Natriumchlorid	3957.2	Roth GmbH & Co. KG
Natriumoxalat	sc-203396A	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Calciumchlorid-Dihydrat	2382.0500	Merck KGaA
Objektträger	J4800AMNZ	Thermo Fisher Scientific Inc.
Deckglas, rund, Ø 30 mm	631-1347	VWR International GmbH

Rezept für Tris-HCl-Puffer

Komponente	Menge
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	60,57 g
ddH ₂ O	350 ml
pH mit rauchiger Salzsäure auf 7,4 einstellen und mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen	

Rezept für Kristallisationspuffer

Komponente	Menge
Tris-HCl-Puffer	45 ml
NaCl	290 mg
mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen	

2.8 Verbrauchsmaterialien

Falls nicht anders beschrieben wurden Verbrauchsmaterialien wie z.B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, etc. von Eppendorf AG, Greiner Bio-One International GmbH, TPP Techno Plastic Products AG oder Carl Roth GmbH & Co. KG bezogen.

2.9 Geräte

Gerät	Bezeichnung/ Typ	Hersteller
Brutschrank	Hera Cell 150	Heraeus Instruments
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II	BD Biosciences
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN [®] Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Elektrophorese-Netzgerät	PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH
Homogenisator ULTRA-TURRAX [®]	T 25 basic	IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG
Kryostat	CM3000	Leica Biosystems
Mikroskop (Histologie)	Leica DMRBE Research Microscope	Leica Microsystems
Mikroskop (Zellkultur)	DMIL	Leica Microsystems
Mikrowelle	800	Severin
Modulare Paraffin-Ausgießstation	EC 350	Microm International GmbH
Photometer	GENios Plus	Tecan Austria GmbH
Real-Time PCR-System	LightCycler 480	Roche Diagnostics GmbH
Rotationsmikrotom	HM 340 E	Microm International GmbH
Rotator (vertikal)	-	Bachofer Laboratoriumsgeräte
Röntgenfilmentwickler	Curix 60	AGFA
Semi-Dry-Blotter	Trans-Blot [®] SD	Bio-Rad Laboratories GmbH
Spektrphotometer	NanoDrop 1000	Thermo Scientific Inc.
Sterilwerkbank	Microflow Biological Safety Cabinet	Nunc GmbH
Thermo-Cycler	Mastercycler [®] pro	Eppendorf AG
Thermomixer	5436	Eppendorf AG
Tube Roller	SRT6	Stuart Equipment
Vaporizer for Forane Anesthetic	100 Series Forane Vaporizer 100 Vaporizer SurgiVet	Smiths Medical
Vortex-Genie [™] 2	G-560-E	Scientific Industries, Inc.
Wasserbad	1013	GFL mbH
Wipptisch	Rocky-N	Labortechnik Froebel GmbH
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments
Zentrifuge	5415 C	Eppendorf GmbH

2.10 Software

Software	Version	Entwickler
BD FACSDIVA™	8.0.1	BD Biosciences
FlowJo	10.0.7	Tree Star, Inc.
GNU Image Manipulation Program (GIMP)	2.8.10	Spencer Kimball, Peter Mattis
ImageJ (Fiji)	1.5.1	Wayne Rasband
Inkscape	0.48.4	Inkscape Community
Leica QWin Standard	2.5	Leica Microsystems Imaging Solutions
LibreOffice	5.3.3.2	The Document Foundation
LightCycler® 480 Software	1.5.0	Roche Life Science
Mendeley Desktop	1.17.10	Mendeley Ltd.
MPD-Lab Application	1	Mannheim Pharma & Diagnostics
DASYLab	12.00.01	National Instruments Ireland Resources Ltd.
R statistics	3.2.1	R Development Core Team
RStudio	1.0.143	RStudio, Inc.
TeXStudio	2.6.6	Benito van der Zander

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

3.1.1 Tierhaltung

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Versuchstiere waren ausschließlich Mäuse (*Mus musculus*), die vom Züchter Charles River Laboratories bezogen wurden (Tab. 2) und nach FELASA-Empfehlungen als gesund beurteilt wurden^[166].

Tabelle 2: Verwendete Mauslinien.

Bezeichnung im Text	Vollständiger Name	Züchter
C57BL/6N	C57BL/6NCrl	Charles River Germany (Sulzfeld)
BALB/c	BALB/cAnNCrl	Charles River Germany (Sulzfeld)
CD-1	Crl:CD1(ICR)	Charles River Germany (Sulzfeld)
<i>Ptx3</i> ^{-/-}	B6;129-Ptx3 ^{tm1Mant}	Charles River Italy (Calco)
<i>Ptx3</i> ^{+/+}	B6;129-Ptx3 ^{wt}	Charles River Italy (Calco)

Die Versuchstiere wurden in Gruppen von maximal 5 Tieren in mit Einstreu und Zellstoff versehenen Polypropylenkäfigen bei 22 ± 2 °C und einem 12 Stunden Licht/ Dunkel-Zyklus gehalten. VE-Wasser und Standardfutter (ssniff-Spezialdiäten GmbH) stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Käfige, Einstreu, Nestlets, Häuser, Nagestäbchen Futter und Wasser (ddH₂O) wurden durch Autoklavieren bei 120 °C und 1 bar Druck für 20 min sterilisiert. Das Umsetzen der Tiere in frische Käfige wurde ebenfalls unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes wurden während der Versuche zu jedem Zeitpunkt eingehalten. Alle angewandten Prozeduren wurden vor Versuchsbeginn von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ: ROB-55.2-Vet-2532.Vet_02-12-63, ROB-55.2-Vet-2532.Vet_02-13-143 und ROB-55.2-Vet-2532.Vet_02-14-175).

3.1.2 *Ptx3*-defiziente Mäuse

Hintergrundinformationen

B6;129-Ptx3^{tm1Mant} Mäuse (MUGEN mouse database ID: M141006, www.mugen-noe.org/database) wurden über Charles River (Italien) von Cecilia Garlanda und Alberto Mantovani (Humanitas Research Hospital, Rozzano, Italien) bezogen. Die *Ptx3*-defizienten Tiere und ihre Wildtyp-Geschwister wurden im Folgenden als *Ptx3*^{-/-} respektive *Ptx3*^{+/+} bezeichnet. Die Herstellung der *Ptx3*^{-/-} Tiere in einem 129/Sv-C57Bl/6-Hintergrund wurde detailliert bei Garlanda et al.^[86] beschrieben. In Kürze: Das erste von drei Exonen des Zielgens wurde durch Einfügen einer LacZ-neo-Kassette unterbrochen, um die Expression des funktionalen Proteins zu unterbinden. *Ptx3*^{-/-} Mäuse zeigten im Southern bzw.

Western Blot keine Expression des Transkripts bzw. des Proteins. Allerdings bleibt hier anzumerken, dass im Sinne der Reproduzierbarkeit der gezeigten Ergebnisse weder die verwendete Gensonde im Southern Blot noch der verwendete Antikörper im Western Blot in der Originalpublikation spezifiziert wurden.

Zuchtstrategie

Die von Charles River initial bezogenen *Ptx3*^{+/-} Tiere (Männchen und Weibchen, F0) wurden verpaart und der F1-Nachwuchs wie folgt aufgeteilt: *Ptx3*^{+/+} Männchen und Weibchen wurden in Bruder-Schwester-Verpaarungen zum Erhalt des gemischten 129/Sv-C57Bl/6-Hintergrunds ohne die *Ptx3*-Defizienz angesetzt (F2). *Ptx3*^{-/-} Männchen und *Ptx3*^{+/-} Weibchen (*Ptx3*^{-/-} Weibchen sind infertil) derselben Würfe wurden zum Erhalt der *Ptx3*-Defizienz verpaart (F2). Die daraus hervorgegangenen *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tiere (F3) wurden für Experimente herangezogen. Zudem wurde aus Tieren beider Sublinien eine neue Verpaarung angesetzt, die *Ptx3*^{+/-} Nachwuchs hervorbrachte (F4). Diese Tiere wurden nach der gleichen Strategie (F0 bis F2) wieder in die Sublinien ausgekreuzt. Somit sollte die Kongenität beider Linien abgesehen von der *Ptx3*-Defizienz gewährleistet werden. Um weiterhin die genetische Drift so gering wie möglich zu halten wurden nach der F1 Generation keine kontinuierlichen Bruder-Schwester-Verpaarungen, sondern Vater-Tochter-, Großvater-Enkelin-, usw. Verpaarungen für beide Sublinien etabliert (Abb. 6).

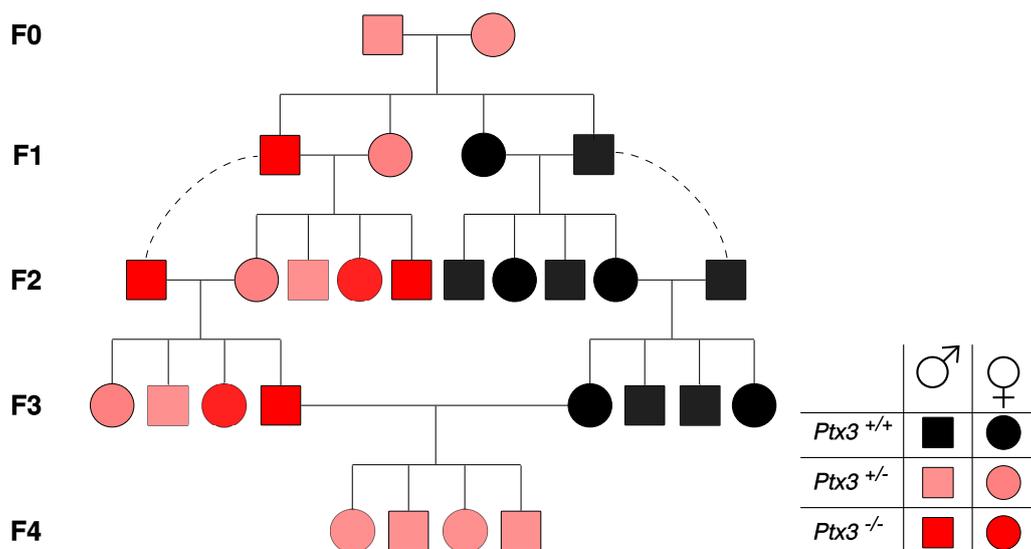


Abbildung 6: Zuchtstrategie für *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tiere. Aus der *Ptx3*^{+/-} F0 Generation wurden durch Bruder-Schwester-Verpaarung zwei Sublinien zur Erhaltung von *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tieren generiert. Linker Ast: Verpaarung von *Ptx3*^{-/-} Männchen und *Ptx3*^{+/-} Weibchen zur Generierung von *Ptx3*^{-/-} Tieren. Rechter Ast: Verpaarung von *Ptx3*^{+/+} Männchen und *Ptx3*^{+/-} Weibchen zur Erhaltung von *Ptx3*^{-/-} Tieren. Die gestrichelten Linien (- - -) zeigen die Identität der miteinander verbundenen Tiere an.

Genotypisierung

Auf Grund der Heterozygotenverpaarung zur Generierung von *Ptx3*^{-/-} Mäusen musste jeder Wurf vollständig genotypisiert werden. Würfe aus *Ptx3*^{+/+} Verpaarungen wurden nur bei der Etablierung der Sublinie und später stichprobenartig überprüft. Zur Probengewinnung für die Genotypisierung und der eindeutigen Identifizierung der Versuchstiere wurde eine Ohrlochmarkierung ohne Analgesie

durchgeführt. Die im folgenden beschriebenen Schritte wurden zu ca. 75% von Frau Janina Mandelbaum (Medizinisch-Technische Assistentin, Institut für Klinische Biochemie, Medizinische Klinik und Poliklinik IV der Universität München) im Rahmen der routinemäßigen Genotypisierung von Mäusen in der Arbeitsgruppe Anders übernommen.

Das ausgestanzte Gewebestück wurde entweder bei -20 °C gelagert oder sofort mit je 150 µl Direct PCR Tail Peqgold (Peqlab) und 1 µl Proteinase K (Qiagen) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Thermomixer für 3-4 h bei 55 °C und 800 rpm bis zur vollständigen Lyse des Gewebes inkubiert. Eine anschließende Deaktivierung der Proteinase K wurde durch eine weitere Inkubation bei 85 °C für 45 min erreicht. Das Lysat wurde entweder innerhalb der nächsten 24 h verarbeitet (Lagerung bei 4 °C) oder bei -20 °C aufbewahrt.

Im Anschluss wurde eine Endpunkt-PCR mit den unter Kap. 2.1.2 aufgeführten Primern durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Mastermix für die jeweils benötigte Anzahl Reaktionen nach den Angaben in Tab. 3 angefertigt. Jede Reaktion bestand aus 23 µl des Mastermixes und 2 µl des Lysates und wurde in 0,2 ml Quali-PCR-Tubes angesetzt.

Tabelle 3: Mastermix zur Genotypisierung von *Ptx3*^{-/-} Mäusen per Endpunkt-PCR. Angaben für eine Reaktion.

Reagenz	Volumen [µl]
10x PE Buffer	2,5
11,25 mM dNTPs	4
Forward primer WT	1
Forward primer KO	1
Reverse primer	1
Taq DNA Polymerase	0,2
H ₂ O	13,3
Gesamt	23

Die Mixtur wurde kurz abzentrifugiert und die Reaktion unter den in Tab. 4 genannten Bedingungen in einem Thermo-Cycler (Mastercycler[®], Eppendorf) durchgeführt.

Tabelle 4: Thermo-Cycler-Programm zur Genotypisierung von *Ptx3*^{-/-} Mäusen per Endpunkt-PCR.

Programm	Wiederholungen	Zieltemperatur [°C]	Dauer
Initiale Denaturierung	1	94	5 min
		94	30 s
Amplifikation	38	59	30 s
		72	30 s
		72	30 s
Abkühlen	1	10	∞

Das Reaktionsprodukt konnte mittels Gelelektrophorese dargestellt werden. Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels wurden 3 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewogen, in 150 ml 0,5 X TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) gelöst und bis zur vollständigen Auflösung der Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Die Lösung wurde durch kontinuierliches Schwenken des Erlenmeyerkolbens unter fließendem Wasser bis auf ca. 60 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 12 µl des DNA-interkalierenden Farbstoffes peqGREEN wurde die nunmehr visköse Masse in eine Gelkammer gegossen und alle entstandenen Luftblasen wurden sorgfältig entfernt. Nach 20-30 min war das Gel

ausgehärtet, sodass die Gelkammer in die entsprechende Elektrophoreseapparatur eingelegt und mit TBE-Puffer bedeckt werden konnte.

Das PCR-Produkt wurde mit 5 µl 6X DNA Loading versetzt. 12 µl dieses Gemisches wurden in eine Geltasche pipettiert und unter Verwendung eines Elektrophorese-Netzgerätes bei 200 V Spannung für 30 min aufgetrennt.

Im Anschluss wurden die aufgetrennten PCR-Produkte mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht, abphotographiert und ihre Länge an Hand der als Komigrationsstandard mitgeführten DNA-Leiter (Low MW DNA Ladder, New England Biolabs® Inc.) abgelesen. Entsprechend den Angaben von Garlanda et al.^[86] wiesen die PCR-Produkte von *Ptx3^{+/+}* Tieren eine Länge von ca. 150 bp auf, die von *Ptx3^{-/-}* Tieren etwa 400 bp.

***Ptx3*-mRNA-Expression in *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Tieren**

Der große Fundus an existierenden Originalarbeiten zur Phänotypisierung von *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Tieren in verschiedenen Krankheitsmodellen zeigt ganz klar, dass B6;129-*Ptx3^{tm1Mant}* Mäuse kein funktionales *Ptx3* exprimieren. Die verfügbaren Daten zur Herstellung dieser Mäuse beweisen allerdings nicht, dass keine mRNA mehr umgeschrieben wird, die prinzipiell zu einem Protein translatiert werden kann. Fehlenden Angaben in der Literatur zum Aufbau des targeting vectors lässt die Möglichkeit offen, dass die RNA-Transkription nicht mit der Selektionskassette endet und dass während der Proteinbiosynthese an gleicher Stelle ein Readthrough stattfindet. Zudem befindet sich direkt nach der für die Insertion der Selektionskassette gewählten SacI-Restriktionsschnittstelle ein Startcodon (ATG) im offenen Leserahmen, das nach der Transkription als interne ribosomale Eintrittsstelle fungieren könnte (siehe unten). Das potentiell translatierte Protein hätte entsprechend mehr als 60% der Aminosäuren des Wildtyp-Proteins (siehe Abb. 4).

Kodierende Sequenz *Ptx3*:

```

ATG CAC CTC CCT GCG ATC CTG CTT TGT GCT CTC TGG TCT GCA GTA GTG GCT GAG ACC TCG GAT
GAC TAC GAG CTC ATG TAT GTG AAT TT G GAC AAC GAA ATA GAC AAT GGA CTT CAT CCC ACC
GAG GAC CCC ACG CCA TGC GAC TGC CGC CAG GAG CAC TCG GAG TGG GAC AAG CTG TTC A TC
ATG CTG GAG AAC TCG CAG ATG CGG GAG GGC ATG CTG TTG CAG GCC ACC GAC GAC GTC CTC
CGT GGA GAG CTG CAG CGG CTG CGG GCA GAG CTG GGG CGG CTG GCG GGC GGC ATG GCG
AGG CCG TGC GCA GCC GGT GGC CCC GCA GAC GCC AGG CTG GTG CGG GCG CTG GAG CCG CTG
CTG CAG GAG AGC CGT GAC GCG AGC CTC AGG CTG GCG CGC CTG GAG GAC GCG GAG GCG CGG
CGA CCC GAG GCG ACA GTG CCT GGC CTA GGC GCT GTG CTG GAG GAA CTG CGG CGG ACG CGC
GCC GAC CTG AGC GCC GTG CAG AGC TGG GTC GCC CGC CAC TGG CTG CCC GCA GGT TGT GAA
ACA GCA ATT TTC TTC CCA ATG CGT TCG AAG AAG ATT TTT GGA AGC GTG CAT CCT GTG AGA CCA
ATG AAG CTT GAA TCT TTT AGT ACT TGC ATT TGG GTC AAA GCC ACA GAT GTA TTA AAC AAA ACC
ATC CTG TTT TCT TAT GGC ACA AAG TGG AAC CCC TAT GAG ATT CAG CTG TAC CTC AGT TCC CAG
TCC CTA GTG TTG GTG GTG GGT GGA AAG GAG AAC AAG CTG GCT GCA GAC ACT GTG GTG TCC
CTG GGG AGG TGG TCC CAC CTG TGT GGC ACC TGG AGT TCA GAG CAG GGG AGC ATG TCC CTG
TGG GCA AAC GGG GAG CTG GTG GCT ACC ACT GTA GAG ATG GCC AAA AGT CAC TCT GTT CCT
GAG GGT GGA CTC CTA CAG ATT GGC CAA GAA AAG AAT GGT TGC TGT GTA GGT GGG GGC TTT
GAC GAA TCA TTA GCA TTT TCT GGA AGA ATC ACA GGC TTC AAT ATC TGG GAT CGG GTT CTC AGC
GAG GAG GAG ATA CGG GCC AGT GGA GGA GTC GAA TCC TGT CAC ATC CGG GGA AAT GTC GTC
GGG TGG GGA GTC ACA GAG ATT CAG GCG CAC GGA GGA GCC CAG TAT GTT TCT TAA

```

Den schlussendlichen Nachweis der Translation eines veränderten, bzw. trunkierten Proteins ist mit herkömmlichen immunologischen Methoden schwer zu erbringen, da vor allem der Spezi-

fität eines gewählten Antikörper nicht blind vertraut werden kann. Auch war es nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit, einen solchen Nachweis zu erbringen. Vielmehr ging es um eine kritische Beurteilung der verwendeten *Ptx3*-defizienten Mäuse. Zu diesem Zweck wurden mit Unterstützung von Herrn Bruno Luckow Primer designt, die innerhalb des kodierenden Bereichs der *Ptx3*-mRNA (siehe oben) downstream der *SacI*-Restriktionsschnittstelle (rot) und des direkt darauf folgenden potentiellen Startcodons (grün) binden (Primer-Sequenz auch in Kap. 2.2.4, hier in gelb dargestellt).

Zur Klärung der Frage, ob eine trunkierte Version der *Ptx3*-mRNA transkribiert wird, wurde Gesamt-RNA aus Ovarien von *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tieren isoliert (siehe Kap. 3.2.1), zu cDNA per Reverse Transkriptase-PCR umgeschrieben (siehe Kap. 3.2.3) und mittels quantitativer PCR (siehe Kap. 3.2.4) mit dem in Tab. 10 beschriebenen Mastermix unter den in Tab. 9 beschriebenen Bedingungen quantifiziert (Abb. 7A&B). Das gewonnene qPCR-Produkt wurde im Anschluss wie oben beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 7C).

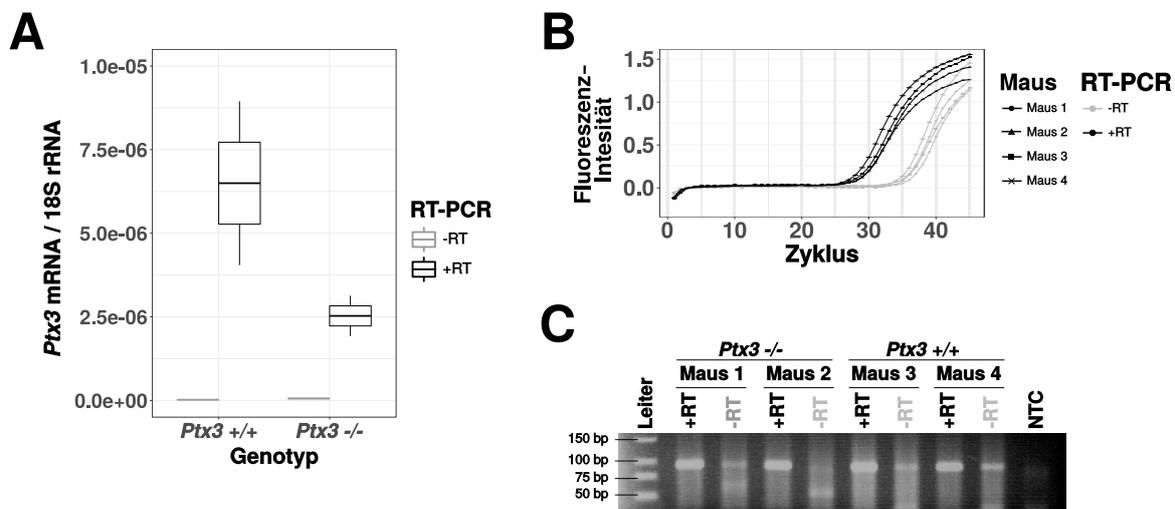


Abbildung 7: *Ptx3* mRNA-Expression in *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tieren. Gesamt-RNA wurde aus den Ovarien von *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tieren isoliert, umgeschrieben und per qPCR die Expression von *Ptx3* im Verhältnis zu Rn18s quantifiziert. (A) Quantifizierung der in (B) dargestellten qPCR-Reaktion für *Ptx3*-Primer. (B) LightCycler-Lauf der Reaktionen mit *Ptx3*-Primern. (C) Gelelektrophoretische Darstellung des qPCR-Produktes. NTC (non template control) ist die Negativkontrolle der qPCR-Reaktion und beinhaltet ddH₂O anstelle von cDNA.

Die Ovarien sind in adulten Tieren unter physiologischen Bedingungen reich an *Ptx3*-mRNA, weshalb sie zur Isolierung der Gesamt-RNA herangezogen wurden. Die Überprüfung der *Ptx3*-Expression in *Ptx3*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu ihren *Ptx3*^{+/+} Geschwistern ergab eine deutliche Expression in beiden Genotypen (Abb. 7A), die nicht auf Verunreinigungen mit genomischer DNA zurückzuführen war (Abb. 7B). Die Gelelektrophorese bestätigte, dass bei *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tieren das gleiche PCR-Produkt entstanden ist (Abb. 7C), das in der qPCR-Reaktion gemessen wurde.

3.1.3 Narkotisierung, Antagonisierung und Analgesie im Rahmen operativer Eingriffe

Zum Erreichen einer chirurgischen Toleranz (Anästhesiestadium III 2) der Versuchstiere mit Sedation, Hypnose, Analgesie und Relaxation wurde eine vollständig antagonisierbare Injektionsnarkose verwendet (siehe Tab. 5).

Tabelle 5: Bestandteile und Dosierung der verwendeten Injektionsnarkose und der jeweiligen Antagonisten.

Mixtur	Substanz	Wirkung	Dosierung [mg/kg KG]
Narkose	Fentanyl	Opioidrezeptoragonist	0,05
	Midazolam	allosterischer GABA-A-Rezeptor Ligand	5
	Medetomidin	α_2 -Adrenozeptoragonist	0,5
Antagonist	Naloxon	Opioidrezeptorantagonist	1,2
	Flumazenil	Antagonist an der GABA-A-Rezeptor-Bindungsstelle von Midazolam	0,5
	Atipamezol	α_2 -Adrenozeptorantagonist	2,5

Die Inhaltsstoffe des Narkosemixes und des Antagonistenmixes wurden jeweils kurz vor dem operativen Eingriff in einem Falcon entsprechend Tab. 6 zusammengemischt und auf 37 °C erwärmt. Das Versuchstier wurde gewogen und je nach Gewicht wurde die entsprechende Menge der Narkose und des Antagonisten luftfrei aufgezogen und zur unmittelbaren Verwendung bereit gelegt.

Tabelle 6: Ansatz für Narkose- und Antagonistenmix berechnet für 1000g KG.

Mixtur	Substanz	Konzentration [mg/ml]	Volumen [ml]
Narkose	Fentanyl	0,05	1
	Midazolam	5	1
	Medetomidin	1	0,5
Antagonist	Naloxon	0,4	3
	Flumazenil	0,1	5
	Atipamezol	5	0,5

Das Versuchstier wurde mit einem Nackengriff sicher fixiert und mit dem Kopf nach kranial gekippt gehalten, um die Organe aus dem Injektionsgebiet zu mobilisieren. Die Bauchwand wurde im unteren linken Quadranten in Richtung Bauchmitte in einem 30 °-45 °Winkel mit einer 30 G Kanüle punktiert um eine Verletzung der inneren Organe zu vermeiden (intraperitoneale Injektion, i.p.). Das aufgezogene Volumen wurde ohne Aspiration vollständig injiziert. Das Erreichen der chirurgischen Toleranz nach ca. 10-20 min wurde mittels sehr stark vermindertem Zwischen-Zehenreflex an der Hintergliedmaße sichergestellt. Das gewählte Narkoseregime gewährleistete bei stabiler Körpertemperatur um 37,5 °C eine Narkosedauer von ca. 1 h.

Nach Beendigung der OP wurde das Versuchstier durch subcutane (s.c.) Applikation des zuvor präparierten Volumens des Antagonisten aus der Narkose aufgeweckt und während der Aufwachphase engmaschig überwacht.

Präoperativ wurden direkt vor Einleitung der Injektionsnarkose 200 mg/kg KG Metamizol peroral (p.o.) und postoperativ 0,05 mg/kg KG Buprenorphin s.c. verabreicht. Nach der ersten Buprenorphin Applikation erfolgten alle 12 Stunden weitere Gaben gleicher Dosierung. Eine Verabreichung von Buprenorphin als Analgetikum erfolgte an mindestens drei aufeinanderfolgenden Tagen postoperativ. In Abhängigkeit des Wohlbefindens des Versuchstieres am 4. postoperativem Tag wäre eine weitere Analgesie mit 200 mg/kg KG Metamizol p.o. alle 6 h möglich gewesen. In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Operationen war dies allerdings nie nötig, da sich alle Versuchs-

tiere am 2. bis 3. postoperativen Tag schmerzfrei und aktiv zeigten. Metamizol und Buprenorphin wurden gemäß den gängigen Empfehlungen der GV-Solas (Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren, Auflage August 2010) appliziert und dosiert.

3.1.4 Intraoperative Temperaturkontrolle

Nach Injektion der Narkose bis zum Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde das Versuchstier in eine auf 37,0 °C vorgeheizte Brutmaschine (Brinsea Octagon 20 Advance) gesetzt, um einem narkosebedingten Abfallen der Körpertemperatur schon im Ansatz entgegenzuwirken (Abb. 8A). Anschließend wurde eine RET-3-ISO Rektalsonde (Physitemp Instruments) eingeführt und mit einem 2 cm breiten Leukoplaststreifen am Schwanz fixiert, sodass sie über die gesamte Dauer der Operation bis zum Aufwachen im Versuchstier verbleiben konnte. Die zugehörige Messeinheit (Thermes-USB Temperature Data Acquisition Seven channel unit) wurde an einen PC angeschlossen, sodass über die Physitemp Software die Körpertemperatur der Versuchstieres in Echtzeit beobachtet werden konnte. Erst bei konstanter Körpertemperatur um $37,5 \pm 0,1$ °C wurde die Operation initiiert.

Der operative Eingriff wurde auf einem auf 42 °C vorgeheizten Kleintier-OP-Tisch (Medax GmbH) durchgeführt. Bei Durchführung einer IRI-Operation wurde das Versuchstier für die Dauer der Ischämiezeit in eine zweite auf 37,7 °C vorgeheizte Brutmaschine gelegt. Die Entfernung der Aneurysmaklemme nach Ablauf der Ischämiezeit und der Wundverschluss erfolgten wiederum auf dem Kleintier-OP-Tisch. Nach Applikation des Antagonisten und Entfernung der Rektalsonde wurde das Versuchstier bis zum vollständigen Erwachen zurück in die erste Brutmaschine (37,0 °C) gesetzt (Abb. 8A).

Mit Hilfe dieses Protokolls konnte die Körpertemperatur aller Versuchstiere für die Dauer der Operation stabil zwischen 36,5 und 38,5 °C gehalten werden (Abb. 8B)^[169]. Bei einem unvorhersehbaren Temperatureinbruch oder -anstieg konnte Dank der Online-Temperaturkontrolle auf jedes Tier individuell mit abkühlenden (kurzfristiger Entzug der entsprechenden Wärmezufuhr) oder aufheizenden (zusätzliche Exposition mit einer Infrarotlampe) Maßnahmen reagiert werden (Abb. 8C).

3.1.5 Renale Ischämie- und Reperfusionsoption

Bei der Induktion eines Ischämie- und Reperfusionsschadens durch Verschluss der linken Nierenarterie wurde das Versuchstier mittels des unter Kap. 3.1.3 beschriebenen Verfahrens narkotisiert und hinsichtlich seiner Körpertemperatur wie in Kap. 3.1.4 überwacht und stabilisiert.

Das Tier wurde im Operationsbereich rasiert und die Haut mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Mittels eines 1,0 cm langen Schnittes wurde die Flanke eröffnet und die Bauchwand freigelegt. Ein weiterer Schnitt gleicher Länge eröffnete die tieferen Schichten der Flankenwand und legte die retroperitoneal gelegene Niere frei. Die Nierenarterie und –vene wurden dargestellt und mit einem atraumatischen Gefäßclip (Yasargil Aneurysm Clip) hinter dem Abgang aus der Bauchschlagader und vor der Mündung in die Niere für die Dauer von 35 Minuten verschlossen.

Während der Ischämiezeit wurde die Wunde mit warmen, 0,9% NaCl-getränkten, sterilen Tupfern bedeckt, um den Wärme- und Flüssigkeitsverlust so gering wie möglich zu halten.

Am Ende der Ischämiezeit wurde der Gefäßclip entfernt und die Niere im Hinblick auf eine suffiziente Reperfusion beobachtet. Vor dem Verschluss der Bauchwand wurde 1 ml 37°C warmes 0.9% NaCl direkt in das Abdomen verabreicht. Die Unterhautnaht wurde mit einem resorbierbaren

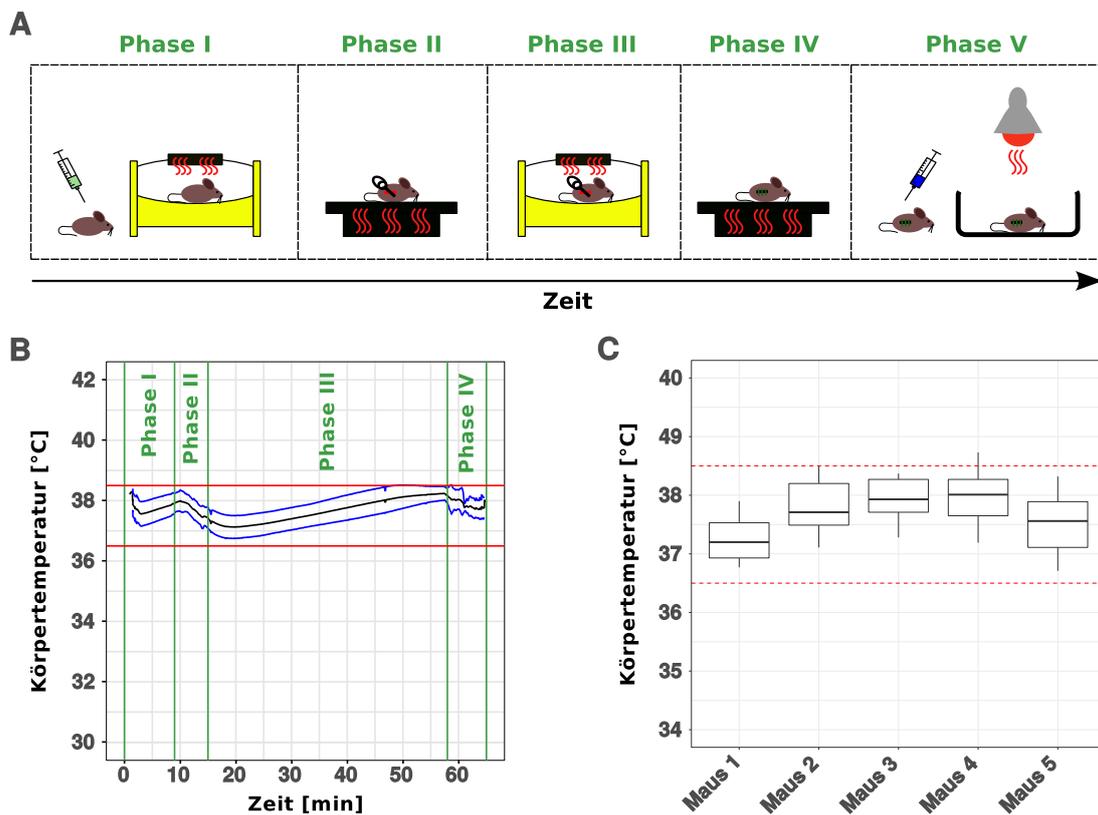


Abbildung 8: Intraoperative Temperaturkontrolle bei unilateraler rIRI. (A) Schematische Darstellung der eingesetzten Hilfsmittel zur Stabilisierung der Körperkerntemperatur der Versuchstiere im zeitlichen Verlauf der Operation. Phase 1: Einleitung der Narkose; Phase 2: Inzision und Abklemmen der Niere; Phase 3: Ischämiedauer; Phase 4: Einsetzen der Reperfusion der Nieren durch Entfernen der Klemmen und Wundverschluss; Phase 5: Antagonisierung der Narkose, Analgesie und Aufwachphase. (B) Das Protokoll ermöglichte es die Körpertemperatur der Tiere in den Phasen 1-4 mit geringer Varianz im Bereich zwischen 36,5 und 38,5 °C zu halten. Nach Ende der Phase 4 wurden die rektalen Temperatursonden entfernt, sodass für Phase 5 keine Daten vorliegen. Dargestellt sind Mittelwert (schwarz) und Standardabweichung (blau) von 5 Tieren. (C) Die Darstellung der Körperkerntemperatur über den gesamten Zeitraum (Phasen 1-4) für jedes Tier individuell diente als Qualitätskontrolle bzw. Ausschlusskriterium. Verändert nach Marschner et al.^[169]

Vicryl™, die Hautnaht mit einem nicht-resorbierbaren Ethibond Excel 5-0 Faden (beide von Ethicon) jeweils in Einzelknopfnähten verschlossen.

Bei dem oben beschriebenen Verfahren handelt es sich um eine unilaterale IRI-Operation, sodass die kontralaterale Niere (rechts) vollkommen unberührt verbleibt. Alle IRI-Experimente wurden in männlichen Tieren im Alter von 7-8 Wochen durchgeführt.

3.1.6 Akute und chronische Oxalatnephropathie

Zur Induktion einer akuten Oxalatnephropathie nach dem in Mulay et al.^[182] beschriebenen Modell wurden C57BL/6N Wildtyp bzw. *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Mäusen im Alter von 7-8 Wochen 100 mg/kg KG Natriumoxalat (NaOx) gelöst in PBS oder reines PBS i.p. injiziert. Hierfür wurden die Tiere im Nackengriff gefasst und auf den Rücken gedreht. Die entsprechende Lösung wurde mit einer Kanüle der Stärke 30G in einen der beiden unteren abdominalen Quadranten in Richtung cranio-medial appliziert. Dabei wurden die Mäuse im 30 °Winkel mit dem Kopf nach unten gehalten um eine Perforation des Darmkonvoluts zu vermeiden. Die Natriumoxalat-behandelten Tiere bekamen zudem eine 3%-ige Natriumoxalatlösung anstelle des normalen VE-Wassers der Kontrollgruppe. Allen Tieren stand

für die Versuchsdauer Futter ad libitum zur Verfügung. Nach 24 h wurde das Modell durch zervikale Dislokation der Tiere und Entnahme der Nieren beendet.

Basierend auf den Arbeiten von Knauf et al.^[137] und Mulay et al.^[181] wurde zur Induktion einer chronischen Oxalatnephropathie die Ernährung der Tiere auf ein von Ssniff Spezialdiäten GmbH hergestelltes Natriumoxalat-reiches aber Kalzium-armes Futter umgestellt (Zusammensetzung siehe Kap. 2.1.6). Eine Reduktion des Kalziums in der Diät erhöht die Verfügbarkeit von gelöstem Oxalat für die Absorption durch den Magen-Darm-Trakt^[137]. Dem ebenfalls von Ssniff hergestellten Kontrollfutter wurde kein Natriumoxalat zugesetzt sondern nur das Kalzium entzogen. Die Exposition mit der jeweiligen Diät erfolgte ad libitum für 21 Tage bei ansonsten Standard-Haltungsbedingungen (Kap. 3.1.1). Das Modell endete jeweils nach 21 Tagen mit zervikaler Dislokation der Tiere und Entnahme der Nieren.

3.1.7 Rekombinantes humanes Pentraxin 3 (rhPTX3)

Rekombinantes humanes PTX3 wurde in einer Konzentration von 2,5 mg/ml gelöst in PBS von Cecilia Garlanda und Alberto Mantovani (Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, Italien) für die Durchführung aller im Verlauf der Arbeit beschriebenen Studien zur Verfügung gestellt. Das Protein wurde in PER.C6 Zellen^[77,200] exprimiert und wie bei Bottazzi et al.^[31] beschrieben unter Endotoxin-freien Bedingungen mit Immunoaffinitätssäulen aufgereinigt. Die Reinheit der Präparation wurde per SDS-PAGE überprüft und eine Kontamination mit Endotoxinen per Limulus-amebocyte-Lysat-Assay und Ausbleiben einer Interleukin 6-Induktion in Monozyten ausgeschlossen. Als Vehikelkontrolle für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit rhPTX3 wurde entsprechend der vorliegenden Protein-Formulierung PBS verwendet.

Für *in chemico* Experimente wurde der Protein-Stock unverdünnt oder mit ddH₂O verdünnt eingesetzt. Für *in vivo* Experimente in Mäusen, die eine therapeutische oder substituierende Gabe von PTX3 vorsahen, wurde der rhPTX3 Stock auf 1 mg/ml verdünnt, sodass bei einem maximalen Injektionsvolumen von 10 ml/kg KG 5 mg/kg KG rhPTX3 injiziert werden konnten.

Die Anwendung des humanen Proteins in Mausmodellen erfolgte analog zu den Vorarbeiten der AG Anders^[151]. Basierend auf der ausgeprägten Homologie der Polypeptidsequenzen von 97,5 % zwischen Maus und Mensch^[155,83] wurde angenommen, dass die Funktion des rekombinanten humanen gegenüber des endogenen murinen Proteins in der Maus nicht vermindert ist. Rekonstitutionsexperimente mit rhPTX3-substituierten *Ptx3*^{-/-} Mäusen sowie *Ptx3*^{+/+} Geschwistern bestätigten bisher diese Annahme^[151]. Mögliche experimentelle Artefakte auf Grund dieses Vorgehens können allerdings nicht ausgeschlossen werden.

3.1.8 Intravenöse Injektion

Bei intravenösen Injektionen wurde das von der GV-SOLAS empfohlene Maximalvolumen von 10 ml/kg KG stets eingehalten. Die Tiere wurden im wachen Zustand in einem selbst gebauten Restraint fixiert (Abb. 9), der eine ausreichende Sauerstoffversorgung über Luftlöcher zusichert, gleichzeitig jedoch ein Umdrehen des Tieres verhindert. Nach Darstellung der Schwanzvene wurde diese mit einer 30G-0.5" Nadel punktiert und das entsprechende Volumen injiziert. Nach dem Herausziehen der Kanüle wurde die Injektionsstelle bis zum Stillstand der Blutung mit einem sterilen Mulltupfer komprimiert.

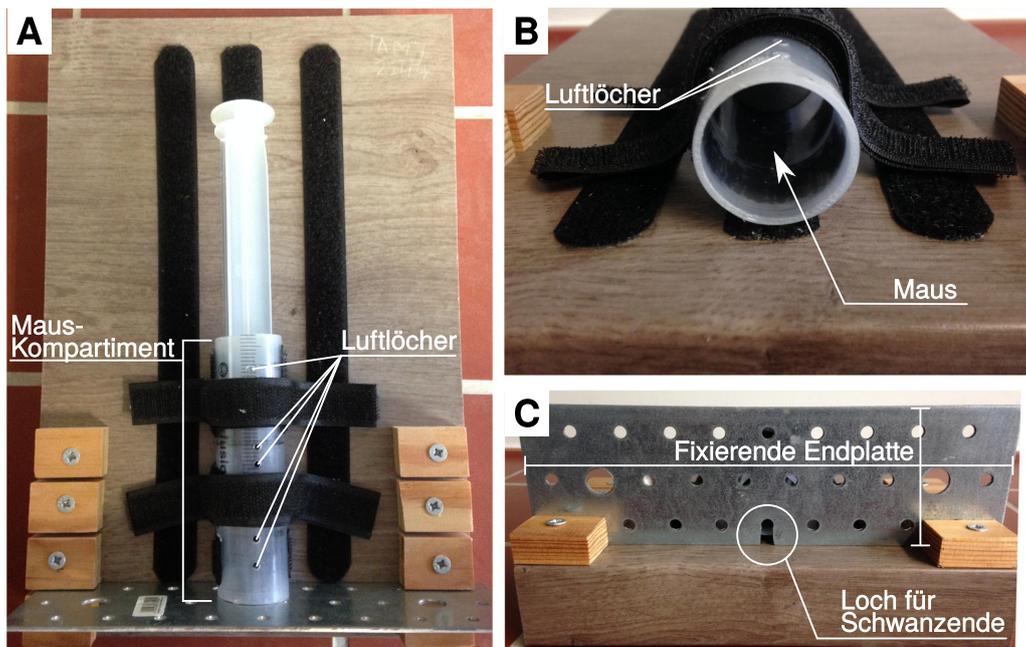


Abbildung 9: Maus-Restriener für intravenöse Injektionen. (A) Aufsicht: Auf einer beschichteten Holzplatte konnte eine nach Vorne hin offene 50 ml Perfusorspritze inklusive Kolben (Maus-Kompartiment) variabel fixiert werden. (B & C) Vorderansicht: Sobald die Maus in das mit Luftlöchern versehene Kompartiment hinein geführt wurde, konnte es mit einer Endplatte aus Stahl abgeschlossen werden. Dabei wurde der Schwanz der Maus durch eine eigens dafür angefertigte torähnliche Öffnung geführt.

3.1.9 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wurde mit Hilfe eines miniaturisierten Lichtsignalsensors (Imager) und dem Einsatz des i.v. applizierten, FITC-gelabelten GFR-Markers Sinistrin gemessen. Die Imager bestehen aus einer Licht-emittierenden Diode und einem Photodetector, die jeweils mit einem Blau-, bzw. Grün-Bandpassfilter sowie einem Akku ausgestattet sind^[233].

Zur Vorbereitung auf die Messung wurde das Versuchstier zunächst mittels Inhalationsnarkose (3% Isofluran in medizinischem Sauerstoff 4 l/min) narkotisiert. Das Tier wurde dazu in eine abgeschlossene Kammer gesetzt, in der das Narkosegas mit 2% angeflutet wurde. Nach einer Minute in der Kammer wurde das Versuchstier entnommen und die Rückenhaare in Höhe der Brustwirbelsäule auf einer Fläche von 1,5 * 2,5cm mit Hilfe eines handelsüblichen Einmal-Nassrasierers abrasiert, sodass der Imager direkt im Anschluss an die Rasur auf der nackten Haut angelegt und die Aufzeichnung gestartet werden konnte. Der Imager wurde mit Hilfe eines gefensterten doppel-seitigen Klebebandes (NIC-Pflaster, Mannherim Pharma & Diagnostics) auf der freirasierten Fläche angebracht und mit einem 1cm breiten Streifen Leukoplast zusätzlich gesichert. Dabei umfing der Streifen das Tier einmal in Höhe des Brustkorbes, allerdings deutlich unterhalb des Schultergürtels, um Wohlbefinden und Bewegungsfreiheit nicht zu beeinträchtigen. Durch die zusätzliche Sicherung wurde auch ausgeschlossen, dass das Tier Imager und Batterie zu fassen bekommen und dadurch eventuell zu Schaden kommen konnte. Die gesamte Prozedur passierte auf einer sterilen Unterlage unter einem dafür geeigneten Abzug (semi-sterile Bedingungen).

Von der Anbringung des Imagers bis zu seiner Entfernung wurde jedes Versuchstier einzeln in einem frisch autoklavierten Käfig gehalten, sodass es während der gesamten Messdauer wach war und sich frei bewegen konnte. 5 Minuten nach dem Start der Aufzeichnung, in denen Hintergrund-

werte für die spätere Datenanalyse vom Gerät aufgezeichnet wurden (Abb. 10A), konnte das Tier wie unter Kap. 3.1.8 beschrieben fixiert und die i.v. Injektion von 120mg/kg KG des FITC-markierten Sinistrins durchgeführt werden.

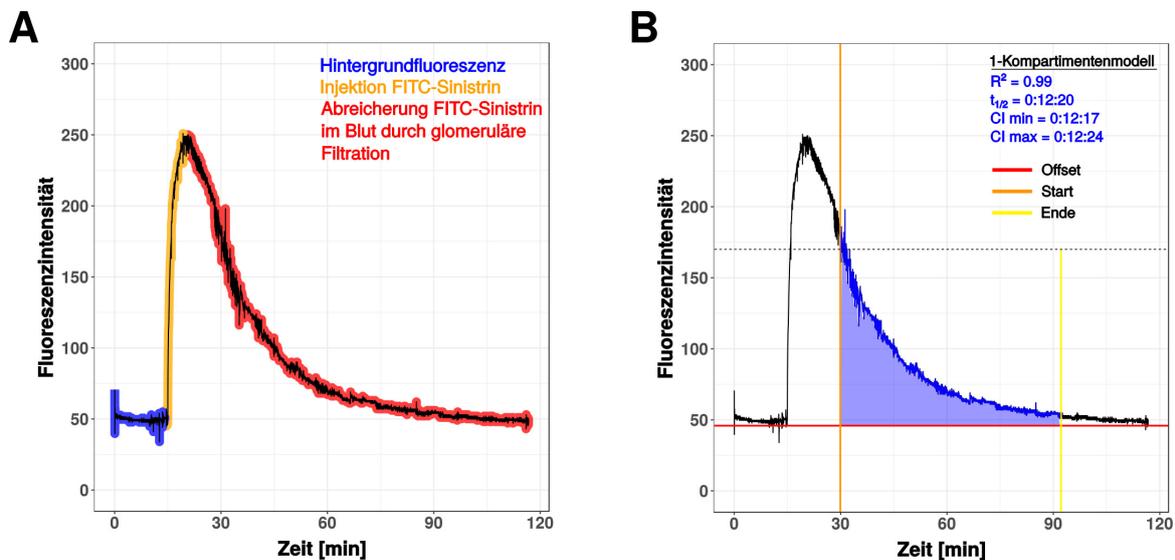


Abbildung 10: Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate. Dargestellt ist der typische Verlauf der transkutan gemessenen FITC-Emission in einem C57BL/6N Versuchstier im Alter von 8 Wochen mit normaler Nierenfunktion. (A) Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten lassen sich im Zeitverlauf in die Phasen der reinen Hintergrundfluoreszenz vor Injektion des FITC-Sinistrins (blau), der Injektion selbst (gelb) und der Abreicherung des Moleküls durch glomeruläre Filtration (rot). (B) Zur Bestimmung der Plasma-Halbwertszeit von FITC-Sinistrin wurden ein Schwellenwert für die Hintergrundfluoreszenz (= Offset, rot), der zeitliche Beginn der Auswertung bei 60 % der maximal erreichten Fluoreszenzintensität (= Start, orange) und das zeitliche Ende der Auswertung bei asymptotischer Annäherung an den Offset (= Ende, gelb) definiert. Die MPD-Lab Software errechnete darauf basierend die Area-under-the-curve (blau) und die davon abgeleitete Plasma-Halbwertszeit von FITC-Sinistrin.

Das pharmakologisch-toxikologische Profil der Substanz ist vergleichbar mit dem weit verbreiteten FITC-Inulin und daher als ebenso unbedenklich einzustufen^[204]. Das markierte Polysaccharid wird ausschließlich glomerulär filtriert und nicht im Körper zurückgehalten^[234], sodass es sich uneingeschränkt zur Bestimmung der GFR eignet. Es unterscheidet sich strukturell nur geringfügig vom etablierten FITC-Inulin^[165], ist aber deutlich besser wasserlöslich^[204], was höhere Konzentrationen bei gleichzeitigem Einhalten der empfohlenen Injektionsvolumina der GV-SOLAS ermöglicht.

Nach der Injektion verzeichnete der Imager einen sprunghaften Anstieg der transkutan gemessenen Fluoreszenz, welche bei gesunden Versuchstieren während der Messdauer von 90 Minuten wieder auf den Ausgangswert zurückfiel (Abb. 10A). Nach Ende der Messung wurde der Imager vorsichtig abgenommen und das Versuchstier wieder zurück zu seinen Artgenossen gesetzt.

Die gemessenen Fluoreszenzkurven wurden am PC mittels der MPD-Lab Application ausgelesen und der Abfall des Fluoreszenzsignals über die Zeit als Plasma-Halbwertszeit des FITC-Sinistrin ausgedrückt (Abb. 10B). Anhand eines empirisch ermittelten Umrechnungsfaktors und der Einbeziehung des Körpergewichtes (KG) ließen sich die Halbwertszeiten - wie in der unten stehenden Formel gezeigt - als GFR ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{gKG}$) darstellen^[293].

$$\text{GFR}[\mu\text{l}/\text{min}/100\text{gKG}] = \frac{14616,8[\mu\text{l}/100\text{gKG}]}{t_{1/2}[\text{min}]}$$

In mehreren Publikationen konnte gezeigt werden, dass die transkutan ermittelte GFR stark mit der tatsächlichen Plasma-Clearance korreliert^[233,232,231]. Die so gewonnenen Daten zeichnen sich durch hohe Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit aus^[231]. Die Unabhängigkeit dieser minimal-invasiven Methodik von Urin- oder Blutproben ermöglicht zudem wiederholte Messungen an einem Versuchstier in einem kurzen Zeitraum.

3.1.10 Urinabnahme

Spontanurin wurde im Zuge der Versuche zum chronischen Oxalatmodell zu verschiedenen Zeitpunkten im Experiment sowie zum Tötungszeitpunkt gewonnen. Das Versuchstier wurde auf einer rutschfesten Unterlage am Schwanz gehalten und der Urin wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen.

Sofern die Probe für eine Proteinanalyse bestimmt war, wurde der Urin bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert und bei -80 °C gelagert. Für die Bestimmung des Kalzium- und Oxalsäure-Gehaltes im Urin wurde der gesammelte Spontanurin mit 0,1N HCl angesäuert (1 µl auf 20 ml Urin), gründlich gevortext und bei -20 °C gelagert.

3.1.11 Blutabnahme

Zum Versuchsende wurden die Versuchstiere wie unter Kap. 3.1.9 bereits beschrieben mit einer Isofluran-Inhalationsnarkose anästhesiert und Blut wurde durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit einer Glaskapillare in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 10 µl 0,5 M EDTA aufgefangen. Direkt im Anschluss wurden die Mäuse wie unter Kap. 3.1.12 beschrieben euthanasiert, ohne aus der Kurznarkose aufzuwachen.

Bei Blutentnahmen während eines Versuches wurden einige Tropfen Blut durch Punktion der Schwanzvene gewonnen. Hierbei wurden maximal 7 % des Körpergewichtes des Versuchstieres in Gramm in Milliliter Volumen abgenommen. Das Versuchstier wurde hierfür nicht in Narkose versetzt sondern in eine Röhre geführt in der eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet war. Gleichzeitig fixierte die Röhre das Versuchstier in einer Position, in der es sich nicht umdrehen konnte. Wie oben beschrieben fanden auch hier 1,5 ml Reaktionsgefäße mit EDTA zum Auffangen des Blutes Verwendung. Durch Druck mit einer sterilen Kompresse auf die punktierte Stelle wurden eventuelle Nachblutungen gestillt.

Bei beiden Verfahren wurde im Anschluss an die Probengewinnung das Reaktionsgefäß bei 8000 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Plasma-Überstand abpipettiert und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.1.12 Entnahme der Nieren

Nach Beendigung der respektiven Versuchs wurden die Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation euthanasiert, fixiert und laparotomiert, um beide Nieren darzustellen und zu entnehmen. Die Nierenkapseln wurden durch vorsichtiges Pressen des intakten Organs durch Zeigefinger und Daumen beider Hände entfernt. Beide Nieren wurde wie in Abb. 11 gezeigt mit einem Skalpell in drei Teile zerteilt.

Das Mittelstück wurde sofort nach der Entnahme für 24 h in einer Einbettkassette in 4 % neutral gepuffertem Formalin eingelegt. Die weitere histologische Probenaufbereitung wird detailliert in Kap. 3.3 beschrieben. Der für Proteinextraktionen bestimmte Nierenpol wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Zum Schutz der RNA vor dem Verdau durch gewebeeigene RNAsen wurde der zweite Nierenpol in 500 µl RNAlater eingelegt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

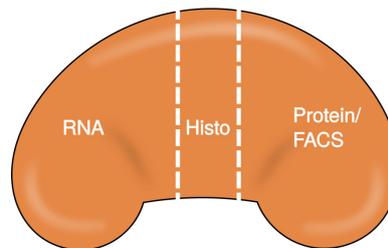


Abbildung 11: Aufteilung des Nierenparenchyms bei der Probennahme. Beide Nieren wurden transversal geschnitten, sodass das ca. 3-4 mm dicke Mittelstück, welches den Nierenhilus enthält für histologische Untersuchungen, die beiden Nierenpole hingegen für RNA- oder Proteinanalysen verwendet werden konnten. Alternativ wurde dieser Nierenpol für durchflusszytometrische Messungen aufbereitet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

Bei allen in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten wurde wenn möglich stets auf Eis gearbeitet. Sofern mit RNA gearbeitet wurde wurden alle Oberflächen, Pipetten, Racks, Elektrophoresekammern und andere Arbeitsmaterialien wenn möglich für 20 min mit RNase AWAY® behandelt und anschließend mit 70% Ethanol gereinigt. Arbeiten die 2-Mercaptoethanol beinhalteten wurden mit entsprechender Schutzkleidung unter einem Abzug durchgeführt.

3.2.1 Gesamt-RNA Isolation

Gesamt-RNA aus einem gesamten Nierenpol (siehe Abb. 11) wurde stets unter Verwendung des PureLink™ RNA Mini Kits (12183018A, Invitrogen) gewonnen. Das bei -20 °C in RNAlater aufbewahrte Gewebestück wurde in ein 5 ml Falcon® Polypropylen-Tube überführt, welches bereits 2 ml des Kit-eigenen und mit 1% 2-Mercaptoethanol versetzten Lysepuffers enthielt, und auf Eis gekühlt. Mit Hilfe eines ULTRA-TURRAX® wurde der Nierenpol zu einer feinen Suspension homogenisiert (20 sec, Stufe 4). Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Lösung nicht erwärmt. Die Suspension wurde wiederum auf Eis gestellt. Sofern notwendig wurde nach 5 min eine zweite Homogenisierung durchgeführt.

Das Rotorblatt des ULTRA-TURRAX® wurde nach jeder verarbeiteten Probe erst mit 70% Ethanol und dann mit ddH₂O gereinigt.

Für die Homogenisierung der *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Ovarien (siehe Kap. 3.1.2) wurden Lysing Matrix D Tubes mit 1,4 mm Keramik-Kügelchen verwendet. Hierzu wurde das Gewebe in dem oben beschriebenen Lysepuffer aufgenommen, in die Lysing Matrix D Tubes überführt und zweimal bei 6500 rpm für 50 s in einem Roche MAGNA Lyser homogenisiert. Die Proben wurden dabei vor und

nach sowie zwischen den Homogenisierungs-Einheiten auf Eis gekühlt. Sowohl ULTRA-TURRAX® als auch MagNA Lyser-aufbereitetes Gewebe wurde in gleicher Weise - wie im Folgenden beschrieben - weiterverarbeitet.

700 µl der Gewebesuspension wurden in einem neuen 1,5 ml Eppendorfgefäß mit ebenfalls 700 µl 70%-igem analytischen Alkohol gemischt und gründlich gevortext. Das Gemisch wurde in zwei Durchgängen mit je 700 µl auf die PureLink™-Silikagel-Säulen aufgetragen und bei 12000 g für 30 sec zentrifugiert. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen und die an die Säule gebundene Probe wurde einmal mit 350 µl Waschpuffer 1 gespült (Zentrifugation bei 12000 g, 30 sec).

Anschließend wurde ein DNase-Verdau durchgeführt um einer Kontamination der zu isolierenden RNA mit genomischer DNA entgegen zu wirken. Gemäß der Angaben des Herstellers (RNase-Free DNase Set (50), 79254, Qiagen) wurden 80 µl der DNase-haltigen Lösung auf die Säule pipetiert und bei RT für 15 min inkubiert. Danach wurde der oben beschriebene Waschschrift mit Waschpuffer 1 wiederholt. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit je 500 µl Waschpuffer 2 (Zentrifugation bei 12000 g, 30 sec), an deren Ende die Säule für 2 min trocken zentrifugiert wurde. Der Auffangbehälter der Säule wurden gegen ein RNase-/DNase-freies 1,5 ml Eppendorf-Gefäß getauscht und 32 µl RNase-freies Wasser aus dem Kit wurden auf die Säule pipetiert und für 1 min bei RT inkubiert. Die gebundene RNA wurde mit Hilfe des Wassers und durch Zentrifugation bei 20000 g für 2 min von der Säule gelöst und in dem Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Die aufgereinigte RNA wurde entweder bei -80 °C gelagert oder für die unmittelbare Weiterverarbeitung auf Eis gestellt. Wenn möglich wurde direkt im Anschluss an die RNA-Isolation eine Umschreibung zu cDNA eingeleitet (siehe Kap. 3.2.3). Andernfalls wurde die isolierte Gesamt-RNA bis zur Umschreibung bei -80 °C gelagert.

Im nächsten Schritt wurde die Gesamt-RNA-Konzentration und RNA-Reinheit mit Hilfe eines NanoDrop 1000 Spektrophotometers (Thermo Scientific) bestimmt. Prinzipiell wurden nur RNA-Proben mit einer 260/280-Ratio von 1,8 bis 2,2 weiterverarbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit lagen die Werte typischerweise zwischen 2,00 und 2,10. Proben mit Konzentrationen unter 150 ng/µl konnten im Anschluss nicht adäquat zu cDNA umgeschrieben werden. Für Gewöhnlich lagen die Gesamt-RNA-Konzentrationen, die aus dem oben beschriebenen Prozess gewonnen wurden, zwischen 1 und 2 µg/µl.

3.2.2 Analytisches MOPS-Gel

Bei Proben mit auffallend niedrigen RNA-Konzentrationen oder für den Fall, dass Zweifel an der Integrität der isolierten RNA bestanden wurde die Qualität der Probe an Hand eines analytischen MOPS-Gels (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure) nach einem Protokoll von Bruno Luckow überprüft.

Hierzu wurde ein 1%-iges Agarosegel (15510-500, Invitrogen Ltd.) in 1X MOPS-Puffer ohne Nukleinsäuren-Interkalatoren vorbereitet (siehe auch Kap. 3.1.2). Der 10X MOPS-Puffer wurde wie unter Kap. 2.2.2 beschrieben hergestellt. Von der zu untersuchenden RNA-Probe wurden 3 µl mit 17 µl eines zuvor präparierten Probenpuffers gemischt (siehe Kap. 2.2.2) und für 15 min bei 65 °C inkubiert. Die Proben wurden unmittelbar danach auf Eis gestellt, um eine Re-Konfiguration von RNA-Sekundärstrukturen zu unterbinden. Da diese Aufbereitung lediglich einer qualitativen Beurteilung diente wurden unterschiedliche RNA-Mengen in den verschiedenen Proben in Kauf genommen. In der Regel bewegten sie sich allerdings zwischen 1 bis 2 µg je Probe.

Das ausgehärtete Gel wurde mitsamt Gelkammer in eine entsprechende Elektrophoreseapparatur eingelegt und mit 1X MOPS-Puffer bedeckt. Das gesamte Probenvolumen wurde in die Gelta-schen pipettiert und die Probe wurde bei 80 V für 20-30 min aufgetrennt.

Im Anschluss wurden die Gelbanden mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und abphotographiert. Bei intakten und scharf umgrenzten 18S- und 28S-Banden wurde die Qualität der Probe als gut eingestuft (Abb. 12).

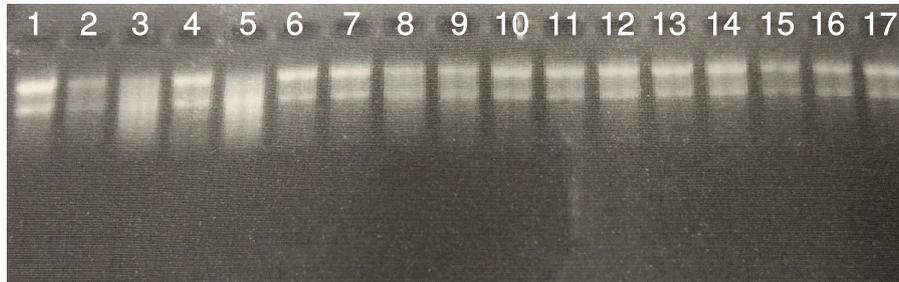


Abbildung 12: Beispiel eines Analytischen MOPS-Gels. Eine klare Trennung der beiden prominenten Banden (oben 28S rRNA, unten 18S rRNA) deutet auf nicht-degradierte RNA hin, während ein kontinuierlicher Schmier (Spalten 3 und 5) auf eine maßgebliche Degradation durch RNasen hindeutet. Die Spalten 1-17 stehen für jeweils unterschiedliche Proben.

3.2.3 Reverse Transkriptase PCR

Anhand der am NanoDrop bestimmten Gesamt-RNA-Konzentration jeder Probe wurden individuelle Verdünnungen mit RNase-freiem Wasser hergestellt, sodass eine standardisierte Konzentration jeder Probe von $0,1\bar{3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ zur Verfügung stand. Diese Verdünnungen wurden bei 65°C für 10 min im Thermocycler (Mastercycler[®]pro, Eppendorf AG) inkubiert und danach unmittelbar auf 4°C gestellt um etwaige RNA-Sekundärstrukturen aufzulösen. Zur Umschreibung der mRNA in cDNA wurde ein Mastermix bestehend aus randomisierten Hexanukleotid-Primern, einem äquimolaren Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix (dNTPs), einer reversen Transkriptase mit zugehörigem Puffer, einem RNase-Inhibitor, Acrylamid und Dithiothreitol (DTT) nach dem in Tabelle 7 beschriebenen Rezept hergestellt.

Tabelle 7: RT-PCR-Mastermix zur Umschreibung von mRNA zu cDNA. Angaben für eine Reaktion.

Reagenz	Volumen Ansatz +RT [μl]	Volumen Ansatz -RT [μl]
SuperScript [™] II Reverse Transcriptase	0,5	-
ddH ₂ O	-	0,5
5x First Strand Buffer	4,5	4,5
dNTPs (25 mM je Base)	0,45	4,5
Hexanucleotide Mix	0,25	0,25
RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor	0,5	0,5
Acrylamid 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25	0,25
DTT 0,1 M	1	1
Gesamt	7,45	7,45

Um für den Einfluss von etwaigen Resten an genomischer DNA in der späteren qPCR (Kap. 3.2.4) korrigieren zu können bzw. Kontaminationen mit DNA zu detektieren, wurden für jede Gesamt-

RNA-Probe zwei Umschreibungen durchgeführt, eine mit Reverser Transkriptase (+RT), eine mit ddH₂O (-RT).

Schließlich wurden 2 µg (entsprechend 15 µl RNA-Verdünnung) nach Zugabe von 7,45 µl in Quali-PCR-Tubes zu den in Tabelle 8 genannten Bedingungen im Mastercycler[®]pro (Eppendorf) umgeschrieben und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 8: Thermo-Cycler-Programm zur Umschreibung von mRNA zu cDNA.

Programm	Zieltemperatur [°C]	Dauer [min]
Umschreibung	42	120
Beendigung der Reaktion	85	5
Abkühlen	4	∞

3.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Zur Quantifizierung der mRNA-Transkripte eines bestimmten Zielgens wurde ein LightCycler 480 Real-Time PCR-System (Roche Diagnostics GmbH) unter Verwendung eines 96-Well-Formates eingesetzt. Diese Technik ermöglicht die kinetische Quantifizierung von PCR-Produkt-Doppelsträngen mit Hilfe des DNA-interkalierenden Farbstoffes SYBR[®] Green I, dessen Emissionsintensität für jede Probe am Ende jedes Zyklus vom Gerät bestimmt wird.

Als Template dienten die per RT-PCR cDNA umgeschriebenen Gesamt-RNA-Isolate (siehe oben). Die Primer zur Detektion der Zielgen-Transkripte (siehe Tab. 1) wurden so designt, dass die Schmelztemperaturen aller Primer-Paare bei 60±1 °C lagen (mit Ausnahme von *Gsta*, *Gstp1* und *Fabp1*). Damit konnte das gleiche qPCR-Programm (siehe Tab. 9) für alle Zielgene benutzt werden. Das wiederum ermöglichte die gleichzeitige Analyse verschiedener Zielgene auf einer 96-Well-Platte.

Tabelle 9: für die Genexpressionsanalyse im LightCycler 480.

Programm	Wiederholungen	Zieltemperatur [°C]	Dauer	Temperaturänderung [°C/s]
Initiale Denaturierung	1	95	5 min	4,4
		95	15 s	4,4
Amplifikation	40	60	15 s	2,2
		68	20 s	4,4
		95	5 s	4,4
Schmelzkurve	1	65	60 s	2,2
		97	-	0,11
		40	30 s	2,2

Aus der zuvor hergestellten cDNA sollte ein Volumenäquivalent von 0,2 µl in jede qPCR-Reaktion eingesetzt werden. Um die Pipettiergenauigkeit zu erhöhen und das Protokoll zu vereinfachen wurden 3 µl der jeweiligen cDNA-Probe mit 126,6 µl Ampuwa[®] Wasser verdünnt. Somit entsprachen 8,64 µl dieser Verdünnung zugleich der benötigten cDNA-Konzentration als auch dem insgesamt zuzusetzenden Wasservolumen für jede Reaktion. Die anderen Komponenten für jede Reaktion wurden als Mastermix für jedes Zielgen nach dem Rezept in Tabelle 10 hergestellt.

Es wurden für jede Reaktion 8,64 µl Probenverdünnung je Well vorgelegt und 11,36 µl Mastermix zugegeben. Nach Verschluss der 96-Well Lightcycler-Platte mit einer geeigneten transparenten Klebefolie (Sarstedt) wurde die Platte für 15 s bei 500 g zentrifugiert. Bis zur Durchführung der Reaktion im LightCycler 480 wurden die Platten bei 4 °C bis zu 6 h gelagert. Bei jedem Experiment wurde zusätzlich die Expression von 18S rRNA in jeder Probe bestimmt. Da sich diese Gewebe- und Behandlungs-übergreifend relativ unveränderlich zeigt^[18], wurde sie herangezogen um für die durch Isolation und Umschreibung bedingten Unterschiede zwischen den Gesamt-cDNA-Konzentration der unterschiedlichen Proben zu normalisieren.

Tabelle 10: qPCR-Mastermix für die Genexpressionsanalyse im LightCycler 480.

Reagenz	Volumen [µl]
SYBRgreen-Mix (siehe Kap. 2.2.4)	10
Taq DNA Polymerase	0,16
Forward Primer 10 µM	0,6
Reverse Primer 10 µM	0,6
Gesamt	11,36

Die Datenanalyse wurde mit der LightCycler® 480 Software durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle jeder Reaktion wurde zunächst eine Schmelzkurvenanalyse (siehe Tab. 9) vorgenommen. Nur Proben mit einem eindeutig zuordenbaren und von der Wasserkontrolle differenzierbaren Temperaturpeak wurden für die Crossing-Point-Analyse (Zyklusnummer, bei dem das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund tritt) verwendet. Der entsprechende Crossing Point (CP) wurde nach der softwareeigenen "Second Derivative Maximum"-Methode bestimmt. Die errechneten Werte wurden in die unten stehende Formel eingesetzt.

$$\Delta CP = E^{-(CP_{18S \text{ rRNA}} - CP_{Zielgen})}$$

Die Primereffizienzen E wurden zum Teil per serieller Verdünnungen herausgefunden (siehe Tab. 1) oder mit $E=2$ angenommen. Im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit sind die so erfassten Ergebnisse als *Zielgen* mRNA/ 18S rRNA gekennzeichnet. In Einzelfällen wurden die errechneten Ergebnisse für eine Intervention eines Experimentes auf die jeweiligen Kontrollen normalisiert, sodass verschiedene Experimente oder LightCycler-Läufe besser miteinander vergleichbar wurden (ausgedrückt als *relative Veränderung*).

$$\text{relative Veränderung} = \frac{\Delta CP_{\text{Intervention}}}{\Delta CP_{\text{Kontrolle}}}$$

3.2.5 Protein-Isolation

Zur Proteinextraktion wurden in flüssigem N₂ schockgefrorene und bei -80 °C aufbewahrte Nierenpole verwendet. Das Gewebe wurde in 500 µl RIPA-Puffer aufgenommen, mit Hilfe eines ULTRATURRAX® zu einer feinen Suspension homogenisiert (10 sec, Stufe 4, 3 mal) und dabei kontinuierlich

lich auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 2 h bei mäßiger Geschwindigkeit kopfüber in einem Rotator gewendet und am Ende bei 12700 g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Prozessierung bei -80 °C gelagert.

3.3 Histologische Methoden

Die im folgenden beschriebene Probenaufbereitung zur Herstellung histologischer Präparate sowie die histochemischen und immunhistochemischen Färbungen wurden nicht vom Verfasser der Arbeit selber durchgeführt, sondern in Absprache mit dem Betreuer von Frau Janina Mandelbaum und Herrn Dan Draganovici (Medizinisch-Technische Assistenten, Institut für Klinische Biochemie, Medizinische Klinik und Poliklinik IV der Universität München).

3.3.1 Aufbereitung des Nierengewebes und Herstellung histologischer Präparate

Formalin-Fixierung und Paraffineinbettung

Nach 24 h in 4 % neutral gepuffertem Formalin (siehe Kap. 3.1.12) wurden die Nierenmittelstücke in ihren Einbettkassetten in einen Karussell-Gewebeeinbettautomat (Shandon Citadel™, Thermo Electron Corporation) überführt und nach dem in Tab. 11 spezifizierten Protokoll in Paraffin (Paraplast®) eingebettet.

Tabelle 11: Einbett-Protokoll für Formalin-fixierte Nierenschnitte am Karussell-Gewebeeinbettautomat.

Station	Inhalt	Zeitintervall
1	70% Ethanol	5 h
2	96% Ethanol	1 h
3	96% Ethanol	1 h
4	100% Ethanol	1 h
5	100% Ethanol	1 h
6	100% Ethanol	1,5 h
7	Xylol	45 min
8	Xylol	45 min
9	Xylol	1 h
10	Paraffin	2 h
11	Paraffin	2 h

Die Einbettkassetten wurden nach Ende des Protokolls entnommen und an einer Paraffin-Ausgießstation (EC 350, Microm International GmbH) so im Paraffin eingebettet, dass sie an einem Rotationsmikrotom (HM 340 E, Microm International GmbH) in 2 µm Dicke transversal geschnitten werden konnten. Die Präparatschnitte wurden in einem 40 °C warmen Wasserbad (HI 1210, Leica Instruments GmbH) aufgefangen, auf Objektträger übertragen und über Nacht bei 60°C getrocknet. Die dazu verwendeten Objektträger wurde im Vorfeld zweimal für jeweils 5 min mit 100% Aceton und einmal für 5 min mit einer 0,02 %-igen Ammoniumpersulfat-Aceton-Lösung entfettet, mit ddH₂O gespült und luftgetrocknet.

Tabelle 12: Entparaffinisierung und Rehydrierung von Nierenschnitten.

Schritt	Lösungsmittel	Dauer [min]	Wiederholungen
1	Xylol	5	2
2	100 % Ethanol	1	3
3	96 % Ethanol	1	2
4	70 % Ethanol	1	1
5	ddH ₂ O	5	1

Zur Entparaffinisierung und Rehydrierung im Vorfeld der jeweiligen histochemischen oder immunhistochemischen Färbungen (Kap. 3.3.2) wurden die Präparatschnitte auf ihren Objektträgern wie in Tab. 12 beschrieben gewaschen.

Paraformaldehyd-Fixierung und Kryokonservierung

Für die Durchführung von immunhistochemischen Färbungen von Ptx3 wurden manche Proben mit einem anderen Verfahren konserviert, welches verglichen mit der Formalin-Fixierung und Paraffin-einbettung die zu markierenden Epitope des Proteins besser erhält. Hierzu wurden die Nierenpole der Reihe nach für 2 h in 4 % Paraformaldehyd (PFA), für 2h in 15 % Saccharose und schließlich über Nacht in 30 % Saccharose eingelegt. Bis zur Herstellung der Gefrierschnitte an einem Leica CM3000 Kryostat wurden die Proben trocken bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Histochemische und immunhistochemische Färbungen

Alle Objektträger wurden am Ende der jeweiligen unten beschriebenen Färbungen mit VectaMount™ eingedeckelt. Paraffin-eingebettete Schnitte wurden bei Raumtemperatur, Gefrierschnitte bei 4 °C gelagert. Aller weiter unten beschriebenen immunhistochemischen Färbungen erfolgten nach dem in Abbildung 13 beschriebenen Verfahren.

Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

Die entparaffinierten und rehydrierten Präparate wurden mit 0,5 %iger Periodsäure für 5 min bedeckt, mit ddH₂O gewaschen und für weitere 5 min mit Schiffschem Reagenz inkubiert. Dabei oxidierte die Periodsäure Glykogen- zu benachbarten Aldehydgruppen, welche wiederum mit der Fuchsin-schwefeligen Säure im Schiffschem Reagenz reagierten und eine magentarote Farbe ausbildeten. Es folgten 3 Waschschrte für jeweils 2 min in 37 °C warmen Wasser. Als Gegenfärbung zur Darstellung der Zellkerne wurden die Schnitte für 2 min mit der hämatoxylinhaltigen Farblösungen nach Mayer inkubiert und anschließend für 5 min mit Wasser gewaschen.

Kalziumoxalat-Färbung nach Pizzolato

Die Präsenz von Kalziumoxalat-Kristallen (CaOx-Kristallen) in Nierengewebe wurde durch Fällung von CaOx mit Silber(I)-nitrat zu Silberoxalat nachgewiesen^[206].

Dazu wurden die entparaffinierten und rehydrierten Präparate für 1 h mit einer Färbelösung aus 5 % Silber(I)-nitrat und 30 % Wasserstoffperoxid bedeckt und mit einer 60 W Glühbirne in ca. 15 cm

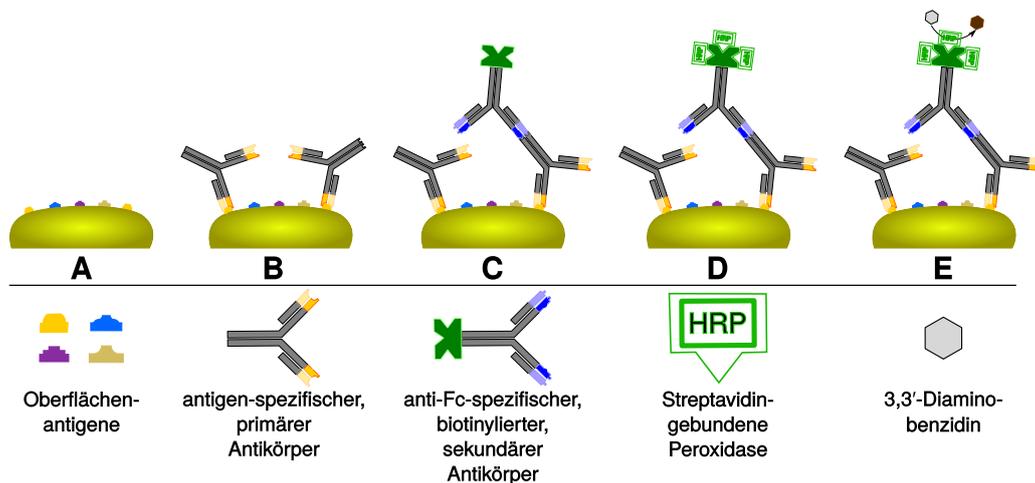


Abbildung 13: Funktionsweise der immunhistochemischen Färbestrategie. Nach Blockierung endogener Peroxidasen, Antigendemaskierung und Blockierung endogener Biotinbindungsstellen (A) waren die Präparate fertig zur antigenspezifischen Markierung mit dem entsprechenden primären Antikörper (B). Der primäre Antikörper wurde im Folgenden mit einem sekundären, biotinylierten Antikörper markiert (C). Die Biotinbindungsstellen des sekundären Antikörpers wurde mit Streptavidin-gebundener Meerrettichperoxidase (HRP) abgesättigt (D). Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid vermittelt HRP die Umwandlung von 3,3'-Diaminobenzidin zu einem durchlichtmikroskopisch detektierbaren Farbstoff (E).

Abstand erwärmt. Nach gründlichem Abwaschen der Probe mit ddH₂O wurde das restliche Gewebe um die schwarz erscheinenden Silberoxalat-Ausfällungen mit Kernechtrot (Nuclear Fast Red) für 5 min gegen-gefärbt und danach mit ddH₂O gespült. Der Schnitt wurde jeweils für zweimal 10 s erst mit 95 %-igem, dann mit 100 %-igem Ethanol und schließlich mit Xylol entwässert.

Färbung von Adgre1, Ly6b, Acta2 und proximalen Tubuluszellen

Immunhistochemische Färbungen wurden eingesetzt um Makrophagen (Adgre1), neutrophile Granulozyte (Ly6b) und Myofibroblasten (Acta2) in entparaffinierten und rehydrierten Nierenschnitten nachzuweisen. Die Identifizierung von differenzierten proximalen Tubuluszellen geschah durch den Einsatz von Lotus Tetragonolobus Lektin (LTL), welches an Zuckerseitenketten von Glykoproteinen und -lipiden auf der Oberfläche der Zellen bindet (Bürstensaum). Das im Folgenden beschriebene Protokoll gilt für alle vier Färbungen. Lediglich die Angaben in Tab. 13, die den Einsatz des jeweiligen primären Antikörpers/ LTL betreffen, ändern sich je nach Färbung.

Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die entparaffinierten und rehydrierten Präparate für 20 min im Dunklen bei RT in einer Lösung aus 20 ml 30 %igem Wasserstoffperoxid und 80 ml Methanol inkubiert und im Anschluss zweimal für 5 min in PBS gewaschen.

Für die Antigendemaskierung von Adgre1 wurde 200 ml Salzsäure bei pH 0,9 in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Die Präparate wurden in die Salzsäure gelegt, für 10 min bei 1 bar autoklaviert, 45 min zum Abkühlen stehen gelassen und zweimal für 5 min in PBS gewaschen.

Für die Antigendemaskierung von Ly6b und Acta2 wurden 3 ml Antigen Unmasking Solution (H-3300, Vector Laboratories) mit 297 ml ddH₂O in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Im Anschluss wurden die Präparate in die Antigen Unmasking Solution getaucht und bei 1 bar für 20 min autoklaviert. Nach ausreichender Abkühlung wurden die Schnitte mit PBS gewaschen.

Für die Darstellung der Zuckerketten im Bürstensaum der proximalen Tubuluszellen durch LTL wurden die Präparate für 10 min bei RT mit 50 µg/ml Proteinase K inkubiert und im Anschluss zweimal für 5 min in PBS gewaschen.

Endogenes Biotin in den Proben wurde durch Inkubation für 15 min einem Tropfen Avidin blockiert. Nach kurzem Waschen in PBS wurden freie Biotin-Bindungsstellen an dem gebundenen Avidin durch Zugabe von einem Tropfen Biotin abgesättigt (Avidin/Biotin Blocking Kit, SP-2001, Vector Laboratories). Das Präparat wurde abschließend zweimal für 5 min in PBS gewaschen und je nach durchzuführender Markierung nach den Angaben in Tab. 13 behandelt.

Tabelle 13: Immunmarkierungsprotokoll für Adgre1, Ly6b und Acta2.

Antigen	Solvent	Verdünnung	Inkubationsdauer	Temperatur
Adgre1	10%ige Magermilch	1:100	über Nacht	4°C
Ly6b	10%ige Magermilch	1:400	über Nacht	4°C
sek Hase anti-Ratte IgG	10%ige Magermilch	1:300	30 min	RT
Acta2	10%ige Magermilch	1:300	über Nacht	4°C
sek Ziege anti-Maus IgG2a	10%ige Magermilch	1:300	30 min	RT
LTL	PBS	1:250	1 h	RT

Am Ende der Inkubation wurde das Präparat zweimal für 5 min in PBS gewaschen. Zur Einführung einer antikörperspezifischen Avidin-Bindungsstelle wurde das Präparat mit einem entsprechenden sekundären biotinylierten Antikörper, der den Fc-Abschnitt des primären Antikörpers erkennt, in einer 300fachen Verdünnung in Milch für 30 min aufgetragen. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen in PBS für je 5 min entfernt.

Für die Konjugation der Meerrettichperoxidase H mit dem biotinylierten Antikörper wurde das VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit (PK-6100, Vector Laboratories) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden pro Präparat je 15 µl Reagenz A und Reagenz B mit 1 ml PBS vermischt und der Schnitt für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde durch 5 min Waschen in PBS und anschließend in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) entfernt.

Um die immunhistochemisch markierten Epitope für die Durchlichtmikroskopie sichtbar zu machen, wurden Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) eingesetzt. Dazu wurden zu 200 ml 37 °C warmem TRIS 4 ml DAB-Arbeitslösung und 1 ml 8 %iges Nickelchlorid (zur Stabilisierung und Intensivierung der Färbung von braun zu schwarz) hinzugegeben. Kurz vor der Inkubation des Präparates mit der Lösung wurden 500 µl 3 %iges H₂O₂ hinzugegeben. Letzteres diente den immunhistochemisch gebundenen Peroxidasen als Substrat. Die dabei frei werdenden Protonen reduzieren DAB, welches in dieser Form als braun-schwarzes Präzipitat ausfällt. Die Gegenfärbung des Schnittes erfolgte mit Methylgrün für 2 min. Im Anschluss wurde rasch erst mit 96 %igem, dann mit 100 %igem Ethanol und schließlich mit Xylol entfärbt.

Färbung von Ptx3

Für alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modelle blieben immunhistochemische Analysen für Ptx3, die durch den Verfasser der Arbeit oder von Frau Janina Mandelbaum durchgeführt wurden, erfolglos. Färbungen mit den kommerziell verfügbaren Antikörpern - sowohl mono- als auch polyklonale – an Paraffin-eingebetteten oder Gefrierschnitten ergaben lediglich unspezifische Färbungen

(Tab. 14). Daher stand diese Methode für eine Untersuchung der Ptx3-Expression in den verschiedenen Krankheitsmodellen im Haus nicht zur Verfügung.

Tabelle 14: Immunmarkierungsprotokolle für Ptx3.

Protokoll	AK	Firma (Kat.-Nr.)	Präparat	Verdünnung	Inkubation	Temperatur
1	Prim.	Enzo (ALX-210-365-C050)	Paraffin	1:50	72 h	4 °C
	Sek.	Linaris (ZRB1001)		1:300	30 min	RT
2	Prim.	Alpha (PTX31-A)	Paraffin	1:50	48 h	4 °C
	Sek.	Linaris (ZRB1001)		1:300	30 min	RT
3	Prim.	Hycult (HM1130)	Kryo	1:50	1 h	4 °C
	Sek.	Biologend (406603)		1:300	30 min	RT

Schlussendlich war es möglich, einige Färbungen durch Herrn Fabio Pasqualini im Labor von Alberto Mantovani und Cecilia Garlanda durchführen zu lassen. Hierzu wurden paraformaldehyd-fixierte und kryokonservierte Nierenschnitte auf 8 µm Dicke geschnitten und auf SuperFrost Objektträgern erneut für 15 min mit 4 % PFA fixiert. Die Blockierung endogener Peroxidasen erfolgte durch Inkubation mit 3 %-igem H₂O₂ für 5 min, unspezifische Bindungsstellen wurden durch 30-minütige Exposition mit einer 2 %-igen BSA-Lösung abgesättigt. Die Schnitte wurden für 1 h mit 5 mg/ml des polyklonalen Hase anti-rhPTX3 Antikörpers von Enzo Life Sciences Inc. (ALX-210-365-C050) inkubiert und danach gründlich mit PBS gewaschen. Die Konjugation des primären Antikörpers mit einer Meerrettichperoxidase erfolgte nicht mittels einer Biotin-Avidin-Bindung, wie in den oben beschriebenen Protokollen, sondern mittels der MACH1 Universal HRP Polymer Technik (M1U539 L10, Biocare Medical) nach Angaben des Herstellers. Die Peroxidase-haltige Lösung wurde für 30 min auf die Schnitte aufgetragen und danach mit PBS abgewaschen. Die markierten Epitope wurden analog zu dem weiter oben beschriebenen Verfahren mit H₂O₂ und DAB sichtbar gemacht. Zur Gegenfärbung der Schnitte wurde hämatoxylinhaltige Farblösung verwendet.

Die in dieser Arbeit gezeigten und ausgewerteten Ptx3-gefärbten kryokonservierten Nierenschnitte stammen von Herrn Pasqualini. Im Nachgang wurde das entsprechende Protokoll in der AG Anders etabliert und für andere, in dieser Arbeit nicht gezeigte Experimente erfolgreich angewandt.

3.3.3 Histopathologische Befundung

Auswertung der PAS-Färbungen

Die Schädigung der Nieren durch in verwendeten Krankheitsmodellen wurde an Hand von PAS-Schnitten abgeschätzt. Dabei wurden pro befundeter Niere mindestens 10 lichtmikroskopische Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung gemacht. Diese wurden in ImageJ mit einem Raster überlagert, dessen Einzelzellen 5 % der Bildfläche ausmachten. Im Folgenden konnte dadurch der jeweilige Flächenanteil von zellulären Nekrosen, proximalen Tubulsabschnitte ohne intakten Bürstensaum, Castformationen, tubulären Dilatation und interstitiellen Infiltraten in 5%-Schritten geschätzt und je nach Fragestellung einzeln oder summiert als Ergebnis dargestellt werden.

Auswertung aller anderen Färbungen

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Färbungen, denen eine DAB-basierte Kenntlichmachung der immunmarkierten Epitope zu Grunde lag, sowie die CaOx-Färbung nach Pizzolato konnten semi-quantitativ ausgewertet werden. Dazu wurden durchlichtmikroskopische Aufnahmen (je nach Färbung in unterschiedlicher Vergrößerung) angefertigt und nach dem in Abb. 14 dargestellten Prozedere mit der Bildbearbeitungssoftware GIMP (GNU Image Manipulation Program) verarbeitet.

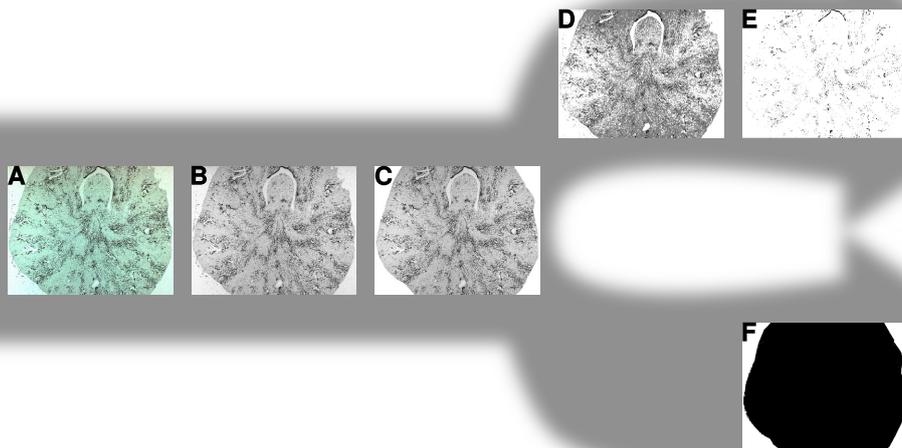


Abbildung 14: Semi-quantitative Auswertung immunhistochemischer Färbungen. (A) durchlichtmikroskopischen Originalaufnahmen wurden mit Gimp wie folgt verarbeitet: (B) Die Aufnahmen wurden entsättigt, sodass ein Graustufe-Bild entstand. (C) Die abgebildete Parenchymfläche wurde frei Hand ausgeschnitten und der Rest des Bildes wurde verworfen. (D) Das Bild wurde von 255 auf 3 Grauwerte reduziert (Weiß-Grau-Schwarz), sodass die dunklen Stellen im Bild, die auf dem Schnitt einem hohen DAB-Umsatz entsprechen, im Vergleich zum Originalbild flächenmäßig korrekt erfasst werden. (E) Der Grau-Anteil des Bildes wird entfernt, sodass ein reines Binärbild entsteht. (F) Parallel zu den Schritten (D-E) wird das gesamte Nierenparenchym schwarz eingefärbt, sodass auch hier ein Binärbild entsteht.

Am Ende entstanden aus jedem Originalbild zwei Binärbilder. Die schwarzen Pixel des ersten Bildes deckten sich mit den dunkel gefärbten Stellen im Originalbild (Abb. 14E), während das andere Bild die Parenchym-Referenzfläche in schwarz darstellte (Abb. 14F). Die Anzahl schwarzer Pixel beider Bilder wurde mit Hilfe der Bildanalysesoftware ImageJ (Fiji) erfasst. Der Anteil positiv gefärbter Pixel an der aufgenommenen Gesamtfläche des Nierenschnittes konnte damit für die Darstellung der Ergebnisse prozentual angegeben werden.

Abweichend zu der oben beschriebenen Methode wurde die CaOx-Kristalldeposition in den Studien zur akuten Oxalatnephropathie nicht mit ImageJ, sondern mit einer anderen bereits etablierten Methode quantifiziert^[289,182]. Dazu wurden Werte wie folgt vergeben:

- 0: keine Kristalldeposition
- 1: Kristalle in der Papille
- 2: Kristalle in der Medulla
- 3: Kristalle im Kortex

Wenn Kristalle in mehreren Nierenabschnitten zu finden waren, wurden die Einzelwerte zu einem Gesamtscore aufsummiert.

3.4 Biochemische Methoden

Die im nachfolgenden beschriebenen biochemischen Analysen wurden stets in Triplikaten der zu untersuchenden Probe durchgeführt.

3.4.1 Kreatinin-Bestimmung nach Jaffé

Die Kreatininkonzentration in Blutplasma und Urin der Versuchstiere wurde nach der Jaffé-Methode bestimmt (Creatinine FS, DiaSys Diagnostic System GmbH). Unter stark alkalischen Bedingungen bildet Pikrinsäure mit Kreatinin orangerote Farbkomplexe, deren Absorptionsverhalten bei 492 nm photometrisch gemessen werden kann.

Plasmaproben wurden unverdünnt, Urinproben im Verhältnis 1:9 mit ddH₂O verdünnt analysiert. Der mitgelieferte Kreatininstandard des Kits wurde in unterschiedlichen Volumina (5-20 µl) eingesetzt um verschiedene Endkonzentrationen zu erhalten. Volumenunterschiede zwischen den einzelnen Standards wurden mit ddH₂O ausgeglichen. Jeweils 10 µl Probe wurde auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die Pikrinsäure-haltigen Arbeitslösung wurde nach Angaben des Herstellers aus den Reagenzien R1 (4 Teile) und R2 (1 Teil) hergestellt und mit 200 µl pro Well eingesetzt. Die erste Absorptionsmessung bei 492 nm Wellenlänge erfolgte nach 60 s Inkubation von Reagenz und Probe, die zweite nach weiteren 120 s. Die gewonnen Absorptionsmesswerte beider Zeitpunkte wurden nach dem in Abb. 15A dargestellten Prinzip verrechnet. Anhand der mitgeführten Standardreihe und der Erstellung einer linearen Regression zwischen den bekannten Standard-Konzentrationen und den zugehörigen Absorptionswerten konnte den unbekannt Proben ein Kreatinin-Messwert in mg/dL zugewiesen werden.

3.4.2 BUN-Bestimmung

Der Harnstoffgehalt im Blutplasma der Versuchstiere wurde indirekt über eine doppelte enzymatische Umwandlung unter Verwendung des Urea FS DiaSys Kits gemessen. Urease spaltet hierbei den verfügbaren Harnstoff in Ammoniumionen und Hydrogencarbonat. Die Ammoniumionen werden von dem zweiten Enzym, Glutamatdehydrogenase, zur Aminierung von α -Ketoglutarat zu L-Glutamat unter Verbrauch von NADP(H) verwendet. Die Abnahme von NADP(H) in der Probe ist proportional zur Abnahme ihres Absorptionsmesswertes bei 340 nm und kann demnach absorptionsphotometrisch bestimmt werden.

Plasmaproben wurden unverdünnt analysiert. Der mitgelieferte Harnstoffstandard des Kits wurde in unterschiedlichen Volumina (2-10 µl) eingesetzt um verschiedene Endkonzentrationen zu erhalten. Volumenunterschiede zwischen den einzelnen Standards wurden mit ddH₂O ausgeglichen. Jeweils 2 µl Probe wurde auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die Arbeitslösung aus Urease, Glutamatdehydrogenase, α -Ketoglutarat und NADP(H) wurde nach Angaben des Herstellers aus den Reagenzien R1 (4 Teile) und R2 (1 Teil) hergestellt und mit 200 µl pro Well eingesetzt. Die erste Absorptionsmessung bei 340 nm Wellenlänge erfolgte nach 60 s Inkubation von Reagenz und Probe, die zweite nach weiteren 120 s. Die gewonnen Absorptionsmesswerte beider Zeitpunkte wurden nach

dem in Abb. 15B dargestellten Prinzip verrechnet. Anhand der mitgeführten Standardreihe und der Erstellung einer linearen Regression zwischen den bekannten Standard-Konzentrationen und den zugehörigen Absorptionswerten konnte den unbekanntenen Proben ein Harnstoff-Messwert in mg/dL zugewiesen werden.

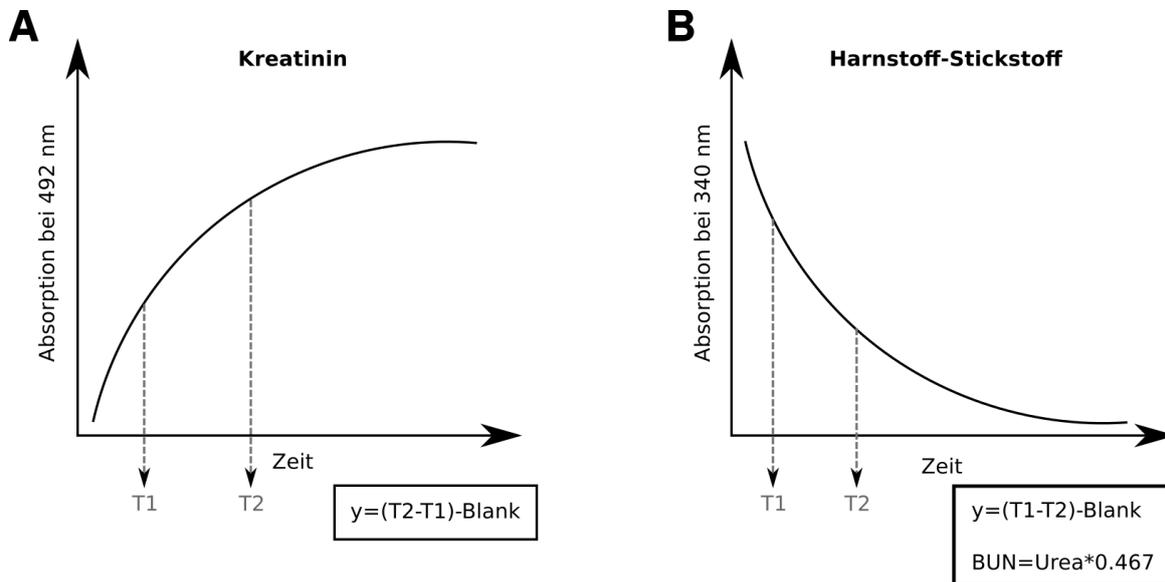


Abbildung 15: Messverfahren für Kreatinin- und Stickstoff-Harnstoff-Bestimmung. (A) Die Rate der Ausbildung der Pikrinsäure-Kreatinin-Farbkomplexe (T_2-T_1) ist direkt proportional zur Kreatininkonzentration der gemessenen Lösung. In der frühen Phase der Reaktion (unter 60s) interferieren schnell reagierende Ketoazide mit der Pikrinsäure, weshalb die Rate im linearen Teil der Reaktion ($T_1-T_2= 60-180$ s) bestimmt wird, bevor die Reaktion ihre Sättigung erreicht. Von der Differenz der Absorptionswerte zu beiden Zeitpunkten wurde der Hintergrundwert der Reaktionslösung (Blank) abgezogen um den endgültigen Messwert (y) zu erhalten. (B) Die Abnahmerate von NADP(H) ist nach Angaben des Herstellers zwischen 60 s (T_1) und 180 s (T_2) nach Reaktionsbeginn proportional zur Harnstoffkonzentration der Probe. Der endgültige Messwert (y) wurde analog zu (A) berechnet. Zur Abschätzung des Blut-Stickstoff-Harnstoffes (BUN) wurde der gewonnene Harnstoff-Wert (Urea) empirisch nach Angaben des Herstellers mit 0,467 multipliziert.

3.4.3 Kalzium-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung von Kalziumionen im Urin von Versuchstieren (Kalzium Colorimetric Assay, Sigma Aldrich) beruht auf der Bildung eines chromogenen Komplexes zwischen freien Kalziumionen und o-Kresolphthalein. Die bei 575 nm gemessenen Absorptionswerte dieses Komplexes verhalten sich proportional zu der Kalziumionenkonzentration im Urin.

Gemäß den Angaben des Hestellers wurden jeweils 20 μ l angesäuerten Urins oder 0-20 μ l des 5 mM Kalziumstandards in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit ddH₂O auf 50 μ l aufgefüllt. Im Folgenden wurden erst 90 μ l der o-Kresolphthalein-haltigen Lösung dann 60 μ l des zugehörigen Puffers dazugegeben und jeweils vorsichtig durchgemischt. Nach 10 min Inkubation im Dunklen bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 575 nm im Photometer gemessen. Aus den Absorptionswerten des Kalziumionenstandards und dessen bekannten Konzentrationen wurden eine lineare Standardkurve abgeleitet und die gemessenen Absorptionswerte der Urinproben über die Regressionsgleichung den entsprechenden Konzentrationen zugeordnet.

3.4.4 Oxalat-Bestimmung

Der Oxalsäure-Gehalt in angesäuertem Urin wurde mit Hilfe einer gekoppelten Enzymreaktion mit Hilfe eines Oxalic Acid Colorimetric Assay Kit von LTA S.r.l. (CC02410) bestimmt. Die enzymatischen Reaktion wurden vom Hersteller nicht weiter spezifiziert, basiert aber vermutlich auf der Katalyse von Oxalsäure zu Kohlenstoffdioxid und Wasserstoffperoxid durch Oxalatoxidase^[228] und die anschließende Oxidation eines organischen Farbstoffes durch eine Peroxidase, die Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel verwendet. Die oxidierte Form des Farbstoffes, bzw. der bei der Oxidation festzustellende Farbumschlag, kann absorptionsphotometrisch gemessen werden.

Nach Angaben des Herstellers wurden 5 µl der Probe, bzw. des mitgelieferten Standards auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und zunächst mit 100 µl einer 1:1 Mischung der Reagenzien 1 und 2 behandelt. Anschließend wurden 10 µl von Reagenz 3 je Well dazugegeben und die Absorption der resultierenden Lösungen nach 10 min Inkubation bei RT bei 590 nm gemessen. Die Umrechnung der Absorptionswerte in mM Oxalsäure erfolgte nach der vorgegebenen Formel:

$$\text{Oxalsäure[mM]} = \frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}}}{\text{Absorption}_{\text{Standard}}} * 0,5$$

Parallel wurde der Kreatiningehalt der jeweiligen Urinprobe wie in Kap. 3.4.1 beschrieben bestimmt. Die Normalisierung vom Oxalsäure- auf den Kreatiningehalt je Probe (mM Oxalsäure/mg Kreatinin) korrigierte für Unterschiede im Wassergehalt und damit etwaige Verdünnungsartefakte zwischen den Proben.

3.4.5 Bradford-Test zur quantitativen Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der Bradford-Test macht sich zu Nutze, dass der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blue G-250 unter sauren Bedingungen mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen einen stabilen Sulfonat-Komplex bildet, der - im Gegensatz zur ungebundenen Form des Farbstoffes - sein Absorptionsmaximum bei 590 nm hat^[55].

Bei den Proben, deren Proteingehalt bestimmt werden sollten, handelte es sich um Urinproben (siehe Kap. 3.1.10), die bis zur Durchführung des Bradford-Tests bei -80 °C lagerten. Es wurden jeweils 10 µl der unverdünnten und der im Verhältnis 1:9 verdünnten Probe in Duplikaten, sowie eine BSA-Verdünnungsreihe (0-10 µg BSA) in Tripletten auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Nach Zugabe von 200 µl des 1:4 verdünnten Bradford-Reagenz (AdcancedTM Protein Assay Reagent 5X Concentrate, Cytoskeleton Inc.) und nach 10 min Inkubation im Dunklen bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 590 nm im Photometer gemessen.

An Hand der BSA-Standardreihe konnte den Absorptionswerten der gemessenen Proben eine definitive Konzentration zugewiesen werden. Anschließend wurde jede Probe mit ddH₂O so verdünnt, dass die Gesamtproteinkonzentration bei 1,95 mg/ml lag. Um die Proteine zu denaturieren wurden 25 µl reduzierender Probenpuffer (PierceTM Lane Marker Reducing Sample Buffer, Thermo Fisher Scientific) zu 75 µl Probe gegeben, gevortext und bei 95 °C für 5 min im Thermomix inkubiert. Der verwendete Probenpuffer erfüllt laut Herstellerangaben die Funktion eines Puffers nach Laemmli. Die so präparierten Proben hatten eine Proteingesamtkonzentration von 2,6 mg/ml, sodass 20 µl Probe 40 µg Protein entsprachen. Nachdem die Proben für ca. 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt

wurden, konnten sie entweder gleich in der SDS-PAGE (Kap. 3.4.6) weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert werden.

3.4.6 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der denaturierten Urinproben (siehe Kap. 3.4.5) gemäß der Molekülmassen der Einzelbestandteile wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt^[145]. Zur Herstellung der Gele und Durchführung der Gelelektrophorese wurde das Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad Laboratories GmbH) verwendet. Zwei rechteckige, deckungsgleiche Glasplatten mit jeweils einem 1,5 cm dicken Abstandshalter links und rechts wurden so in die zugehörige Gel-Apparatur eingeklemmt, dass sie unten und an den beiden Seiten dicht abschlossen. Nach den Spezifikationen in Kap. 2.4.2 wurde zunächst das Trenngel angesetzt und blasenfrei in die zusammengebaute Gussform eingefüllt und mit ddH₂O bedeckt. Nach 30 min war die radikalische Polymerisation abgeschlossen und das überschüssige Wasser wurde entfernt. Nach Ansetzen des Sammelgels wurde dieses ebenfalls blasenfrei auf das bereits feste Trenngel gegossen. Durch Einsetzen eines 1,5 cm dicken Kammes am oberen Ende der Gussform wurden Taschen geschaffen, in die später die Proben geladen werden konnten.

Nach 20 min wurde der Kamm aus dem nun festen Sammelgel entfernt, das Bodenteil der Gel-Apparatur geöffnet und im Ganzen in die Mini-PROTEAN® Tetra System Elektrophoresekammer gestellt. Die Kammer wurde so mit Laufpuffer gefüllt, dass das Gel von allen Seiten direkten Kontakt zum Puffer hat. Die wie in Kap. 3.4.5 beschriebenen aufbereiteten Proben wurden mit je 40 µl in die Probenaschen geladen. Zudem wurde in eine Tasche MagicMark™ XP Western Protein-Standard gegeben (LC5602, Invitrogen Ltd.) um im anschließenden Western Blot eine Identifizierung des immunmarkierten Proteins nach dessen Größe zu ermöglichen.

Die Elektrophorese wurde mit 100V (bei 24 mA) gestartet. Nachdem die Proben das Sammelgel verlassen und in das Trenngel übergewandert waren, wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet sobald der Farbanteil des Probenpuffers das Ende des Trenngels erreicht hatte. Die daran direkt anschließenden Schritte werden in Kap. 3.5.3 beschrieben.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde zur präzisen Bestimmung der Zusammensetzung der intrarenalen Immunzellpopulationen unter den verschiedenen in der vorliegenden Arbeit thematisierten pathophysiologischen Bedingungen angewandt. Die zu diesem Zweck verwendeten Fluorochrommarkierten, monoklonalen Antikörper sind in Tab. 15 aufgeführt. Alle Analysen wurden mit Hilfe eines FACSCanto (BD Biosciences) durchgeführt.

Probenaufbereitung

Falls nicht anders spezifiziert wurden alle Prozeduren der Probenaufbereitung bei 4 °C oder auf Eis und unter Verwendung 4 °C kalter Reagenzien und Lösungen durchgeführt.

Nach Entnahme der Nieren wurde jedes Organ einzeln in 2 ml eines Verdauungspuffers - bestehend aus 8 mg Kollagenase und 2000 U DNase I in 2 ml PBS - aufgenommen und mit Hilfe des Kolbens einer 2 ml Spritze vorsichtig klein gerieben. Die grobe Suspension wurde anschließend für 40 min bei 37 °C inkubiert. Um schlussendlich eine Einzelzellsuspension herzustellen, wurde das Gemisch mit einer 2 ml Spritze aufgenommen und erst drei mal durch eine 20G und dann drei mal durch eine 25G dicke Nadel gedrückt. Die so homogenisierte Suspension wurde durch einen Filter mit 70 µm Maschenweite in ein 15 ml Falcon passagiert und auf ein Gesamtvolumen von 10 ml mit PBS aufgefüllt.

Nach einer Zentrifugation bei 400 g für 5 min wurde der Überstand dekantiert und in 5 ml Nykodenz-Lösung (Kap. 2.5.1) resuspendiert. Auf diese Suspension wurden vorsichtig 2 ml FBS pipettiert, sodass eine klare Phasengrenze zwischen beiden Lösungen erhalten blieb. Nach einer Zentrifugation bei 520 g für 20 min ohne Bremse war ein gut abgrenzbarer Leukozytenfilm zwischen der Nykodenz- und der FBS-Phase entstanden. Dieser wurde in ein neues 15 ml Falcon überführt, auf 10 ml mit PBS aufgefüllt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Großteil der Nierenparenchymzellen verblieb auf diese Weise als Pellet am Boden des Nykodenz-Falcons.

Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde die Zellsuspension - je nach Größe des Zellpellets - in 0,5 bis 1 ml PBS resuspendiert und gleichmäßig auf 5 ml Polystyren-Falcon-Tubes aufgeteilt. Die Zahl benötigter Tubes variierte je nach gewähltem Färbungsprotokoll, bestand aber für gewöhnlich aus folgenden Tubes:

- (1) Unmarkiert: keine Zugabe von Antikörpern zur Feststellung der Autofluoreszenz der Zellen bzw. Hintergrundrauschen der Messung
- (2) Zellzählung: Zugabe von counting beads zur Feststellung der genauen Anzahl erfasster Zellen
- (3) 1-2 Färbungen: Zugabe von bis zu 7 Antikörpern pro Tube zur Charakterisierung und Differenzierung der intrarenalen Leukozytenpopulationen

Die Zellen, die im Folgenden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gefärbt werden sollten, wurden nun zunächst für 10 min mit einem Zombie-Farbstoff zur späteren Diskriminierung zwischen lebenden und toten Zellen inkubiert. Die Färbung erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers (Zombie NIR™ Fixable Viability Kit, BioLegend, Inc.). Nach Ende der Inkubation wurden alle Tubes (auch 'Unmarkiert' und 'Zellzählung') mit 2 ml FACS-Puffer (5g BSA und 0,5g Natriumazid auf 500 ml PBS) aufgefüllt und bei 300g für 5 min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 ml FACS-Puffer resuspendiert. Erneut wurden nur die Zellen in den Färbungs-Tubes mit einem Fc-Rezeptor-Block (anti-CD16/CD32) gemäß den Angaben des Herstellers für 10 min inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, unspezifische Bindungen der jeweiligen Antikörper an Fc-Rezeptoren auf den Zielzellen zu reduzieren. Danach wurden die gewünschten Antikörper (Kap. 2.5.1), die zuvor in Form eines Mastermixes zusammengestellt wurden, zu den jeweiligen Zellen pipettiert und für 40 min inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Tubes mit der Öffnung nach unten vorsichtig auf mehrere Lagen Zellstoff geklopft um möglichst alle ungebundenen Fluorochrom-gelabelten Antikörper zu entfernen. Die Tubes 'Unmarkiert' und 'Färbung' wurden in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Das Tube 'Zählung' wurde in 100 µl resuspendiert und entsprechend den Vorgaben des Herstellers kurz vor der Messung mit demselben Volumen AccuCheck Counting Beads (Life Technologies Corporation) versehen.

Die verwendeten Kombinationen aus Antikörpern variierte je nach Bedarf der zu differenzierenden Zellpopulationen (Tab. 15). Die Benutzung eines FACSCanto ermöglichte es unter Umständen auch unterschiedliche Populationen mit einer einzelnen Färbungskombination darzustellen, da neben der Lebend-Tot-Differenzierung mit dem APC-CyTM7-markierten Zombie-Farbstoff weitere 7 Fluorochrome in einer Probe voneinander unterschieden werden konnten (FITC, PE, PE-CyTM5, PE-CyTM7, APC, V450, BV510). Damit ließen sich alle in Tab. 15 aufgeführten Zellpopulationen mit den in Kap. 2.5.1 aufgelisteten Fluorochrom-gelabelten Antikörpern effizient voneinander unterscheiden.

Alle Proben wurden unmittelbar nach Beendigung der Aufbereitung gemessen.

Tabelle 15: Färbestrategien zur Differenzierung intrarenaler Leukozytenpopulationen.

Zellpopulation	CD45	CD11b	Ly6g	Adgre1	CD11c	Cx3cr1	Ccr2	MhcII	CD103	CD206
Leukozyten	+									
(Neutrophile) Granulozyten	+	+	+	-						
Nicht-Granulozyten	+	+	-							
Dendritische Zellen (DCs)	+	+	-	-	+					
CD103+ DCs	+		-		+			+	+	
CD103- DCs	+		-		+			+	-	
Infiltrierende Monozyten	+	+	-			-	+			
Makrophagen	+	+	-	+						
M1-Makrophagen	+	+	-	+		+		+		-
M2-Makrophagen	+	+	-	+		+		+		+

Kompensation

Um eine saubere Trennung der Signale aller Fluorochrome in jeder Probe voneinander zu erreichen, wurde vor jeder Messung eine Kompensationsmatrix erstellt. Diese Prozedur diente dazu, den spektralen Spillover jedes einzelnen verwendeten Fluorochromes in jeden der detektierbaren Kanäle spezifischer Wellenlänge zu detektieren und dafür zu korrigieren, sodass am Ende eine zweifelsfreie Zuordnung des Emissionssignales eines jeden Fluorochromes zu dem tatsächlich assoziierten Antikörper möglich war.

Zu diesem Zweck wurden Kompensations-Beads verwendet, die gemäß den Angaben des Herstellers (AbCTM Anti-Rat/Hamster Bead Kit, Thermo Fisher Scientific Inc.) angesetzt und mit den entsprechenden Fluorochrom-markierten Antikörpern markiert wurden. In Kürze: In einem FACS-Tube wurden ein Tropfen Positiv-Beads mit 100 µl FACS-Puffer und jeweils einem der Fluorochrom-markierten Antikörper für 10 min bei 4 °C inkubiert. Ebenso wurde hier eine Negativkontrolle angesetzt, zu der kein Antikörper gegeben wurde (unmarkiert). Nach Zugabe von 2 ml FACS-Puffer und einer Zentrifugation bei 300 g für 5 min wurde der Überstand dekantiert, und die Tubes - wie bereits oben beschrieben - trocken geklopft. Zu den markierten/ unmarkierten Beads wurden nun jeweils ein Tropfen Negativ-Beads gegeben und der vorangegangene Schritt aus Inkubation, Zugabe von FACS-Puffer, Zentrifugation und Dekantieren wurde wiederholt. Die trockenen Bead-Pellets wurden in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und konnten bei Lagerung bei 4 °C bis zu einem Monat verwendet werden.

Um für das Fluoreszenzsignal des Zombie-Farbstoffes zu kompensieren, konnten keine Beads verwendet werden, da diese nur Antikörper effizient binden, nicht aber die Fluorochrome an sich. Zu diesem Zweck wurden für jede Messung einige wenige Zellen aus dem Gesamtisolat entnommen und für eine Einzelfärbung mit Zombie NIRTM verwendet.

Am FACSCanto wurden die Fluorochrom-markierten Bead-Mischungen einzeln gemessen und die Intensität der jeweiligen Laser wurde so angepasst, dass die Intensität des entsprechende Emissionssignales der Fluorochrome mitten im detektierbaren Bereich des zugehörigen Detektionskanals liegt und darin eine gute Abgrenzung von markierten (positiv) und unmarkierten (negativ) Beads gewährleistet ist. Ebenso wurde mit den Zombie-markierten Zellen verfahren. Die Negativkontrolle diente hierbei dazu zu überprüfen, ob die Markierung der Beads zuverlässig funktioniert hat.

Mit Hilfe der FACSDIVATM Software wurde basierend auf den aufgenommenen Signalen jedes einzelnen Fluorochromes in jedem der 8 zur Verfügung stehenden Detektionskanälen eine symmetrische Matrix angelegt, die für jeden Farbstoff die spektrale Überlappung vom Ziel-Detektionskanal in jeden anderen Kanal benannte. Die Software berechnete die notwendige Kompensation für jede Farbstoff-Kanal-Kombination (Angabe in Prozent) und so fern nirgendwo eine Überkompensation vorlag konnte die Kompensationsmatrix als solche übernommen und für die anstehende Messung verwendet werden.

Aufnahme

Zu Beginn wurden die unmarkierten Aliquote jeder Probe gemessen. Trotz des Anreicherungs-schrittes mit Nykoden z verblieb zumeist einige Nierenparenchymzellen in den Proben zurück, von dem eine deutliche Autofluoreszenz ausging, welche das Fluoreszenzsignal der Antikörper maskieren konnte. Bei starker Autofluoreszenz wurden die Laserintensitäten nach unten korrigiert und die Kompensationsaufnahmen und Matrixberechnungen wiederholt.

An Hand der unmarkierten Aliquote wurde auch die Sensitivität der Detektoren für Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht adjustiert (forward scatter, FSC, und sideward scatter, SSC), sodass in der Analyse die detektierten Zellen auch hinsichtlich ihrer Größe und Granularität optimal beurteilt werden konnten.

Erst am Ende dieser Anpassungen wurden alle Aliquote mit markierten und unmarkierten Zellen aufgenommen. Dabei wurde mit Hilfe eines entsprechenden Gates darauf geachtet, dass mindestens 100.000 Ereignisse aufgenommen wurden, deren FSC-SSC-Profil dem von Immunzellen entspricht.

Zellzählung

Für die Aufnahme der Counting Beads mussten die oben optimierten Einstellungen für den SSC neu angepasst werden, da die Beads deutlich dichter ("granulärer") sind als Zellen (Abb. 16A). Da die Methode auf einem exakten Verhältnis von Zellsuspension und Bead-Suspension von 1:1 und einer homogenen Mischung beider Lösungen beruht, musste nur sicher gestellt werden, dass eine ausreichende Zahl von mindestens 10.000 Beads aufgenommen wurde. Eine schlüssige Kontrolle für die Homogenität der Messung war das Verhältnis von A-Beads zu B-Beads (Partikel unterschiedlicher Dichte, die unterschiedlich schnell sedimentieren) in der Gesamtpopulation aufgenommener Beads (Abb. 16B). Dieses sollten bei jeder Messung dem vom Hersteller angegebenen Proportionen ent-

sprechen. Andernfalls war nicht von einer homogenen Zell-Bead-Suspension auszugehen und die Ergebnisse wurden von weiteren Analysen als unzuverlässig ausgeschlossen. Für die Berechnung der Zellzahl nach dem Protokoll des Herstellers wurde lediglich die Anzahl aller Beads benötigt.

Für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit war vor allem die Gesamtzahl der jeweiligen Zellpopulation, bzw. ihr entsprechender Anteil an der Gesamtnierenzellsuspension interessant. Dementsprechend finden sich im Ergebnisteil sowohl Graphen mit Angaben zur Gesamtzellzahl als auch Prozentwerte. Die prozentuale Darstellung kam vor allem zum Einsatz, wenn mehrere unabhängige Experimente in einem Graph dargestellt werden sollten, die Unterschiede in den absolut gemessenen Zellzahlen der gleichen Interventionsgruppe (z.B. Vehikel-Kontrolle) die relativen Änderungen zwischen den Interventionsgruppen maskierten.

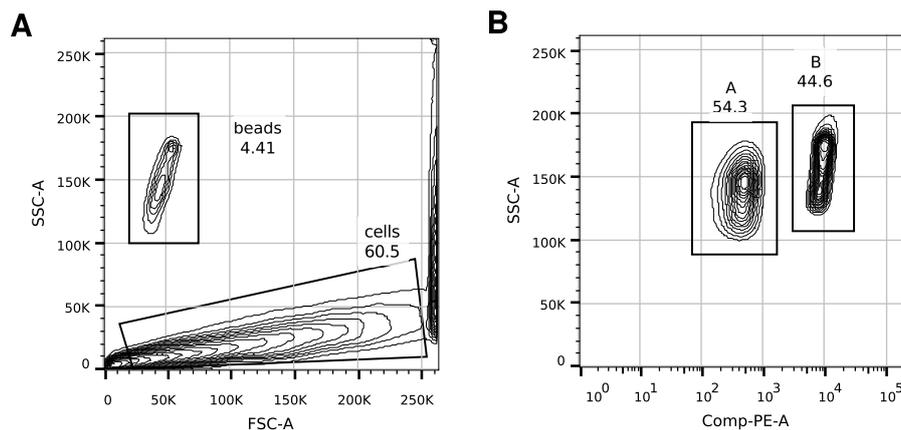


Abbildung 16: Gating-Strategie für Durchflusszytometriedaten zur Zellzählung. (A) Beads und Zellen wurden in einem FSC-SSC-Plot dargestellt und die jeweiligen Populationen zur weiteren Quantifizierung mit entsprechenden Gates (*beads* und *cells*) definiert. (B) Die Events innerhalb des *beads*-Gates konnten hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität im PE-Kanal weiter zu Population A und B differenziert werden.

Auswertung

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit FlowJo (v10.0.7, Tree Star, Inc.). Die wesentliche Gating-Strategie zur Identifikation der Leukozyten ist in Abb. 17 dargestellt. Zunächst wurde Zelldebris grob ausgeschlossen, indem im FSC-SSC-Plot die sichtbare Kernpopulation unter Ausschluss der extrem kleinen und wenig granulären bzw. großen und stark granulären Zellen ausgewählt wurde (Abb. 17A). Im nächsten Schritt wurden diejenigen Zellen identifiziert, die den Zombie-Farbstoff inkorporiert hatten (hohe Signalstärke für APC-CyTM7), und von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Abb. 17B). Zuletzt konnten die CD45-positiven Zellen über den PE-CyTM5-markierten Antikörper identifiziert werden (Abb. 17C). Die weitere Differenzierung der verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen erfolgte analog zu der jeweiligen Färbestrategie (Tab. 15).

3.5.2 Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Detektion von rhPTX3 in Plasmaproben von adulten C57BL/6N Mäusen wurde mit einem Human Pentraxin 3/TSG-14 Quantikine ELISA Kit (DPTX30, R&D Systems) nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs (Abb. 18) durchgeführt. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde dabei nicht verändert.

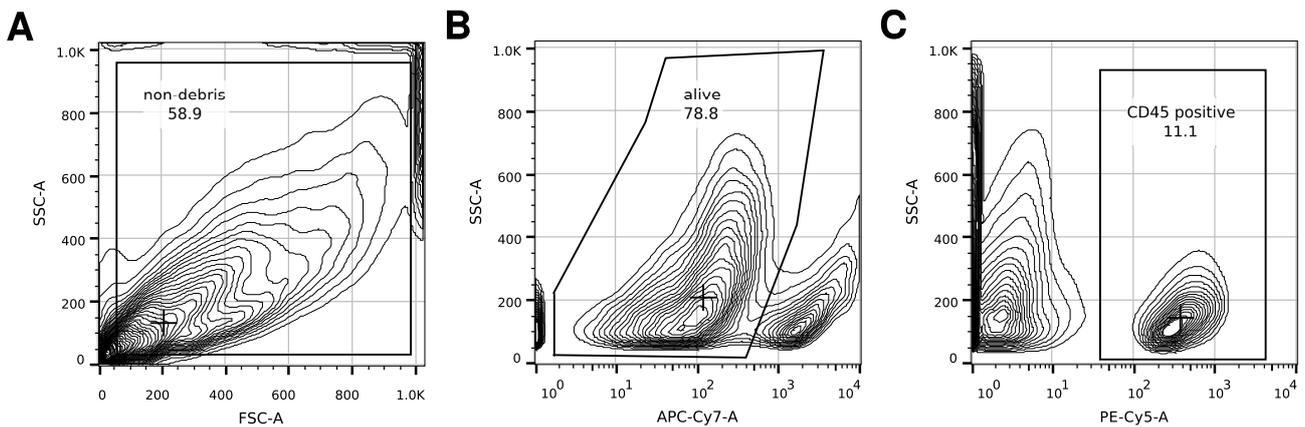


Abbildung 17: Gating-Strategie für Durchflusszytometriedaten zur Identifikation von Leukozyten. (A) Alle aufgenommenen Events wurden in einem FSC-SSC-Plot dargestellt. Nur auf Events, die sicherlich keinem Zelldebris zuzuordnen waren, wurde ein Gate gelegt (*non-debris*). (B) Alle Events innerhalb des *non-debris*-Gates wurden in einem APC-Cy7-SSC-Plot aufgespannt und nur die Zombie-Farbstoff negative Events wurden wiederum durch ein Gate zusammengefasst (*alive*). (C) Alle Events innerhalb des *alive*-Gates wurden in einem PE-CyTM5-SSC-Plot aufgespannt. Nur die eindeutig PE-CyTM5-positive Population ging in die weitere Analyse ein.

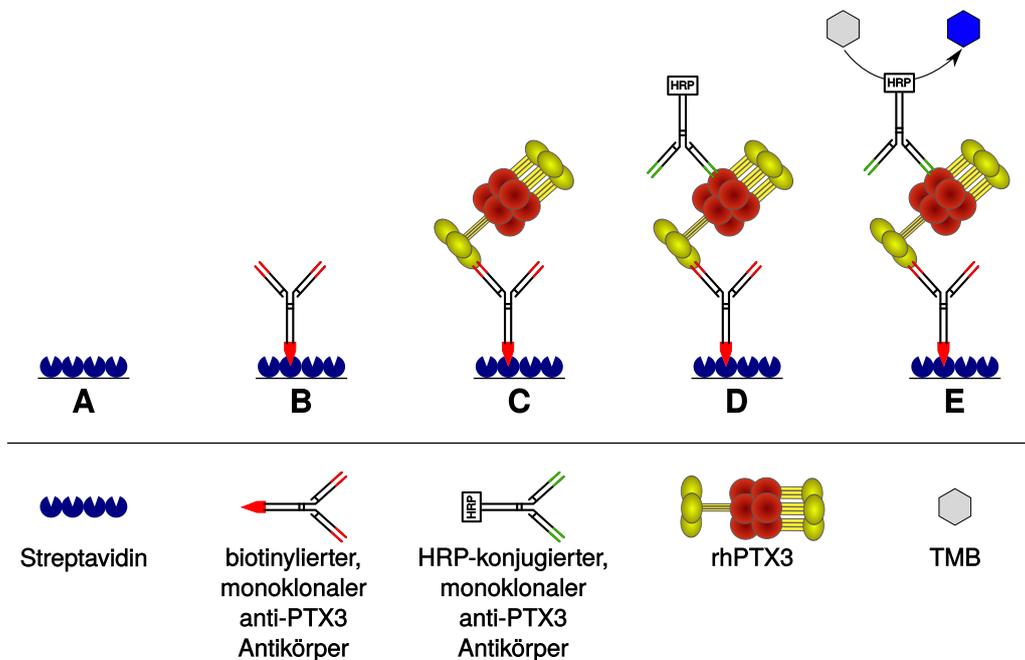


Abbildung 18: Funktionsweise des verwendeten Sandwich-ELISA-Assays. Eine Streptavidin-gecoatete Platte (A) immobilisiert einen monoklonalen anti-human PTX3 AK (B), welcher das in Plasma der Mäuse enthaltene rhPTX3 erkennt und bindet (C). Ein zweiter monoklonaler anti-human PTX3 AK, der mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert ist bindet an einem anderen Epitop von rhPTX3 (D) und vermittelt die Umwandlung von TMB zu einem spektrophotometrisch detektierbaren Farbstoff (E).

In Kürze: Eine Streptavidin-gecoatete 96-Well-Platte (Abb. 18A) wurde für 1 h bei RT mit einem biotinylierten, monoklonalen Antikörper (AK) gegen humanes PTX3 inkubiert (Abb. 18B). Danach wurden die Wells aspiriert und viermal mit Waschpuffer gespült. Nach Vorlegen eines Probenpuffers in jedes Well wurden Proben, Standard-Verdünnungen und Wasserkontrollen hinzugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Das in den Proben enthaltene rhPTX3 wurde durch den immobilisierten biotinylierten AK gebunden und die restliche ungebundene Probenmatrix durch einen weiteren Waschprozess entfernt (Abb. 18C). Ein zweiter, ebenfalls monoklonaler anti-hPTX3 AK, der mit einer Meerrettichper-

oxidase (HRP) konjugiert war, wurde zugegeben und für weitere 2 h bei RT inkubiert (Abb. 18D). Ungebundener Antikörper wurde in einem Waschschrift entfernt und eine 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Wasserstoffperoxidmischung (TMB) dazugegeben (Abb. 18E). Die Peroxidase katalysiert die Entstehung eines bläulichen Farbstoffes. Die Reaktion wurde so lange laufen gelassen, bis die Einzelstandards der pipettierte Standardreihe aus seriellen Verdünnungen makroskopisch gut voneinander zu unterscheiden waren. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 N Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm im Spektrophotometer gemessen.

3.5.3 Western Blot

Das Polyacrylamidgel aus der vorangegangenen SDS-PAGE (siehe Kap. 3.4.6) wurde aus der Gel-Apparatur entfernt und behutsam in Transferpuffer (siehe Kap. 2.4.2) gewaschen. Zeitgleich wurde ein zu dem Gel größengleiches Stück einer Polyvinylidenfluoridmembran (Immobilon[®]-P Membran, IPVH00010, Merck KGaA) in einem Methanolbad aktiviert und anschließend mit Transferpuffer gewaschen. Daraufhin wurden die Membran auf das Gel gelegt und beides wurde zwischen zwei Bündeln aus größengleichen und mit Transferpuffer gesättigten Whatmann-Papier (Grade 3MM Chr Cellulose Chromatography Papers, 3030-917, GE Healthcare Life Sciences) gelegt. Etwaige Luftblasen und überschüssiger Puffer wurden durch sanftes Ausrollen mit einer sterilen 10 ml Pipettenspitze entfernt. Das fertige Bündel wurde in einen Semi-Dry-Blotter gespannt und die SDS-beladenen und nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden per Elektrotransfer bei konstanten 10 V innerhalb einer Stunde vom Gel auf die PVDF-Membran übertragen. Die Protein-beladene Membran wurde entweder in PBS bei 4 °C im Dunklen gelagert oder direkt weiterverwendet.

Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurde der Blot für 2 h bei RT auf einem Wipptisch in einem Blocking-Puffer aus Tris-buffered saline with Tween20 (TBST, siehe Kap. 2.5.3) und 5 % Magermilchpulver gewaschen. Danach wurde der Blot in einem 50 ml Falcon zusammen mit 3 ml Blocking-Puffer und 4,5 µl des primären anti-PTX3 Antikörpers (Verdünnung 1:666, Klon 2C3, HM1130, Hycult Biotech Inc.) über Nacht bei 4 °C auf einem Tube Roller inkubiert. Der Blot wurde aus dem Falcon entfernt und dreimal für 10 min in TBST auf einem Wipptisch gewaschen. Der sekundäre, HRP-markierte anti-IgG Antikörper wurden in 10000-facher Verdünnung in TBST für 1 h zusammen mit dem Blot in einem 50 ml Falcon inkubiert und auf einem Tube Roller in Bewegung gehalten. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschrift in TBST auf dem Wipptisch wurde der Blot entwickelt.

Zur Detektion des auf dem Blot immobilisierten und immunmarkierten Ptx3 wurde das Amersham ECL[™] Prime Western Blotting Detection Kit (RPN2232, GE Healthcare Life Sciences) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die beiden Kit-eigenen Reagenzien wurden 1:1 gemischt und die Membran wurde für 1 min in der Lösung inkubiert, danach vorsichtig trocken getupft, in Klarsichtfolie gehüllt und zusammen mit einem gleichgroßen Stück Röntgenfilm (Film Amersham Hyperfilm[™] ECL, 28906837, GE Healthcare Life Sciences) für 15 min in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Die Färbelösung besteht aus Luminol, welches durch die Meerrettichperoxidase des sekundären Antikörpers zu molekularem Sticksstoff und 3-Aminophthalat-Dianion unter Emission von Photonen oxidiert wird. Das emittierte Licht wurde dabei auf dem Röntgenfilm festgehalten. Der Film wurde unter Verwendung des Curix 60 Systems (AGFA) entwickelt.

Als Ladekontrolle für die SDS-PAGE kam eine weitere Färbung für z.B. beta-Aktin nicht in Frage, da es sich bei dem Material um Urinproben handelte. Analog zur Strategie von Jaillon et al.^[119]

wurde der Blot mit unverdünntem Ponceau S für 30 min auf einem Wipptisch eingefärbt und im Anschluss gründlich mit PBS abgewaschen, bis klare Baden erkennbar waren. Ponceau S bindet reversibel an positiv geladene Aminogruppen und färbt demnach unspezifisch alle Proteine auf dem Blot. Dazu zählen auch α 2-Mikroglobuline mit einer ungefähren Größe von 20 kDa, die in hoher Zahl im Urin vorhanden sind und daher als Ladekontrolle herangezogen wurden.

Um die Präsenz von Ptx3, bzw. α 2-Mikroglobulinen auf den einzelnen Blots zu quantifizieren wurden der Röntgenfilm, bzw. der Blot selbst eingescannt und die Badenstärken wurden mit ImageJ densitometrisch ausgewertet.

3.6 Zellkultur Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich primäre murine proximale Tubulusepithelzellen (PTCs) *in vitro* verwendet. Die im Folgenden beschriebenen Protokolle zur Isolierung und Kultivierung der Zellen sind aus den Arbeiten von Terryn et al.^[259] und Hagemann et al.^[97] abgeleitet.

3.6.1 Isolation von PTCs

Für die Isolation von primären proximalen Tubuluszellen wurden *Ptx3^{+/+}* oder *Ptx3^{-/-}* Mäuse im Alter von 3-4 Wochen per zervikaler Dislokation euthanasiert. Unter einer sterilen Abzugshaube wurden beide Nieren entnommen, entkapselt und in 2 ml PBS mit 1,5 mg/ml Collagenase D gegeben. Die isolierten Organe wurden von da an nur noch bei Zellkulturbedingungen unter einer geeigneten Sterilwerkbank behandelt.

Zur Beschleunigung des enzymatischen Verdauens wurden die Nieren mit einem Spritzenkolben vorsichtig zerdrückt bis sich kein strukturiertes Gewebe mehr erkennen ließ. Nach 30 min bei 37 °C wurde die Zellsuspension in eine Spritze aufgenommen und behutsam durch eine 20G 1½" Nadel gedrückt, bis alle verbliebenen losen Gewebeverbände aufgelöst waren. Die homogenisierte Suspension wurde durch einen Filter mit 70 μ m Maschenweite in ein 15 ml Falcon überführt und auf 10 ml mit PBS aufgefüllt. Nach 5 min Zentrifugation bei 400 g und 4 °C konnte der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert werden. Die Zellsuspension wurde sehr vorsichtig auf 10 ml 31 %-ige Percoll-Lösung pipettiert (2,79 ml Percoll[®], 0,31 ml 10X PBS, 6,9 ml 1X PBS) und bei 800 g für 10 min und 4 °C ohne Bremse zentrifugiert.

Nach Ende der Zentrifugation stellen sich ein Zellpellet am Boden des Falcons sowie eine klar definierte Bande zwischen Percoll- und PBS-Phase dar. Erstere enthält die proximalen Tubuluszellen^[97], die nach Abnahme des Überstandes in K1-Medium resuspendiert, in 15 cm Zellkulturplatten ausgesät und für 24 h in einem Brutschrank bei 37 °C und 5,0 % CO₂ inkubiert wurden.

3.6.2 *In vitro* Kultivierung von PTCs

Nach einem Tag im Brutschrank präsentierten sich in der Zellkulturschale eine heterogene Population aus proximalen Tubulus-Segmenten, die zum größten Teil bereits am Schalenboden angewachsen waren, und vereinzelt andere Zelltypen. In Präsenz des K1-Mediums fingen die proximalen Tubuluszellen an im Verlauf der nächsten Tage von den Segmenten ausgehend zu proliferieren während die anderen Zelltypen bereits nach 2 Tagen vollständig verschwunden waren. Eine genaue Bestimmung

der Zellzahl war erst ab der ersten Passage möglich, da sich in den Segmenten einzelne Zellen nicht differenzieren ließen.

Das Medium wurde 24 h nach Isolation und danach alle 2-3 Tage (in Abhängigkeit vom Zustand der Zellen und der Anzahl toter Zellen im Überstand) vollständig gewechselt. Sobald der Zellrasen 90% Konfluenz in der Schale erreicht hatte wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 10 ml Trypsin 0.05 %/EDTA 0.02 % in PBS (5-10 min 37 °C) abgelöst. Die Mobilisierung der Zellen wurde durch mechanisches Klopfen am Ende der Inkubationszeit unterstützt und der enzymatische Verdau durch Trypsin mittels Zugabe von K1-Medium gestoppt. Der Überstand wurde in einem 50 ml Falcon gesammelt, alle verbliebenen Zellen mit PBS von der Zellschale abgewaschen und die Suspension bei 360 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen einer 15 cm Platte in 10 ml K1-Medium resuspendiert.

Die Zahl aller geernteter Zellen wurden optisch mit einer Neubauer improved Zählkammer und einem Mikroskop bestimmt. Um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen wurde darauf geachtet, dass die Zelldichte in der Kammer 100 Zellen/ μ l weder signifikant unter- noch überschreitet, da dies der optimalen Auslastung der verwendeten Zählkammer entspricht. Jede wie oben beschrieben angesetzte Zellsuspension wurde zweimal gezählt, indem zwischen beide Kammern und das Deckglas jeweils 10 μ l Volumen pipettiert wurden. Alle vier Großquadrate beider Kammern wurden ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Dieser Wert wurde als Zellzahl in 0,1 μ l Medium näherungsweise angenommen. Zur Berechnung der Gesamtzellzahl wurde das Ergebnis entsprechend dem Gesamtvolumen von 10 ml mit 100.000 multipliziert.

PTCs wurden nur nach der ersten und maximal bis zur dritten Passage für Experimente eingesetzt. Nach der Zählung wurden 2×10^6 Zellen in eine neue 15 cm Zellkulturplatte ausgesät und bis zu 90 %-iger Konfluenz wie oben beschrieben kultiviert.

3.6.3 Stimulation von PTCs

Zur Untersuchung der mRNA Expression von Adhäsionsmolekülen in *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* PTCs wurden 0,4 Millionen Zellen je Well in 6-Well-Platten ausgesät und 12 h später - nach vollständiger Adhärenz der Zellen am Plattenboden - mit 500 μ g/ml CaOx in Form von Monohydratkristallen in einem Gesamtvolumen von 2 ml für 24 h stimuliert. Als Lösungsmittel für die CaOx-Kristalle bzw. als Vehikelkontrolle diente PBS. Die Zellen wurden während des gesamten Versuchs in vollständigem K1-Medium inklusive 10 % fetalem Kälberserum (FBS) und 1 % Antibiotikum gehalten, da ein FBS-Entzug nach eigenen Erfahrungen des Experimentators zum drastischen Vitalitätsverlust der Zellpopulation geführt hat.

3.7 *In chemico* Methoden

3.7.1 Herstellung von Kalziumoxalatkrystallen

Zur kontrollierten Herstellung von CaOx-Kristallen definierter Größe wurde ein Protokoll von Thongboonkerd et al.^[261] und Chaiyarit et al.^[42] verwendet und angepasst. Dazu wurden zwei Stocklösungen angesetzt: 10 mM NaC_2O_4 und 1 mM CaCl_2 . Als Solvent diente ein Kristallisationspuffer aus 90 mM TRIS-HCl und 10 mM NaCl, mit einem definierten pH von 7,4 (siehe Kap. 2.7).

Beide Lösungen wurden 1:1 gemischt und bei 4 °C über Nacht im Dunklen inkubiert. Die Entstehung von vornehmlich CaOx-Monohydratkristallen wurde mikroskopisch bestätigt. Zur Quantifizierung der Kristallgröße wurden 10 µl der Kristalllösung auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Ø 30 mm runden Deckglas bedeckt. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen in 200- und 400-facher Vergrößerung wurden angefertigt und die Fläche jedes einzelnen Kristalls in ImageJ vermessen und als Pixelzahl angegeben.

3.7.2 Untersuchung der Kristallisations-Inhibierung durch rhPTX3

Zur Untersuchung des Einflusses von rhPTX3 auf das Wachstum von CaOx-Kristallen wurden 10 µl 10 mM NaC₂O₄ mit 5 µl PBS, rhPTX3 in den Konzentrationen von 0,1 nM bis 10 µM oder äquimolarem BSA bei 4 °C für 6 h inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 10 µl 1 mM CaCl₂ hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Die Quantifizierung der Kristallgrößen erfolgte wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben.

Zur Überprüfung der mikroskopisch erhaltenen Ergebnisse wurde das gleiche Experiment mit größeren Volumina (50 µl NaC₂O₄, 25 µl rhPTX3 bzw. BSA, 50 µl CaCl₂) wiederholt. Das ermöglichte es, eine durchflusszytometrische Messung durchzuführen. Die gewünschte Messgröße hierbei ist der forward scatter, dessen Intensität sich direkt proportional zur Größe des gemessenen Partikels verhält. Zu Gunsten des rhPTX3-Verbrauchs wurden hier allerdings nur 1 µM rhPTX3 und 1 µM BSA miteinander verglichen. Die forward und sideward scatter-Intensitäten wurden im Vorfeld auf die Kristallgrößen der BSA-Kontrolle angepasst. In dem so definierten Spektrum wurden die erfassten Ereignisse einer bestimmten forward scatter-Intensität als Histogramm ausgezählt und weiter verrechnet.

3.8 Datenaufbereitung, Statistik und Darstellung

Die Datenaufbereitung erfolgte mit LibreOffice Calc, die statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse mit R statistics.

Im Vorfeld der Anwendung jeglicher anderer statistischer Methodik wurden der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung, der Levene-Test auf Homoskedastizität und der Ausreißertest nach Grubb auf den zu analysierenden Datensatz angewandt.

Normalverteilte und homoskedastische Datensätze wurden im folgenden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgendem Post-hoc-Test nach Tukey auf signifikante Unterschiede getestet. Bei vorliegender Heteroskedastizität wurde der Post-hoc-Test nach Games-Howell angewandt. Lagen nicht-normalverteilte Datensätzen vor, erfolgte die Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis und dem Post-hoc-Test nach Nemenyi. Der Zweistichproben-t-Test fand nur für den Vergleich zweier normalverteilter Datensätze Anwendung. Alternativ wurde im Falle nicht-normalverteilter Datensätze der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test bemüht. Ab einem p-Wert kleiner 0,05 wurde die Nullhypothese des entsprechenden statistischen Tests verworfen und ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Stichproben angenommen.

In der Darstellung der Ergebnisse bezeichnen Rauten (#) den Unterschied eines Wertes zu seinem entsprechenden Ausgangswert. Abhängig von der gewählten Darstellungsart kann dieser Referenzwert z.B. die Negativkontrolle, der Zeitpunkt 0 oder eine gesunde (kontralaterale) Niere sein.

Alle anderen zu bezeichnenden Unterschiede wurden mit Sternchen (*) und einem verbindenden Balken (—) deutlich gemacht. Das Verhältnis von Signifikanzniveau und errechnetem p-Wert wurde in Text und Abbildungen wie folgt kenntlich gemacht:

$p < 0,05:$	*	oder	#
$p < 0,01:$	**	oder	##
$p < 0,001:$	***	oder	###

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des renalen Ischämie- und Reperfusionsschadens mit standardisierter Temperaturkontrolle

Besonders Mäuse sind auf Grund ihres hohen Oberfläche-zu-Masse-Verhältnisses und dem Ausfallen thermoregulatorischer Mechanismen während einer Anästhesie anfällig für eine Hypothermie bei experimentellen Operationsmodellen, wie z.B. der rIRI^[98,215,256]. Eine unzureichende Kontrolle der Körperkerntemperatur während einer IRI-Operation beeinflusst die Schwere des Schadens maßgeblich, wobei eine geringere Temperatur für weniger Schaden sorgt^[295,67]. Darüber hinaus ist eine peri-operative Hypothermie mit post-operativem Zittern^[131], Koagulopathie^[266], schlechterer Wundheilung^[203] und anhaltenden Effekten der Narkose nach dem Aufwachen^[100] assoziiert.

Um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse mit geringer Varianz zu erzielen, sollte in jedem operativen Setting einer IRI die Körperkerntemperatur der Versuchstiere in einem physiologischen Bereich stabilisiert werden^[79,229]. Zu diesem Zweck wurde ein bestehendes Temperaturprotokoll für IRI-Operationen unter Beteiligung des Autors der vorliegenden Arbeit optimiert und mittels Online-Körpertemperaturmessungen für den Bereich zwischen 36,5 und 38,5 °C validiert. Das neu etablierte Protokoll ist in Kap. 3.1.4 genau beschrieben und wurde als Originalarbeit publiziert^[169].

Basierend auf diesen Arbeiten wurde im Folgenden der Verlauf des post-ischämischen Schadens zu verschiedenen Zeitpunkten nach Reperfusion neu charakterisiert. Nach Induktion einer Ischämie der linken Niere für 35 min sank die exkretorische Nierenfunktion (gemessen in Form der glomerulären Filtrationsrate, GFR) innerhalb von 4 Tagen nach Reperfusion auf 50% des Wertes von scheinoperierten Geschwistern, näherte sich ihnen aber im Verlauf von 10 Wochen wieder an (Abb. 19 & Tab. 16).

Tabelle 16: Statistische Kennzahlen der nicht normalisierten GFR-Messwerte aus Abb. 19. Arithmetisches Mittel (\bar{x}), Standardabweichung (s) und Konfidenzintervall (ci) sind in $\mu\text{l}/\text{min}$ angegeben. Die Angabe statistischer Signifikanz bezieht sich auf den Vergleich von IR- und scheinoperierten Tieren zum jeweiligen Zeitpunkt.

Tag	IR				Sham				p-Wert
	\bar{x}	s	ci	n	\bar{x}	s	ci	n	
0	217,4	38,1	47,3	5	212,9	43,9	31,4	10	n.s.
1	138,1	12,2	15,2	5	194,5	26,6	33,0	5	**
4	155,9	7,4	9,2	5	324,7	49,8	61,9	5	**
7	166,3	26,9	14,9	15	306,8	55,1	31,8	14	***
14	205,7	47,7	27,5	14	277,0	70,0	40,4	14	**
21	212,2	35,8	20,7	14	262,8	67,8	39,1	14	*
35	188,3	53,4	30,8	14	329,2	60,4	36,5	13	***
70	256,6	43,7	36,6	8	302,5	56,8	70,5	5	n.s.

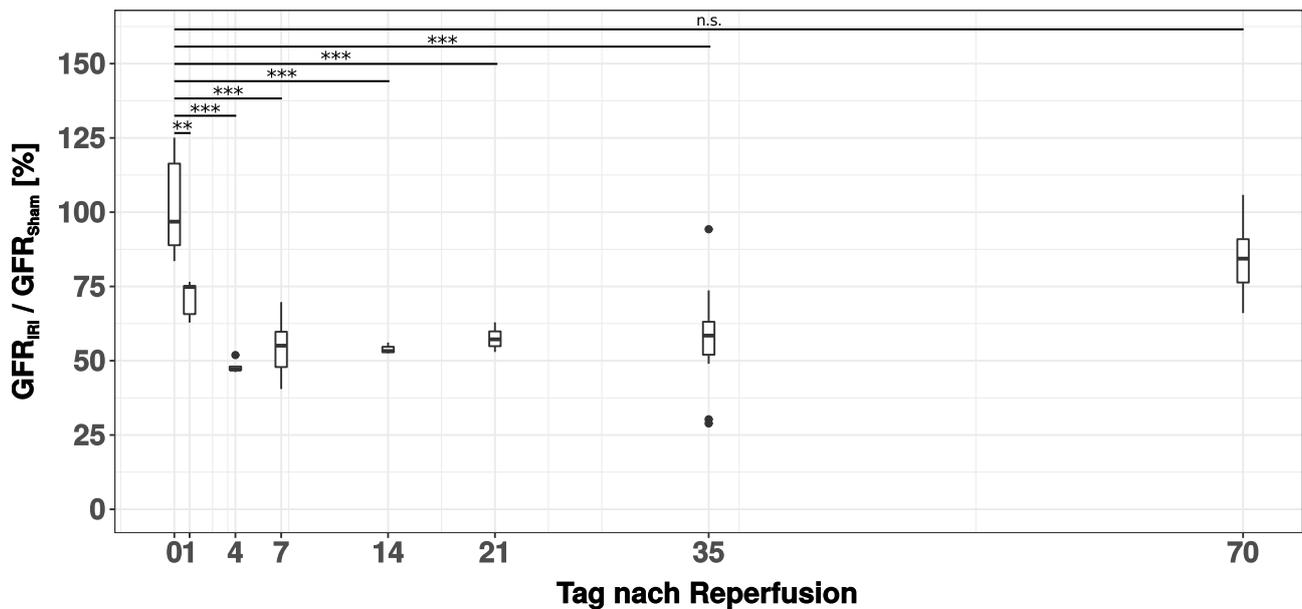


Abbildung 19: GFR nach 35 min Ischämie der linken Niere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Reperfusion. Vor Induktion einer IRI und an den Tagen 1, 4, 7, 14, 21, 35 und 70 nach Reperfusion wurde die GFR von IRI-operierten C57BL/6N Tieren (männlich, 7-8 Wochen) erhoben und auf die von scheinoperierten Geschwistern (Sham) normalisiert. Die dargestellten Werte stammen aus 7 unabhängigen Experimenten und errechnen sich aus $(GFR_{IRI}/GFR_{Shäm}) * 100$. Für genaue Angaben zu den nicht normalisierten Messwerten siehe Tab. 16.

Die dem Funktionsverlust zugrunde liegende strukturelle Schädigung wurde im Verlauf histopathologisch an Hand von PAS-Färbungen der Niere befundet (Abb. 20A). Der an Tag 1 nach Reperfusion ausgeprägte nekrotische Schaden ist nach 14 Tagen zwar deutlich rückläufig, persistiert allerdings bis 10 Wochen nach ischämischer Schädigung (Abb. 20B). Ein ausgeprägtes interstitielles Infiltrat sowie der Schwund gesunden Nierenparenchyms ist bereits nach 2 Wochen deutlich zu erkennen und weitet sich flächenmäßig im Verlauf weiter aus, sodass 10 Wochen nach Reperfusion lediglich ca. 50% des Gewebes strukturell intakt ist (Abb. 20A&B).

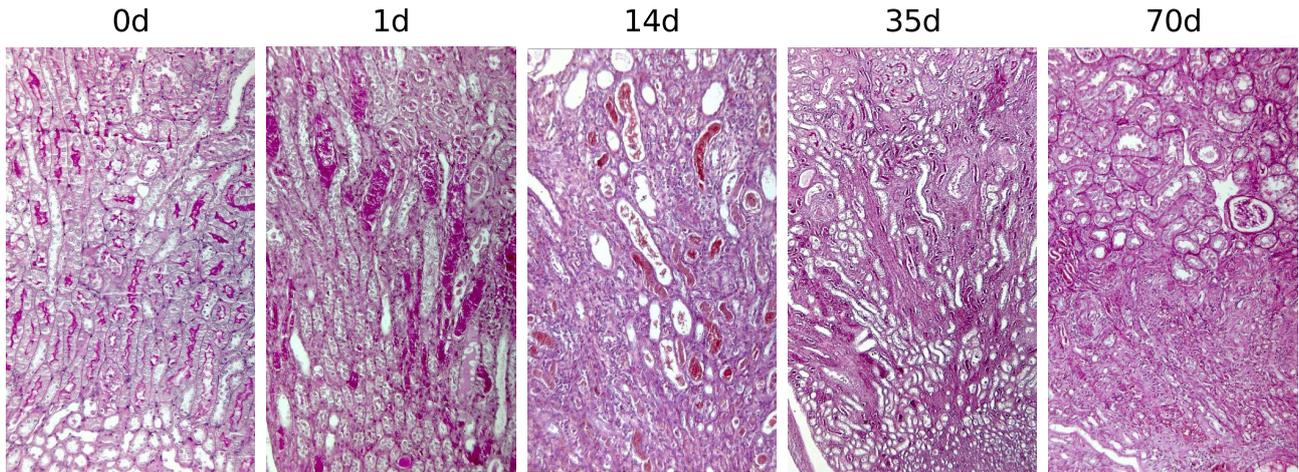
Während die ischämisch geschädigte Niere nach einem Ödem-bedingten Gewichtszuwachs an Tag 1 im Verlauf auf weniger als die Hälfte ihres Ausgangsgewichtes schrumpft, erfährt die kontralaterale Niere eine kompensatorische Hypertrophie, die sich in einem Gewichtszuwachs von ca. 75% äußert (Abb. 20C).

Die Ergebnisse zu exkretorischer Funktion und Struktur der Nieren zeigen, dass das gewählte Setting der IRI-Operation im weiteren Verlauf zu einem ebenso profunden wie reproduzierbaren chronischen Nierenversagen nach akuter Schädigung führt.

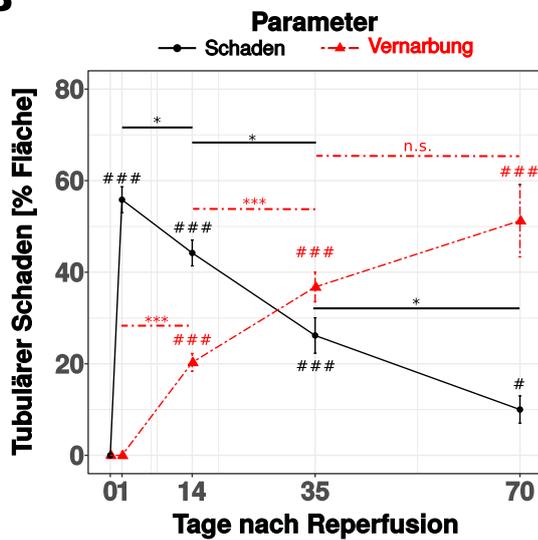
Basierend auf diesen Daten konnte angenommen werden, dass innerhalb der ersten 14 Tage nach Reperfusion die primären post-ischämischen Prozesse, die das Nierenparenchym schädigen, größtenteils abklingen und parallel anti-entzündliche und pro-regenerative Prozesse einsetzen.

Zum besseren Verständnis der zeitlichen Dynamik von Schädigung und Heilung in dem gewählten IRI-Setting wurden in einem weiteren Experiment ischämische und kontralaterale Nieren an den Tagen 1, 4, 7 und 10 nach Reperfusion hinsichtlich ihres intrarenalen mRNA-Expressionprofiles untersucht. Die in Abb. 21 zusammengefassten Daten zeigen einen Rückgang der mRNA-Level des renalen Schadenmarkers *Havcr1* im Verlauf, der schon ab Tag 4 zu bemerken ist (Abb. 21A). Parallel dazu nimmt die mRNA-Expression des Entzündungsmediators *Il6* an Tag 4 nach Reperfusion bereits signifikant ab, was auf ein Auslaufen schädigender, pro-entzündlicher Prozesse hindeutet (Abb. 21A).

A



B



C

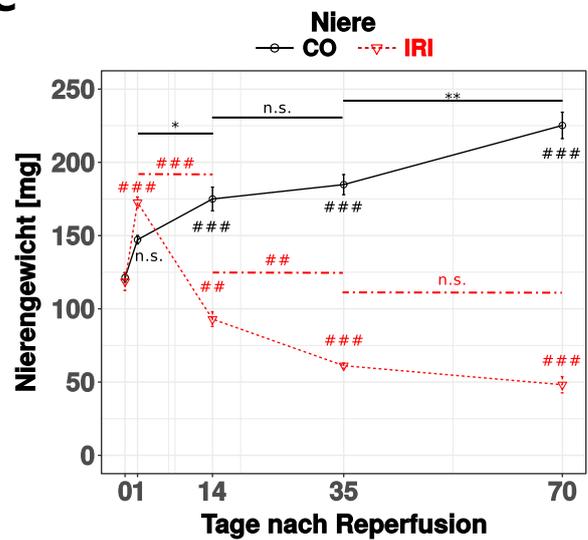


Abbildung 20: Strukturelle Änderungen der Niere nach 35 min Ischämie der linken Niere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Reperfusion. Vor Induktion einer IRI und an den Tagen 1, 14, 35 und 70 nach Reperfusion wurden 7-8 Wochen alte, männliche C57BL/6N Mäuse geopfert, PAS-Färbungen der Nierenschnitten angefertigt (A, IR-Nieren) und semiquantitativ hinsichtlich Schaden und Vernarbung befundet (B). (C) Darstellung der zugehörigen Nierengewichte der kontralateralen und post-ischämischen Nieren im Verlauf. Die dargestellten Werte stammen aus 4 unabhängigen Experimenten ($n \geq 5$). Statistisch signifikante Unterschiede der verschiedenen Parameter nach Reperfusion im Vergleich zu den respektiven Ausgangswerten (Tag 0) sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen zwei Reperfuisionszeitpunkten mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

Hinweise auf die zunehmende Präsenz von anti-entzündlichen und pro-regenerativen, alternativ aktivierten M2-Makrophagen ab Tag 4 nach Reperfusion geben sowohl die M2-Makrophagen-Marker *Mrc1* und *Fn1*, als auch die vermehrte Expression des Makrophagen-rekrutierenden Chemokins *Cxcl10* in der Niere (Abb. 21B). Die vermehrte Expression der Chemokine *Ccl22* und *Ccl17* ab Tag 4 nach Reperfusion (Abb. 21C) sprechen für eine vermehrte Anlockung von regulatorischen T-Zellen in die geschädigte Niere, die genauso wie M2-Makrophagen signifikant zur Resolution der Entzündung beitragen^[136].

Die Präsenz von Makrophagen in den IRI-geschädigten Nieren konnte im Zuge desselben Experimentes zudem mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Abb. 22A). Die Zahl Adgre1-positiver Zellen (muriner Makrophagenmarker, alias F4/80) nimmt von Tag 1 bis 10 nach Reperfusion

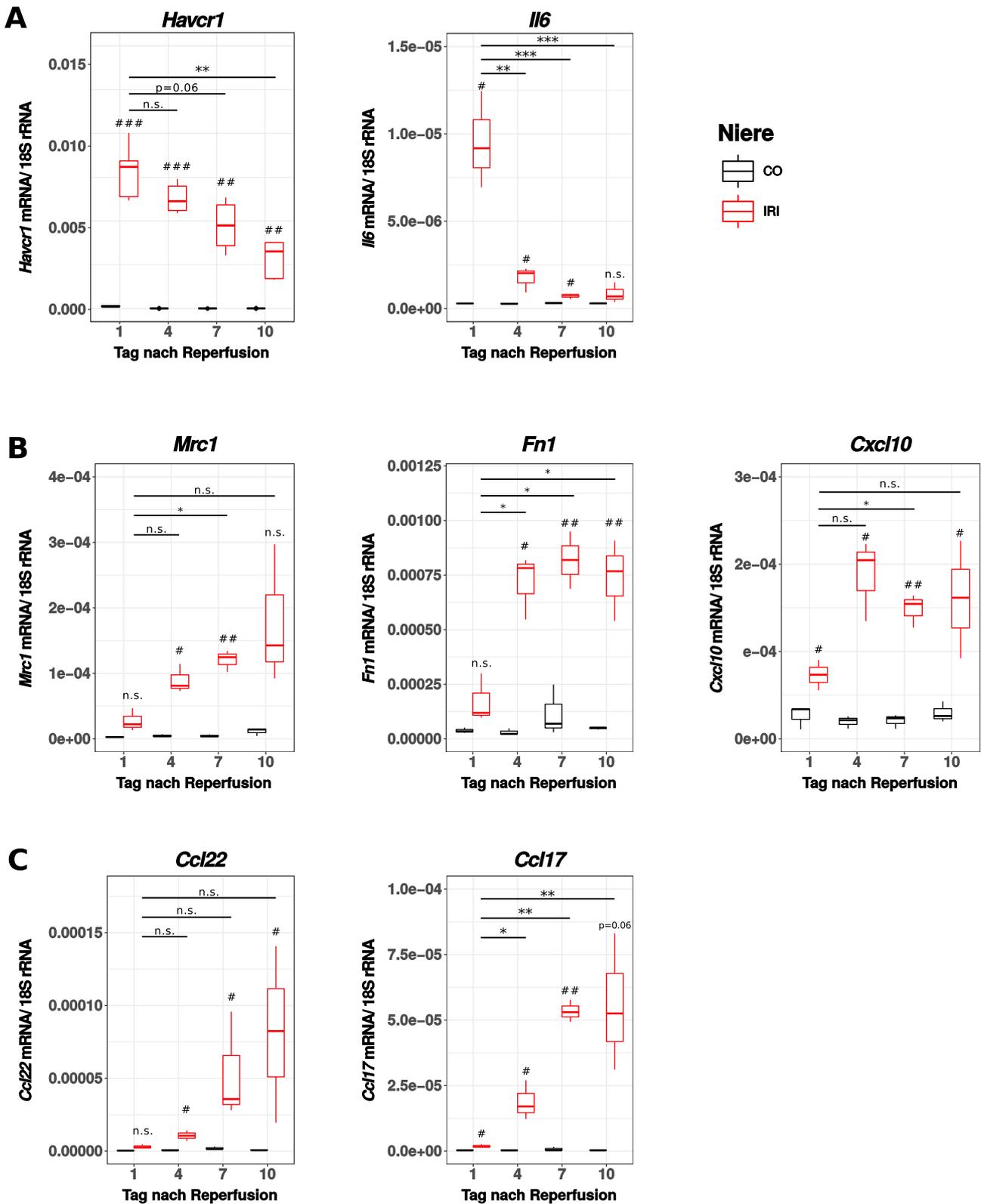


Abbildung 21: Änderungen des intrarenalen Expressionsprofils nach 35 min Ischämie der linken Niere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Reperfusion hinsichtlich Schädigung, Entzündung und Resolution. Nach Induktion einer IRI an den Tagen 1, 4, 7 und 10 wurde ein intrarenales mRNA-Expressionsprofil von IRI-operierten C57BL/6N Tieren (männlich, 7-8 Wochen) mittels qPCR erhoben. Die Expressionslevel von (A) *Havcr1* und *Il6*, (B) *Mrc1*, *Fn1* und *Cxcl10*, (C) *Ccl22* und *Ccl17* wurden auf das jeweilige Level der 18S rRNA normalisiert. Dargestellt sind Daten von 5 Tieren pro Zeitpunkt. Statistisch signifikante Unterschiede der verschiedenen Parameter zwischen kontralateralen und post-ischämischen Nieren sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen post-ischämischen Nieren zwischen zwei Reperfusionszeitpunkten mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

signifikant zu. Ab Tag 4 nach Reperfusion sind Mrc1- und Adgre1-doppelpositive M2-Makrophagen in den IRI-geschädigten Nieren nachweisbar, wobei auch ihre Zahl bis zu Tag 10 weiter ansteigt (Abb. 22B). Sie machen konstant etwa 50% der Makrophagenpopulation in den geschädigten Nieren aus.

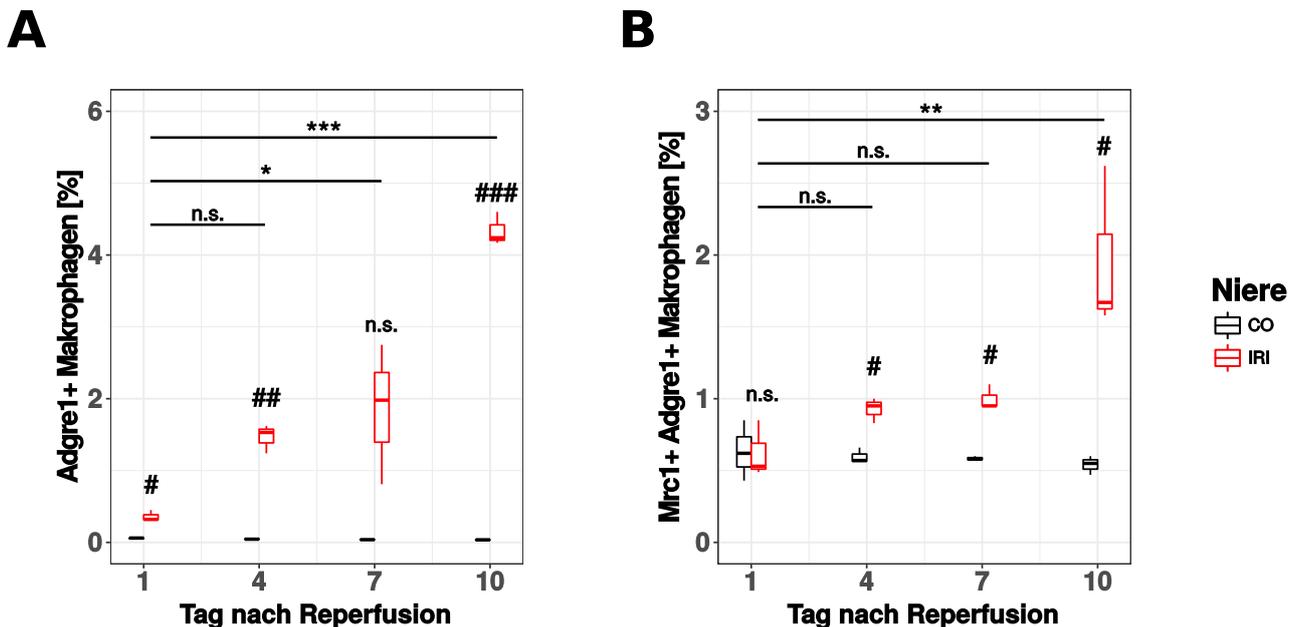


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Quantifizierung intrarenaler Makrophagen nach 35 min Ischämie der linken Niere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Reperfusion. Nach Induktion einer IRI an den Tagen 1, 4, 7 und 10 wurde die Präsenz von Makrophagen in den Nieren IRI-operierter C57BL/6N Tiere (männlich, 7-8 Wochen) über die durchflusszytometrische Detektion von (A) Adgre1- und (B) Mrc1- und Adgre1-doppelpositiven Zellen in der Gesamtzellenzellsuspension [%] nachgewiesen. Dargestellt sind Daten von 5 Tieren pro Zeitpunkt. Statistisch signifikante Unterschiede der verschiedenen Parameter zwischen kontralateralen und post-ischämischen Nieren sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen post-ischämischen Nieren zwischen zwei Reperfuisionszeitpunkten mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

Das hier beschriebene Modell der unilateralen rIRI mit einer Ischämiezeit von 35 min und konstanter Körperkerntemperatur zwischen 36,5 und 38,5 °C verursacht einen akuten Schaden, der sich deutlich in der Verminderung der exkretorischen Nierenfunktion (Abb. 19) sowie einer strukturellen Schädigung (Abb. 20) widerspiegelt. Während Biomarker für Schädigung und Entzündung intrarenal bereits ab Tag 4 rückläufig sind, setzten parallel Prozesse ein, die die Resolution der Entzündung begünstigen und ein Fortschreiten der Parenchymschädigung begrenzen (Abb. 21&22). Dennoch ist der ischämische Schaden stark genug, um eine chronische Einschränkung der Nierenfunktion zu bedingen (Abb. 19).

Die scharfe Abgrenzung einer Schädigungs- und einer Regnerationsphase nach IRI bleibt dennoch schwierig, da vermehrter Zelltod in den Nieren bis zu 5 Wochen nach Reperfusion in den geschädigten Nieren mittels TUNEL-Staining feststellbar ist (unpublizierte Beobachtung von F. Kraft und A. Holderied aus der Arbeitsgruppe Anders). Zeitgleich ist auch die Expression des Schädigungsmarkers *Havcr1* (alias *Kim1*) in IRI-Nieren gegenüber den kontralateralen Kontrollnieren nach eigenen Beobachtungen des Autors der vorliegenden Arbeit signifikant erhöht (CO: $3,1 \pm 0,5 \times 10^{-6}$, IRI: $118,4 \pm 97,6 \times 10^{-6}$ [*Havcr1* mRNA/*18S* rRNA], p-Wert: 0,01). Somit ist klar, dass Schädigung und Regneration auch lange nach der akuten Schädigung weiterhin parallel verlaufen.

Dennoch lässt sich basierend auf den oben gezeigten Ergebnissen festhalten, dass der Schädigung entgegengesetzte Prozesse an Tag 4 nach Reperfusion bereits eingesetzt haben, sodass für die weiterführenden Experimente in dieser Arbeit Tag 3 nach Reperfusion als Auftakt der Regenerationsphase festgesetzt wurde.

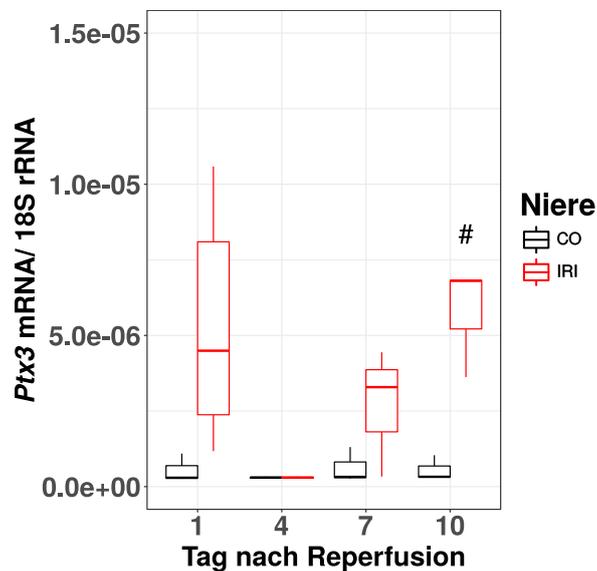


Abbildung 23: Intrarenale *Ptx3* mRNA Expression im Verlauf nach IRI. Nach Induktion einer IRI an den Tagen 1, 4, 7 und 10 wurde die Expression von *Ptx3* in den Nieren IRI-operierter C57BL/6N Tiere (männlich, 7-8 Wochen) mittels qPCR untersucht. Dargestellt sind Daten von 5 Tieren pro Zeitpunkt. Statistisch signifikante Unterschiede der verschiedenen Parameter zwischen kontralateralen und post-ischämischen Nieren sind mit Rauten (#) gekennzeichnet.

Dass PTX3 bei renaler IRI eine Rolle spielt wurde bereits aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Anders deutlich^[151]. Dieser Vorbefund wurde im Rahmen der oben beschriebenen Charakterisierungsseperimente auf mRNA-Ebene validiert (Abb. 23). An den Tagen 1, 7 und 10 lässt sich in den ischämisch geschädigten Nieren ein deutlicher Trend zu erhöhter Expression hin erkennen, der allerdings auf Grund der hohen Standardabweichung nur an Tag 10 nach Reperfusion statistische Signifikanz erreicht. Auch entsteht der Eindruck, dass die *Ptx3* Regulation biphasisch verläuft, mit einer deutlichen Induktion an Tag 1 nach Reperfusion, die bis Tag 4 gänzlich abklingt und an Tag 7 und 10 wiederkehrt. Dieses Expressionsmuster passt zu dem tendenziell biphasischem Verlauf nach IRI aus Schädigungs- und subsequenter Regenerationsphase und könnte auf unterschiedliche Expressionsquellen von *Ptx3* im zeitlichen Verlauf hindeuten. Ohne zu viel in die Daten hinein zu interpretieren lässt sich bestätigen, dass *Ptx3* auf mRNA-Ebene nach IRI reguliert wird.

4.2 Effekte der therapeutischen Intervention mit rhPTX3 in der Regenerationsphase nach IRI

Zur Testung der aufgestellten Hypothese, dass PTX3 während der Regenerationsphase nach akuter Nierenschädigung die Resolution der Entzündung und damit die Heilung verzögert, wurde im Folgenden ein entsprechendes *in vivo* Experiment konzipiert (Abb. 24).

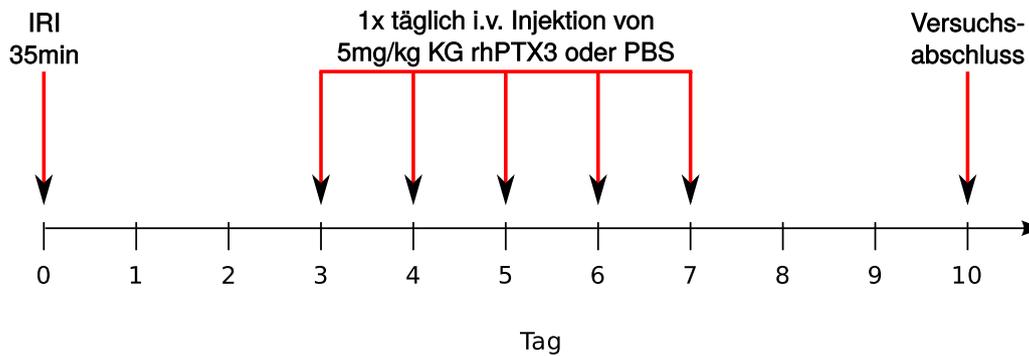


Abbildung 24: Versuchsanordnung zur Testung des Effektes von therapeutischem rhPTX3 nach IRI. Tag 0: unilaterale IRI an 10 C57BL/6N Tieren (männlich, 7-8 Wochen). Tag 3-7: i.v. Injektion von 5mg/kg KG rhPTX3 (5 Tiere) oder PBS (5 Tiere) bei einem Volumen von 10ml/kg KG. Tag 10: Versuchsende durch zervikale Dislokation und Entnahme der Nieren zur weiteren Prozessierung.

Hierbei sollten männliche C57BL/6N Mäuse im Alter von 7-8 Wochen einer IRI unterzogen werden und ab Tag 3 nach Reperfusion mit rekombinantem humanem PTX3 (rhPTX3) therapiert werden. Die Dauer der Therapie sollte unter Berücksichtigung dreierlei Gesichtspunkte gewählt werden: Primär war eine kontinuierliche Therapie bis zum Ende des Experimentes wünschenswert, um einen größtmöglichen Effekt zu erzielen. Zum zweiten sollte der Stress für die Versuchstiere so gering wie möglich gehalten werden. Zum dritten stand das rekombinante Protein nicht unbegrenzt zur Verfügung, was die mögliche applizierte Gesamtmenge definierte. Um so wichtiger war es, für die Dauer der Therapie einen konstanten Spiegel zu etablieren.

Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Studie zur Pharmakokinetik von rhPTX3 an 10 männlichen C57BL/6N Mäusen durchgeführt. Hierzu wurden 5 mg/kg KG rhPTX3 i.v. injiziert und Plasmaproben zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden gewonnen. Zudem wurden 24 und 48 h nach Injektion von jeweils 5 Mäusen Leber, Milz und Nieren isoliert und in RIPA-Puffer homogenisiert. Die rhPTX3-Spiegel wurden in den Plasmaproben und den Organhomogenaten mittels anti-humanem-PTX3-ELISA bestimmt (Abb. 25).

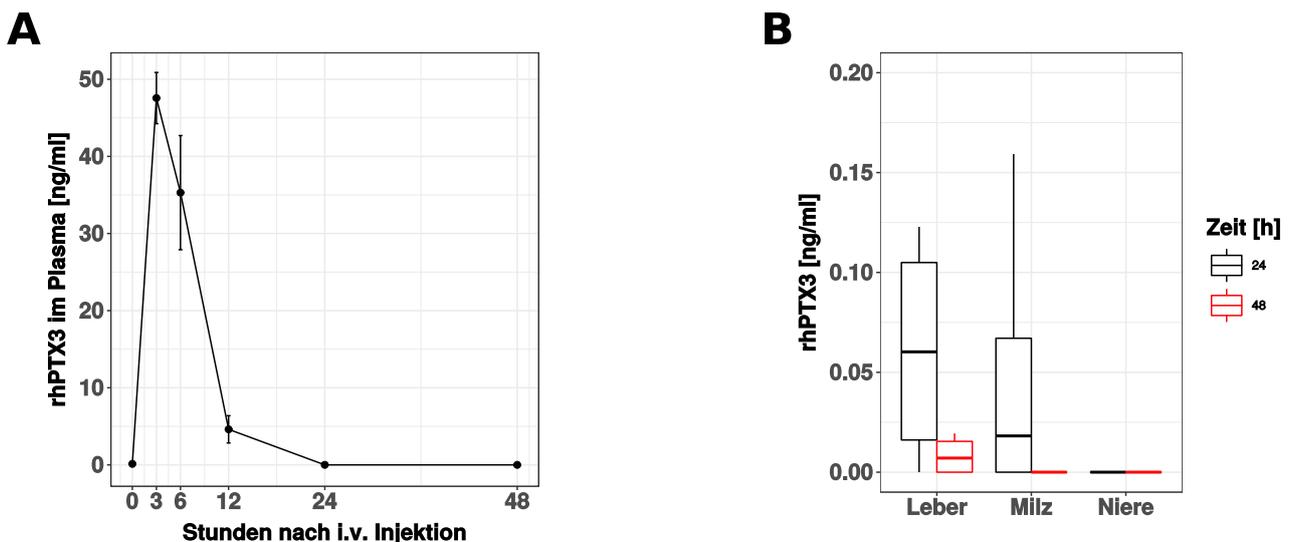


Abbildung 25: Pharmakokinetik von rhPTX3 nach i.v. Injektion von 5mg/kg KG in C57BL/6N Mäuse. Konzentration von humanem PTX3 im Blut (A) und Organhomogenaten von Leber, Milz und Niere (B) nach i.v. Applikation von 5mg/kg KG rhPTX3 bei 10 männlichen C57BL/6N Tieren im Alter von 7-8 Wochen.

Das Protein ist nur für die ersten 12 h im Plasma nachweisbar (Abb. 25A). In der Leber ist es bis zu 48 h nach Injektion detektierbar, in der Milz nur nach 24 h, während es zu keinem Zeitpunkt in der Niere zu finden ist (Abb. 25B). Mit einer Gesamtgröße des PTX3-Oktamers von ca. 340 kDa^[110] ist allerdings auch nicht anzunehmen, dass das Protein den glomerulären Filter passiert und sich im renalen Parenchym anzureichern vermag. Jedoch ist für die Testung der Hypothese die Präsenz des Proteins im Plasma ausschlaggebend, da die Inhibierung der Extravasation von Immunzellen durch PTX3 über P-Selektin-Bindungsstellen an der luminalen Seite des Gefäßendothels vermittelt wird. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass unklar ist, ob sich die Bioverfügbarkeit von rhPTX3 unter entzündlichen Bedingungen ändert. Die endotheliale Barriere nimmt bei akuten Entzündungsreaktion deutlich an Permeabilität zu, sodass Moleküle bis 500 kDa aus dem Lumen ins Interstitium transmigrieren können^[250]. Die hier bestimmte Pharmakokinetik während der Homöostase kann daher lediglich als grober Richtwert dienen.

Basierend auf den gemessenen rhPTX3-Plasmakonzentrationen wurde ein Therapieintervall von 24 h für die Dauer von 5 Tagen festgesetzt, sodass ein guter Kompromiss zwischen möglichst kontinuierlicher Bioverfügbarkeit, Wohlergehen der Tiere und Gesamtproteinbedarf erzielt werden konnte. Das Versuchsende wurde auf Tag 10 nach Reperfusion festgesetzt (Abb. 24).

Nach Abschluss des oben beschriebenen Experiments wurden die kontralaterale (CO) und ischämisch geschädigte (IRI) Niere jedes Versuchstieres entnommen und nach Entfernung der Nierenkapsel gewogen. Um die Veränderungen der Nieren in ihrer Gesamtheit darzustellen wurde für jede Maus der Unterschied in mg zwischen CO- und IRI-Niere errechnet (Δ -Nierengewicht). Somit beinhaltet dieser Messwert sowohl das Ausmaß der kompensatorischen Hypertrophie der CO-Niere, als auch den Schwund des Nierenparenchyms in der IRI-Niere (vgl. Abb. 20C). Die rhPTX3-behandelten Tiere verzeichneten gegenüber den Kontrolltieren ein signifikant höheres Δ -Nierengewicht (Abb. 26A), was entsprechend für mehr Atrophie der post-ischämischen und mehr kompensatorische Hypertrophie der kontralateralen Niere der rhPTX3-Interventionsgruppe spricht.

Passend dazu ergab die Befundung der angefertigten PAS-Schnitte einen deutlich erhöhten Schädigungsgrad des S3-Segments der IRI-Nieren in den rhPTX3- gegenüber den PBS-behandelten Tieren (Abb. 26B). Während in der rhPTX3-Gruppe das Tubulusepithel des S3-Segments beinahe über den gesamten Nierenquerschnitt nekrotische Veränderungen zeigte oder bereits vollständig untergegangen war, fanden sich in der PBS-Gruppe immer noch intakte Tubuli zwischen den geschädigten Abschnitten (Abb. 26C).

Zur weiteren Quantifizierung der Schädigung wurde Gesamt-RNA aus den Nieren isoliert und die mRNA-Expression etablierter Nieren-Schadensmarker per RT-PCR und nachfolgender qPCR überprüft. Die *Gsta*-mRNA-Expression in den IRI-Nieren der rhPTX3-behandelten Gruppe gegenüber den CO-Nieren war signifikant reduziert (Abb. 27A), was für einen Verlust vitaler proximaler Tubuli spricht, die für die ischämische Schädigung besonders anfällig sind^[224]. In der PBS-behandelten Gruppe war diesbezüglich hingegen nur ein Trend ohne statistische Signifikanz erkennbar. Zudem weitete sich die Schädigung in der rhPTX3-Gruppe auch auf das Kompartiment der distalen Tubuli und der Sammelrohre aus, was sich aus der Reduktion der *Gstp1*-mRNA-Expression der IRI- gegenüber den CO-Nieren erkennen ließ (Abb. 27B). Die PBS-Gruppe zeigte hier keinerlei Veränderungen. Konklusiv zu diesen Ergebnissen verhielten sich auch die Expressionslevel des unspezifischeren Nierenschadensmarkers *Fabp1* in den post-ischämischen Nieren beider Gruppen (Abb. 27C).

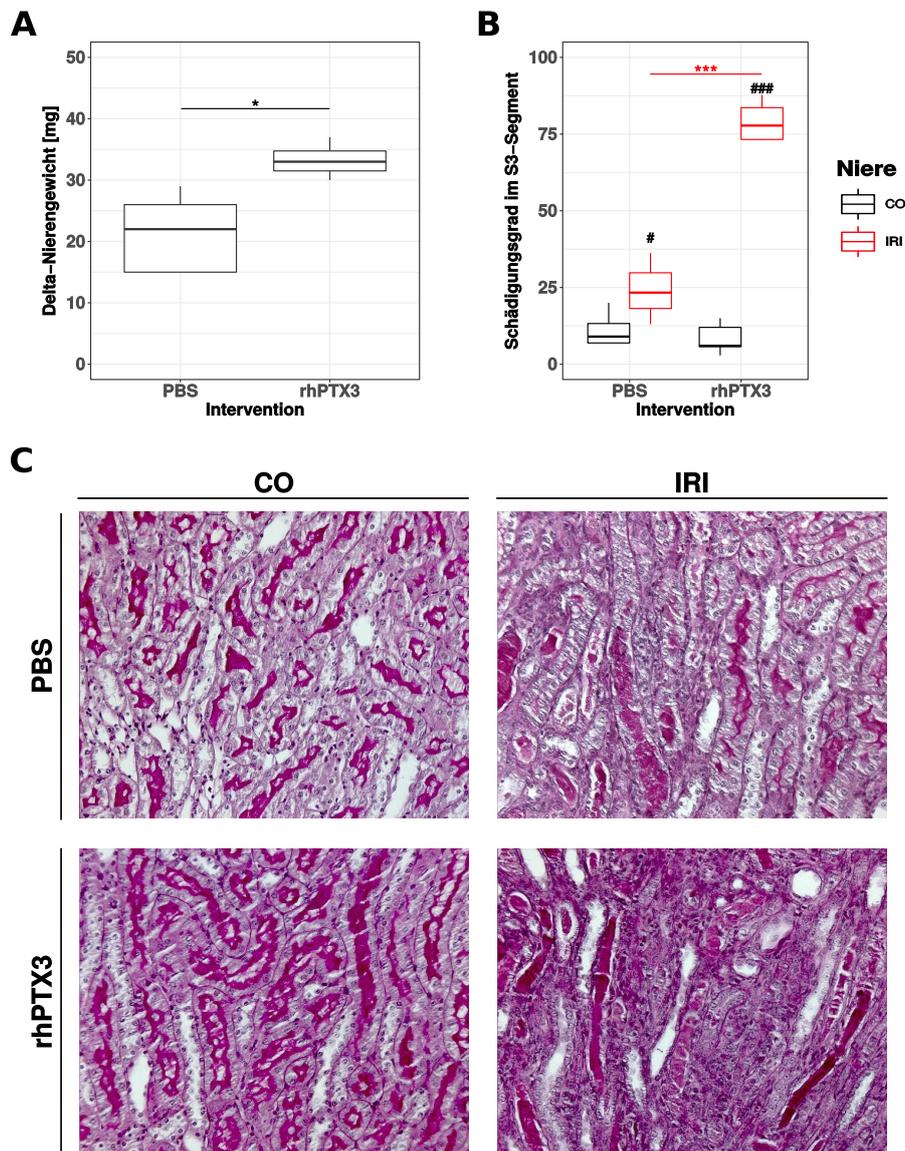


Abbildung 26: Effekt der rhPTX3-Gabe während der Regenerationsphase nach IRI auf den histologischen Nierenschaden. Nach Durchführung des in Abb. 24 dargestellten Versuches wurden die Tiere geopfert und die kontralateralen und post-ischämischen Nieren gewogen (A). Die dargestellten Daten ergeben sich aus den nach Intervention gruppierten Δ -Nierengewichten beider Nieren jedes einzelnen Tieres. (B) Semiquantitative Befundung PAS-gefärbter Nierenschnitte hinsichtlich pathologischer Veränderungen des S3-Segmentes. (C) Repräsentative Aufnahmen der in (B) quantifizierten Schnitte. Die dargestellten Daten stammen aus einem Experiment mit jeweils 5 Tiere pro Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen kontralateralen und post-ischämischen Nieren der jeweiligen Interventionsgruppe sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen den post-ischämischen Nieren beider Gruppen mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

Die signifikant geringere *Fabp1*-mRNA-Expression in der rhPTX3- gegenüber der PBS-behandelten Gruppe spricht für weniger Überleben von gesundem Nierenparenchym^[133].

Mechanistisch ist ein post-ischämischer Nierenschaden stets mit der Beteiligung von Immunzellen assoziiert. Während in der frühen Schädigungsphase vor allem Neutrophile in die Nieren einwandern sind an Tag 10 nach Reperfusion vor allem Makrophagen im Interstitium zu finden. Die immunhistochemische Färbung Adgre1-positiver Zellen in den ischämisch geschädigten Nieren an Tag 10 nach Reperfusion ergab eine beinahe Verdopplung der Makrophagenpopulation in der rhPTX3- gegenüber der Vehikel-behandelten Gruppe (PBS: $9,9 \pm 6,6$ %; rhPTX3: $17,3 \pm 6,1$ %; Abb. 28).

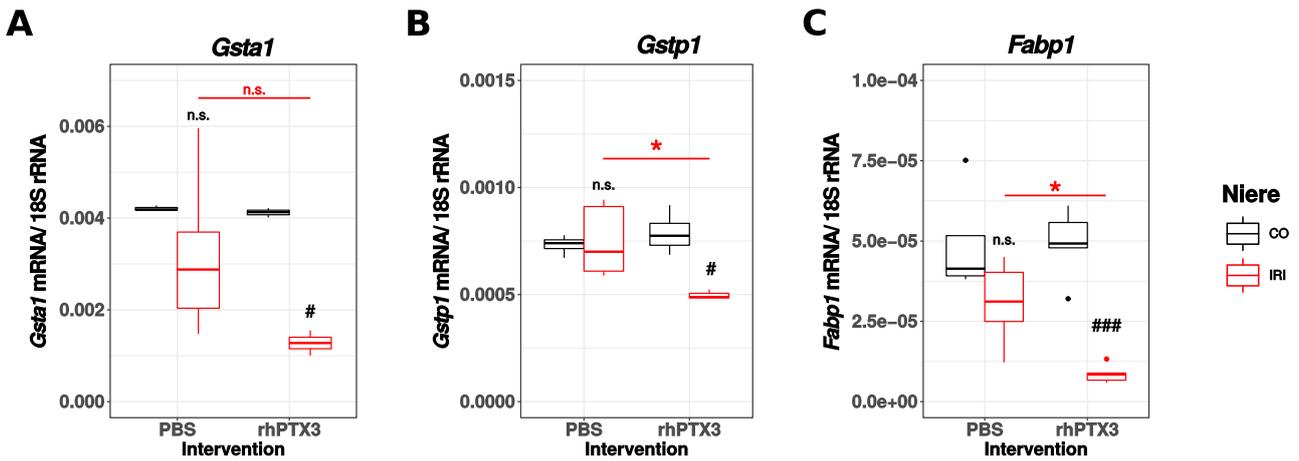


Abbildung 27: Effekt der rhPTX3-Gabe während der Regenerationsphase nach IRI auf die mRNA Expressionslevel von verschiedenen Nierenschadensmarkern. Nach Durchführung des in Abb. 24 dargestellten Versuches wurden die Tiere geopfert, Gesamt-RNA aus den entnommenen Nieren isoliert, diese zu cDNA umgeschrieben und die Expressionslevel von *Gsta* (A), *Gstp1* (B) und *Fabp1* (C) per real-time PCR bestimmt. Die erhobenen Werte für jede Probe wurden auf das jeweilige Level des housekeeping-Gens 18s normalisiert. Die dargestellten Daten stammen aus einem Experiment mit jeweils 5 Tiere pro Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen kontralateralen und post-ischämischen Nieren der jeweiligen Interventionsgruppe sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen den post-ischämischen Nieren beider Gruppen mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

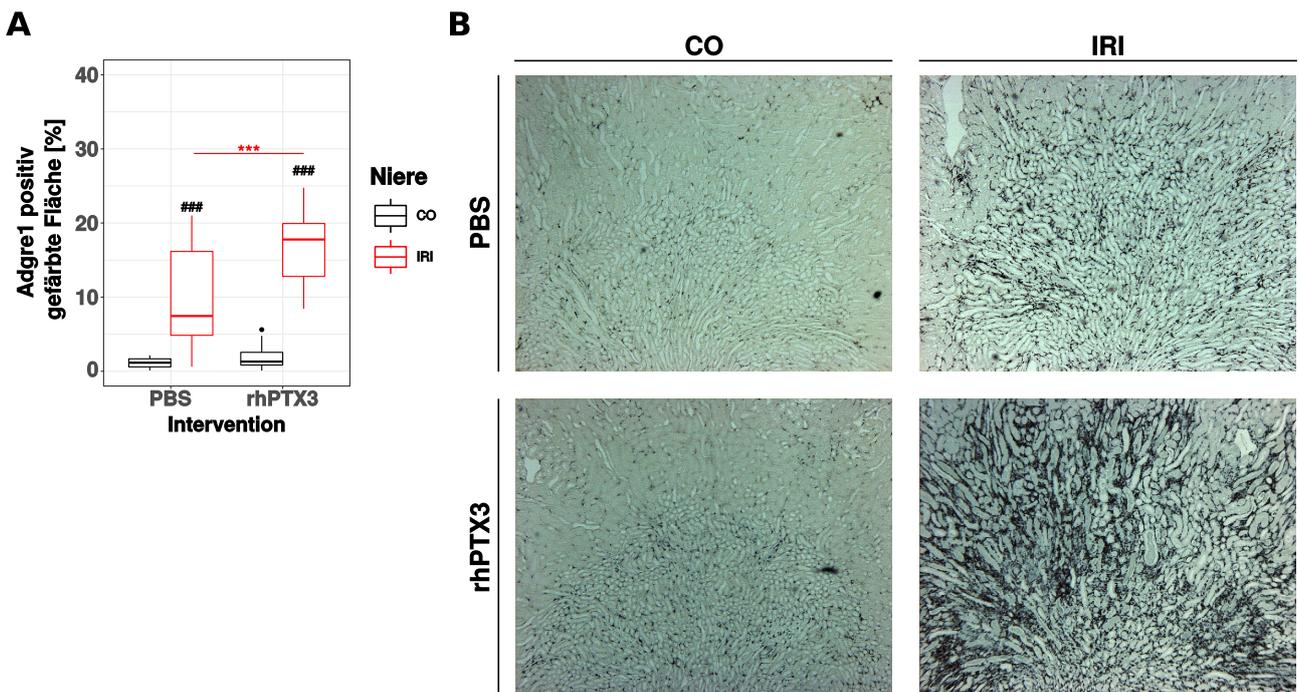


Abbildung 28: Effekt der rhPTX3-Gabe während der Regenerationsphase nach IRI auf die intrarenale Makrophagenpopulation.. (A) Semiquantitative Analyse der immunhistochemisch für Adgre1 positiv gefärbten Fläche in CO- und IRI-Nierenschnitten 10 Tage nach Reperfusion nach Behandlung mit PBS oder rhPTX3 (Studiendesign Abb. 24). (B) Repräsentative Aufnahmen der Nierenschnitte auf deren Grundlage die in (A) dargestellte Quantifizierung durchgeführt wurde. Die dargestellten Daten stammen aus einem Experiment mit jeweils 5 Tiere pro Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen kontralateralen und post-ischämischen Nieren der respektiven Gruppe sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen den post-ischämischen Nieren beider Gruppen mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

Hinweise auf erhöhte Präsenz von Entzündungsmediatoren - und damit auf ein florierendes entzündliches Geschehen - liefern die mRNA-Expressionslevel von *Tnf* und *Ccl2*, welche beide in der

rhPTX3-behandelten gegenüber der PBS-behandelten Interventionsgruppe signifikant erhöht waren (Abb. 29).

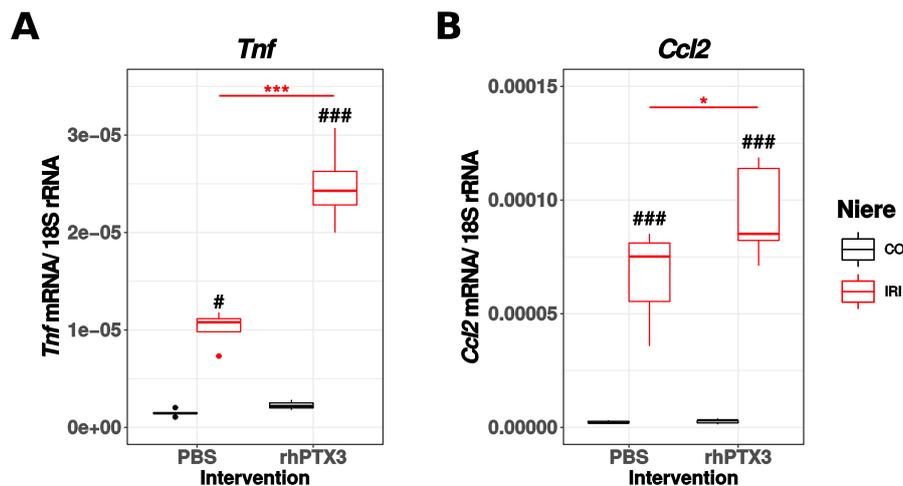


Abbildung 29: Effekt der rhPTX3-Gabe während der Regenerationsphase nach IRI auf die mRNA Expressionslevel von pro-entzündlichen Mediatoren in der Niere. Nach Durchführung des in Abb. 24 dargestellten Versuches wurden die Tiere geopfert, Gesamt-RNA aus den entnommenen Nieren isoliert, diese zu cDNA umgeschrieben und die Expressionslevel von *Tnf* (A) und *Ccl2* (B) per real-time PCR bestimmt. Die erhobenen Werte für jede Probe wurden auf das jeweilige Level des housekeeping-Gens 18s normalisiert. Die dargestellten Daten stammen aus einem Experiment mit jeweils 5 Tiere pro Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen kontralateralen und post-ischämischen Nieren der jeweiligen Interventionsgruppe sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen den post-ischämischen Nieren beider Gruppen mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

Die Therapie mit rhPTX3 in der Regenerationsphase nach IRI erbrachte zunächst den erwarteten Befund: eine erhöhte Präsenz von Makrophagen, eine vermehrte Entzündungsreaktion und multiple Anzeichen für einen schwereren parenchymalen Nierenschaden als in der PBS-behandelten Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse stützen die aufgestellte Hypothese zwar, der zugrundeliegende Mechanismus ist aber nicht geklärt. Zum einen bleibt zu beantworten, ob die rhPTX3-Gabe zu der angenommenen Verschiebung des Verhältnisses von pro- und anti-entzündlichen Immunzellen in der Niere führt. Zum anderen können andere Ptx3-abhängige Mechanismen, die zu einer Aggravierung des Phänotyps nach IRI führen könnten, noch nicht ausgeschlossen werden. Dazu zählt z.B. ein möglicher Beitrag des endogenen, intrarenalen Ptx3 auf den Verlauf der Regeneration nach IRI.

4.3 Effekte der Substitution von Ptx3 in der Regenerationsphase nach IRI

Zur Adressierung der offenen Fragen wurde das oben beschriebene Experiment (Abb. 24) nochmal durchgeführt, nur diesmal mit *Ptx3*^{-/-} Mäusen anstelle von Wildtyp-Tieren. Damit konnte eine mögliche Beteiligung von endogenem Ptx3, das von infiltrierenden Immunzellen oder renalen Tubuluszellen sezerniert wird, in der Regenerationsphase nach IRI ausgeschlossen werden. Die beobachteten Effekte ließen sich damit zweifelsfrei auf die Substitution mit rhPTX3 für den definierten Behandlungszeitraum zurückführen.

Nach Abschluss des Versuches wurden beide Nieren jedes Versuchstieres entnommen und entkapselt gewogen. Der Mittelwert des Δ -Nierengewichts der substituierten *Ptx3*^{-/-} Mäuse war ge-

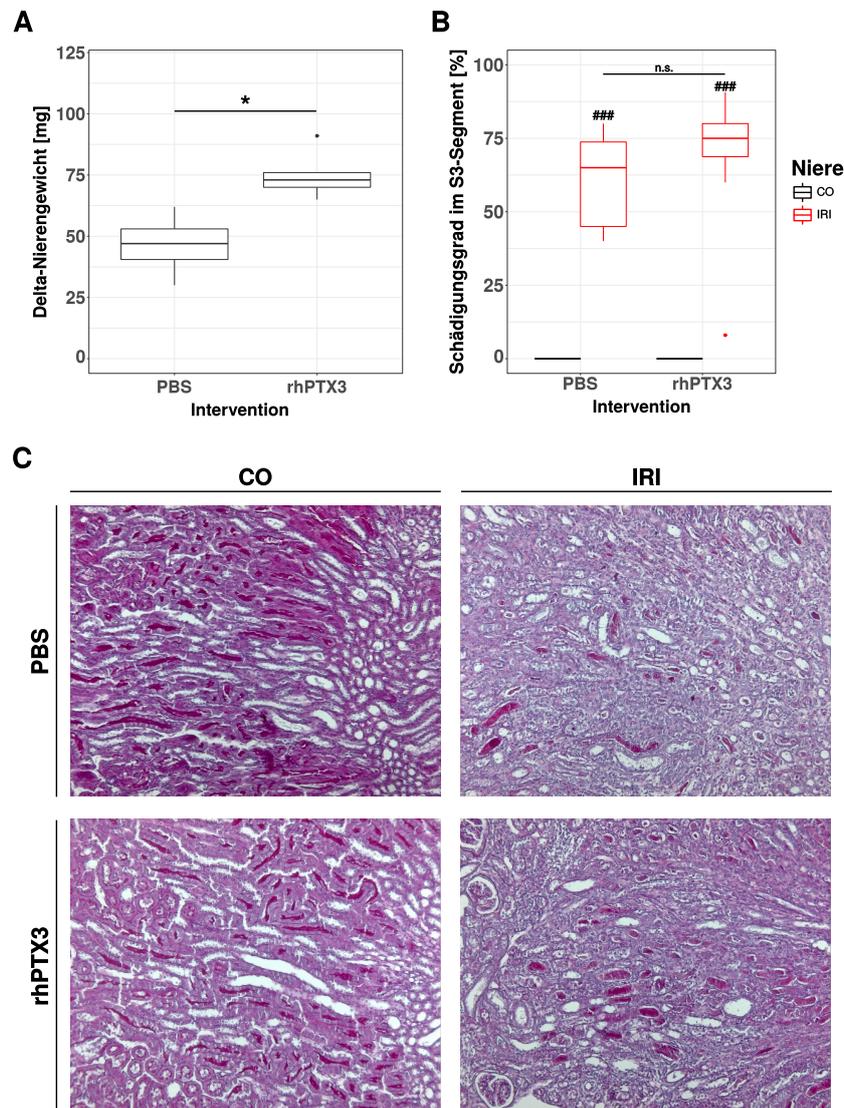


Abbildung 30: Effekt der Substitution mit rhPTX3-Gabe während der Regenerationsphase nach IRI in *Ptx3*^{-/-} Mäusen auf den histologischen Nierenschaden. Nach Durchführung des in Abb. 24 dargestellten Versuches an *Ptx3*^{-/-} Mäusen wurden die Tiere geopfert und die kontralateralen und post-ischämischen Nieren gewogen (A). Die dargestellten Daten ergeben sich aus den nach Intervention gruppierten Δ -Nierengewichten beider Nieren jedes einzelnen Tieres. (B) Semiquantitative Befundung PAS-gefärbter Nierenschnitte hinsichtlich pathologischer Veränderungen des S3-Segmentes. (C) Repräsentative Aufnahmen der in (B) quantifizierten Schnitte. Die dargestellten Daten stammen aus einem Experiment mit jeweils 5 Tiere pro Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen kontralateralen und post-ischämischen Nieren der jeweiligen Interventionsgruppe sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen den post-ischämischen Nieren beider Gruppen mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

genüber dem der nicht-substituierten *Ptx3*^{-/-} Mäuse signifikant erhöht (Abb. 30A). Diese Beobachtung deckt sich mit der des Analogexperimentes in Wildtyp-Tieren. Auch ergab die Befundung der angefertigten PAS-Nierenschnitte einen ähnlich hohen Schädigungsgrad des S3-Segments der post-ischämischen Nieren in rhPTX3-substituierten *Ptx3*^{-/-} wie in rhPTX3-behandelten Wildtyp Tieren (Abb. 30B & 26B). Allerdings ergab das PAS-Scoring für die Vehikel-behandelten *Ptx3*^{-/-} Mäuse einen beinahe ebenso hohen Wert (Abb. 30B&C).

Trotz des ähnlichen Schadensausmaßes in den post-ischämischen Nieren beider Interventionsgruppen sprach der Unterschied im Δ -Nierengewicht für einen höheren Verlust gesunden Parenchyms in den post-ischämischen und mehr Hypertrophie in den kontralateralen Nieren bei den

rhPTX3-substituierten Tieren. Während sich in der PAS-Färbung zelluläre Infiltrate, Harnzylinder, tubuläre Dilatation und nekrotische Zellen gut erkennen und flächenmäßig quantifizieren lassen, ist es besonders bei profunder Schädigung schwer zu beurteilen, wie viel intakte Tubulusabschnitte noch vorhanden sind. Detaillierter lässt sich der Zustand ischämisch geschädigter proximaler Tubuluszellen mittels Lotus Tetragonolobus Lektin (LTL) Färbung betrachten. LTL bindet an membranständige Kohlenhydrate differenzierter proximaler Tubuluszellen und dient als Marker ihrer Unversehrtheit. Die semiquantitative Auswertung LTL-positiv gefärbten Nierenparenchyms in den kontralateralen und post-ischämischen Nieren beider Gruppen ergab, dass sowohl rhPTX3-substituierte als auch nicht-substituierte *Ptx3*^{-/-} Mäuse einen sehr deutlichen Verlust an gesundem proximalen Tubuluszellen erlitten (Abb. 31A&B). Jedoch fiel in den rhPTX3-behandelten Tieren der Verlust statistisch signifikant größer aus.

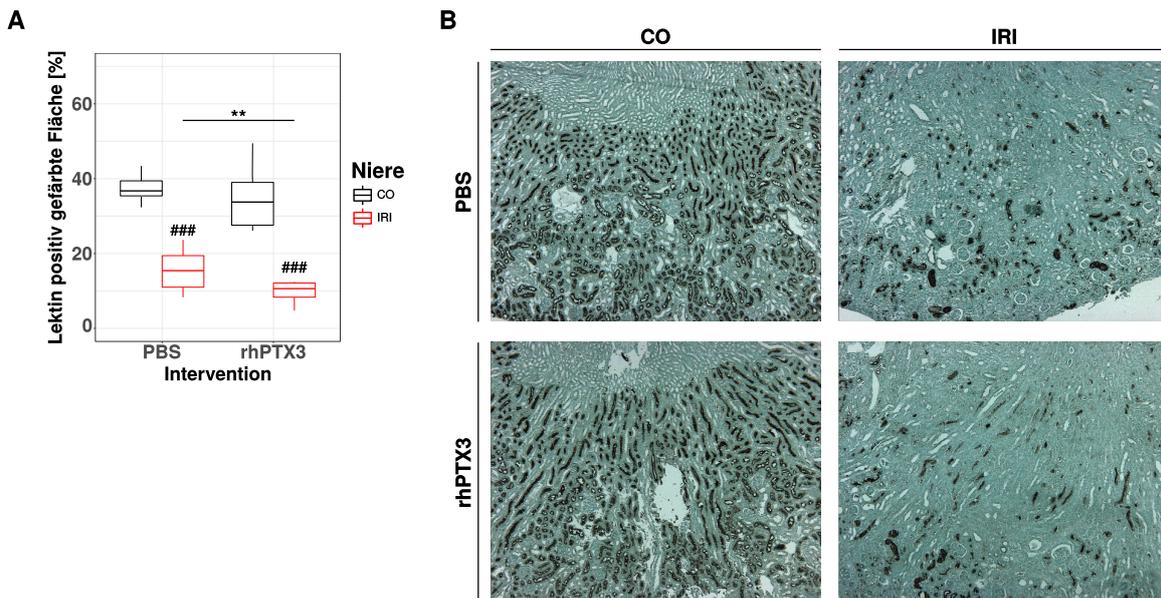


Abbildung 31: Effekt der Substitution mit rhPTX3 während der Regenerationsphase nach IRI in *Ptx3*^{-/-} Mäusen auf den proximalen Tubulus. (A) Semiquantitative Analyse der immunhistochemisch für Lotus tetragonolobus Lektin positiv gefärbten Fläche in CO- und IRI-Nierenschnitten 10 Tage nach Reperfusion nach Behandlung mit PBS oder rhPTX3 (Studiendesign Abb. 24). (B) Repräsentative Aufnahmen der Nierenschnitte auf deren Grundlage die in (A) dargestellte Quantifizierung durchgeführt wurde. Die dargestellten Daten stammen aus einem Experiment mit jeweils 5 Tiere pro Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen kontralateralen und post-ischämischen Nieren der respektiven Gruppe sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen den post-ischämischen Nieren beider Gruppen mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

Δ -Nierengewicht und LTL-Färbung sprechen für eine leichte Aggravierung des Phänotyps in der rhPTX3-substituierten Gruppe, was die in Kapitel 4.2 gezeigten Ergebnisse bestätigt. Die histopathologischen Befunde zeigten aber auch ganz eindeutig, dass die post-ischämischen Nieren beider Gruppen einen sehr schweren Schaden erlitten. Obschon nicht Gegenstand dieser Studien bestätigt dies den von Lech et al.^[151] beobachteten Befund, dass *Ptx3*^{-/-} gegenüber *Ptx3*^{+/+} Tieren einen deutlich aggravierten Verlauf nach IRI aufweisen (vgl. Abb. 26B und 30B, PBS-behandelte Gruppe), der eindeutig auf die Aktivität von endogenem Ptx3 zurückzuführen ist.

Zur Beantwortung der Frage, ob die leichte Verschlechterung des Phänotyps in rhPTX3-behandelten Tieren mit einer Veränderung der intrarenalen Immunzellpopulation assoziiert ist, wurden die Gesamtnierenzellsuspensionen durchflusszytometrisch charakterisiert (Abb. 32). Zunächst wiesen beide Gruppen eine ähnliche Gesamtinfiltration von Leukozyten auf (Abb. 32A), wobei auch

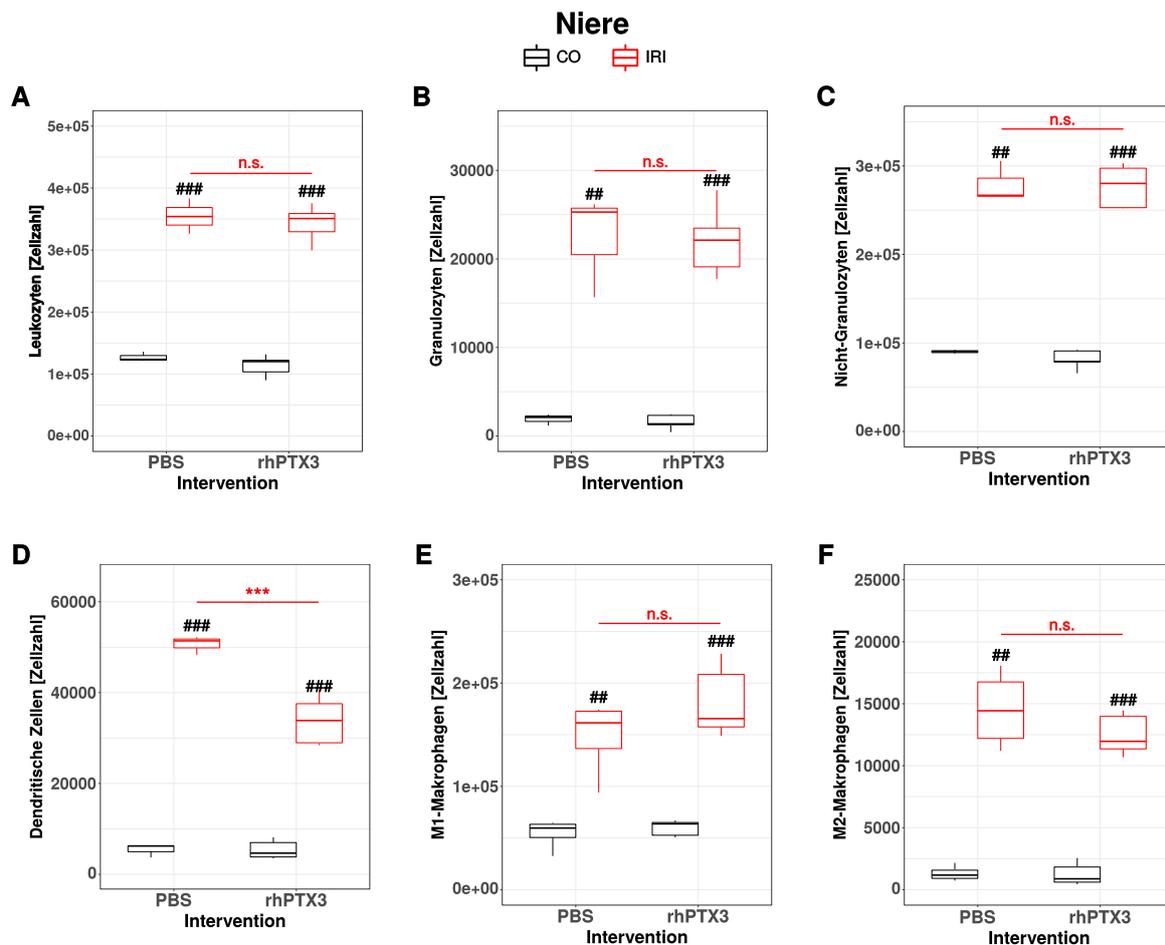


Abbildung 32: Durchflusszytometrische Quantifizierung intrarenaler Immnzellen mit und ohne Substitution mit rhPTX3 in *Ptx3*^{-/-} Tieren während der Regenerationsphase nach IRI. Nach Durchführung des in Abb. 24 dargestellten Versuches an *Ptx3*^{-/-} Mäusen wurden die Tiere geopfert und die Gesamtnierenzellsuspensionen jeder einzelnen Niere mit Hilfe eines Durchflusszytometers charakterisiert. Detektiert wurden die Zahl aller Leukozyten (A), der Granulozyten (B), aller Nicht-Granulozyten (C), der dendritischen Zellen (D), der M1-Makrophagen (E) und der M2-Makrophagen (F). Dargestellt sind die Gesamtzellzahlen der respektiven Immnzellpopulation von 5 Tieren pro Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede der verschiedenen Parameter zwischen kontralateralen und post-ischämischen Nieren sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen post-ischämischen Nieren zwischen zwei Reperfusionzeitpunkten mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

bei einer Differenzierung in Granulozyten und Nicht-Granulozyten keine signifikanten Unterschiede auffielen (Abb. 32B&C). Eine genauere Aufschlüsselung der Gesamtmakrophagenpopulation in M1- und M2-Makrophagen (Abb. 32 E&F) ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen. Der leichte Trend in der rhPTX3-substituierten Gruppe hin zu mehr M1- und weniger M2-Makrophagen gegenüber der Kontrollgruppe bewegt sich jeweils lediglich im einstelligen prozentualen Bereich, sodass abseits der Messgenauigkeit von keinem biologisch relevanten Effekt auszugehen ist. Hingegen führte die Substitution von Ptx3 zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl dendritischer Zellen in den post-ischämischen Nieren der *Ptx3*^{-/-} Mäuse gegenüber den PBS-behandelten Kontrolltieren (Abb. 32 D). Dendritische Zellen spielen in der Regeneration nach renaler IRI ebenso wie M2-Makrophagen eine wichtige Rolle^[146,134,217] und die Reduktion ihrer Anzahl in Abhängigkeit von rhPTX3 könnte ursächlich für eine Verminderung der Resolution von Entzündung und die verzögerte Heilung sein.

Zu den Immnzellpopulationen, die an Tag 10 nach Reperfusion erwartungsgemäß keine Rolle mehr spielten, gehörten infiltrierende Monozyten und Neutrophile Granulozyten (Daten nicht gezeigt).

Beide Populationen sind in der Akutphase nach Reperfusion die treibende pro-entzündliche Kraft und konnten trotz verzögerter Entzündungsresolution an Tag 10 in beiden Gruppen nicht mehr nachgewiesen werden.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die Substitution mit rhPTX3 in der Regenerationsphase nach IRI unabhängig von endogenem Ptx3 zu einer Verschlechterung des Phänotyps führt, der sich in dem vermehrtem Verlust von funktionierendem Nierenparenchym und einer Verminderung intrarenaler DCs äußert.

4.4 Effekte der therapeutischen Intervention mit rhPTX3 bei akuter Oxalatnephropathie

Zur Untersuchung phasenabhängiger Ptx3-Effekte bei akutem und chronisch-auf-akutem Nierenversagen war die unilaterale IRI-Operation das Modell der Wahl, da hier der Schaden sehr leicht zu titrieren ist und das Modell Schädigungs- und Regenerationsphase unterscheidet.

Die vorangegangenen Experimente lassen vermuten, dass rhPTX3 keine Therapieoption in der Regenerationsphase nach einem entzündlichen Nierenschaden darstellt. Im Gegensatz dazu belegen die Vordaten von Lech et al.^[151], dass therapeutisch eingesetztes rhPTX3 in der Akutphase unmittelbar nach der Schädigung positive Effekte auf die exkretorische Nierenfunktion und die Organstruktur hat. Da sich diese Befunde ausschließlich aus IRI-Experimenten ableiten bleibt die Frage, ob es sich bei dem beobachteten Effekt um ein isoliertes Phänomen im Rahmen einer ischämischen Schädigung oder um eine Therapieoption bei entzündlichen Nierenerkrankungen im Allgemeinen handelt, bislang unbeantwortet.

Um Hinweise auf eine etwaige breitere Anwendbarkeit von rhPTX3 bei entzündlichen Nierenerkrankungen zu finden sollten zwei weitere Modelle untersucht werden, deren Pathomechanismen unter anderem mit einer signifikanten Entzündungsreaktion einhergehen: akute und chronische Oxalatnephropathie.

CaOx-Kristalle schädigen die Nieren durch eine Reihe von Mechanismen. Zunächst haben die Kristalle eine direkte zytotoxische Wirkung auf Tubuluszellen, die zu Nekroptose, einer immunogenen Form des regulierten Zelltodes^[161], führt. Die dabei in den Extrazellularraum abgegebenen nukleären Histone sind wiederum zytotoxisch und verursachen weiteren nekrotischen Zelltod^[6]. Dieser sich selbst verstärkende Mechanismus^[162] amplifiziert nicht nur den primären Schaden, es werden auch Alarmine und DAMPs freigesetzt, die Toll-like-Rezeptoren und Inflammasome aktivieren. Diese Aktivierung führt in den sterbenden Zellen u.a. zur Expression von Zytokinen und Chemokinen, die Immunzellen anlocken und damit eine lokale Entzündungsreaktion einleiten. Die Aktivität pro-entzündlicher Immunzellen führt im Weiteren zu mehr nekrotisch-immunogenem Zelltod, sodass sich ein sich selbst verstärkender positiver feedback loop etabliert, der als Nekroinflammation bezeichnet wird^[162].

Zusätzlich zu der Aktivierung von Inflammasomen durch Alarmine und DAMPs können CaOx-Kristalle z.B. in DCs eine direkte NLRP3-Inflammasom-Aktivierung über Phagozytose der Kristalle sowie einen Kalium-Efflux aus der Zelle induzieren^[182], sodass eine Rekrutierung pro-inflammatorischer Immunzellen auch ohne vorangehenden Zelltod möglich ist.

Beim Modell der akuten Oxalatnephropathie wird zum Zeitpunkt 0 eine Übersättigung der Nieren mit Oxalationen durch eine Natriumoxalat i.p.-Injektion und Exposition mit 3% Natriumoxalat-

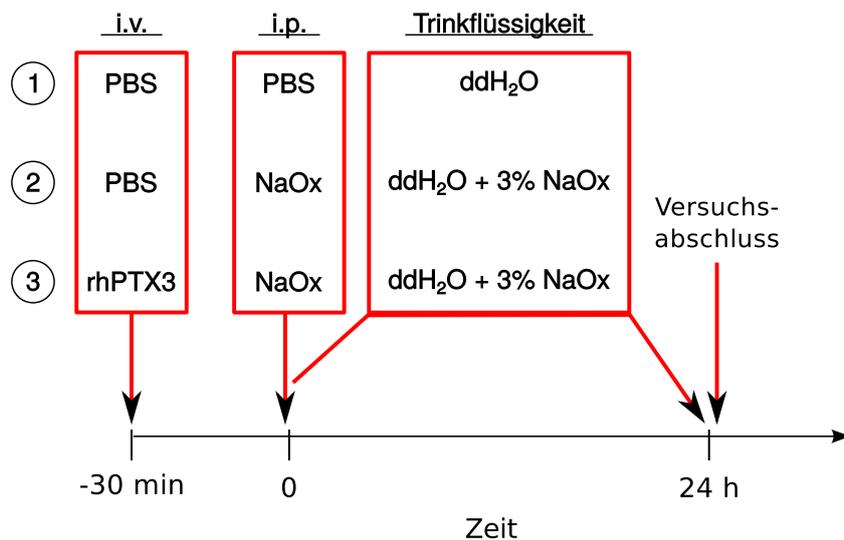


Abbildung 33: Versuchsanordnung zur Testung des Effektes von therapeutischem rhPTX3 bei akuter Oxalatnephropathie. Männliche C57BL/6N Mäuse im Alter von 7-8 Wochen wurden wie folgt behandelt: (1) 10 ml/kg KG PBS i.v. und 10 ml/kg KG PBS i.p., (2) 10 ml/kg KG PBS i.v. und 100 mg/kg KG Natriumoxalat i.p. (in 10 ml/kg KG), (3) 5 mg/kg KG rhPTX3 (in 10 ml/kg KG) i.v. und 100 mg/kg KG Natriumoxalat i.p. (in 10 ml/kg KG). Die Natriumoxalat-behandelten Tiere (2 & 3) erhielten zudem eine 3 %-ige Natriumoxalatlösung anstelle des normalen Trinkwassers der Kontrollgruppe (1). Allen Tieren stand für die Versuchsdauer Futter ad libitum zur Verfügung. Nach 24 h wurde der Versuch durch zervikale Dislokation und Entnahme der Nieren zur weiteren Prozessierung beendet.

angereichertem Wasser eingeleitet (Abb. 33). Der darauf folgende akute entzündliche Schaden hat, wie Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Anders zeigen, sein Maximum an Tag 1 und klinisch relevante Parameter zur intrarenalen Entzündungsreaktion oder Parameter der exkretorischen Nierenfunktion wie Plasmakreatinin und Harnstoff-Stickstoff normalisieren sich bis Tag 5^[182].

Um zu testen, ob PTX3 auch in diesem Modell die Entzündungsreaktion modulieren kann, wurde C57BL/6N Mäusen zeitgleich mit der i.p.-Injektion von 100 mg/kg KG Natriumoxalat zur Modellinduktion ein 5 mg/kg KG rhPTX3 Bolus i.v. oder das gleiche Volumen PBS verabreicht (Abb. 33). Die Kontrolltiere erhielten entsprechend eine i.p. und eine i.v. Injektion PBS gleichen Volumens. Nach 24 h wurden die Mäuse in Inhalationsnarkose ausgeblutet und euthanasiert.

Vor einer tiefer gehenden Phänotypenanalyse war es ausschlaggebend zu untersuchen, ob sich der rhPTX3 Bolus auf die Deposition von CaOx-Kristallen in den Nieren ausgewirkt hat und ob dementsprechend prinzipiell von einer gleich schweren Nierenschädigung auszugehen war. Dies wurde mit der histochemischen Färbung von Paraffin-Nierenschnitten nach Pizzolato überprüft (Abb. 34). Nachdem die rhPTX3-Injektion die CaOx-Kristalldeposition im Nierenparenchym weder quantitativ noch qualitativ beeinflusst hatte, konnte davon ausgegangen werden, dass die Nieren der Tiere beider Gruppen potentiell im selben Ausmaß geschädigt wurden.

Die kolorimetrische Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff-Stickstoff im Plasma der Tiere ergab hingegen, dass die rhPTX3 behandelten Tiere 24 h nach Modellinduktion eine signifikant bessere exkretorische Nierenfunktion hatten als die PBS-behandelte Gruppe (Abb. 35).

Zur weiteren Einschätzung des entstandenen Schadens und der zugehörigen Entzündungsreaktion wurde aus den Nieren mRNA isoliert, umgeschrieben und per qPCR die Expression von Nierenschaden- (Abb. 36A-D) sowie Entzündungsparametern (Abb. 36E&F) bestimmt. Die Behandlung mit rhPTX3 führte zu einer deutlichen Reduktion des allgemeineren Nierenschadensmarkers *Lcn2*, sowie von *Gsta1* (proximaler Tubulus) und *Gstp1* (distaler Tubulus, Abb. 36B-D). Der ebenfalls sehr gut

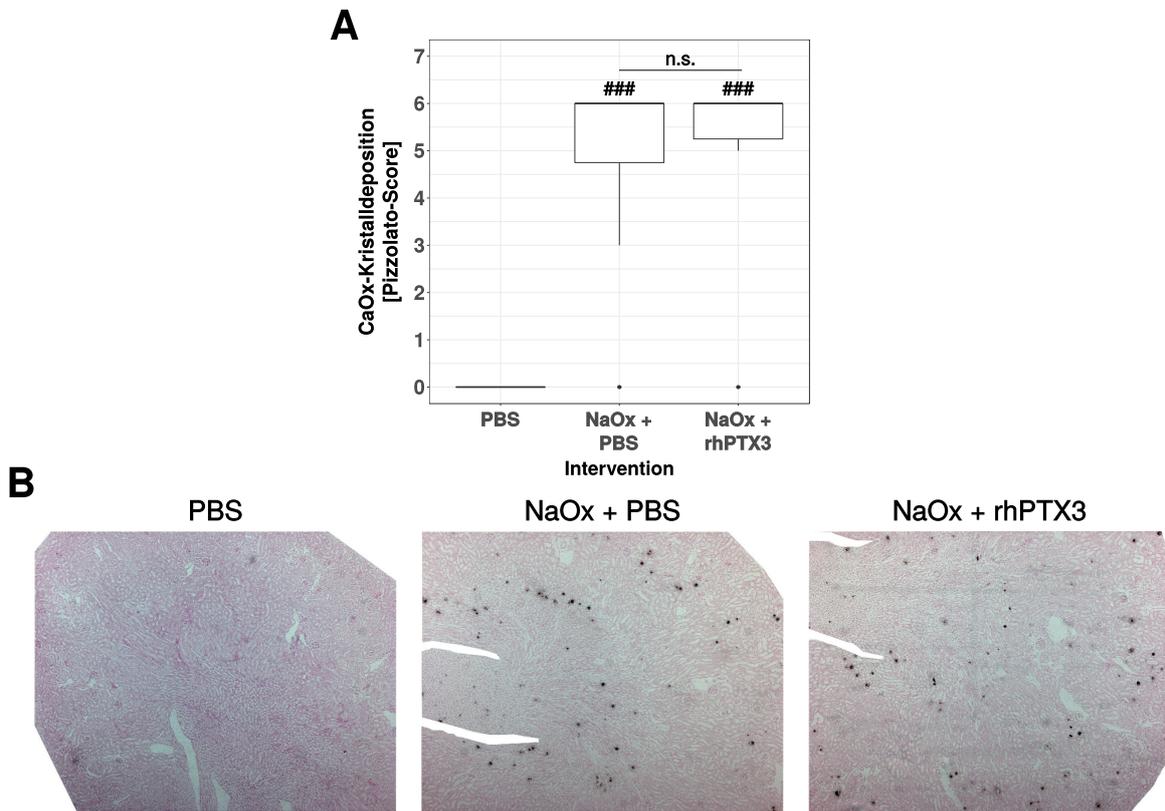


Abbildung 34: Effekt der rhPTX3-Gabe auf die CaOx-Kristalldeposition bei akuter Oxalatnephropathie. Nach Durchführung des in Abb. 33 beschriebenen Versuches wurden die Tiere geopfert, die Nieren entnommen, aufbereitet und immunhistochemisch auf die Präsenz von CaOx-Kristallen hin untersucht. Die in (B) exemplarisch dargestellten Gesamtnierenschnittaufnahmen wurden mit Hilfe des Pizzolato-Scores semiquantitativ ausgewertet (A). Die dargestellten Daten stammen aus zwei unabhängigen Experiment mit jeweils 5 Tieren pro Interventionsgruppe und Experiment.

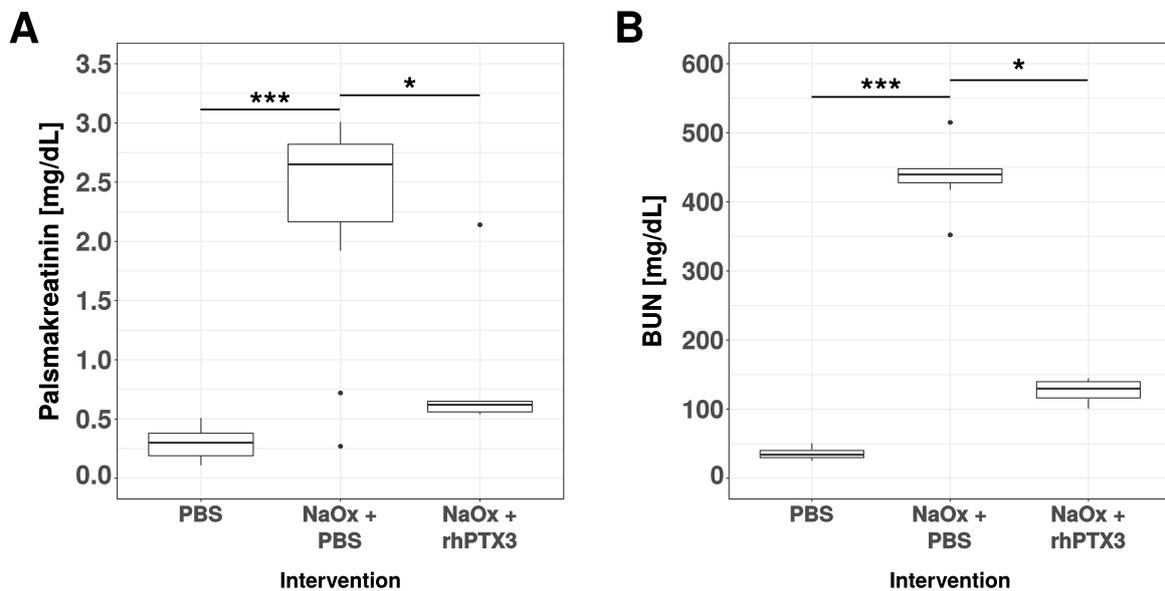


Abbildung 35: Effekt der rhPTX3-Gabe auf die exkretorische Nierenfunktion bei akuter Oxalatnephropathie. Nach Durchführung des in Abb. 33 beschriebenen Versuches wurden die Tiere unter Isofluran-Narkose ausgeblutet, das Blutplasma wurde gewonnen und die darin enthaltene Konzentration von Kreatinin (A) und Harnstoff-Stickstoff (B) bestimmt. Die dargestellten Daten stammen aus zwei unabhängigen Experiment mit jeweils 5 Tieren pro Interventionsgruppe und Experiment.

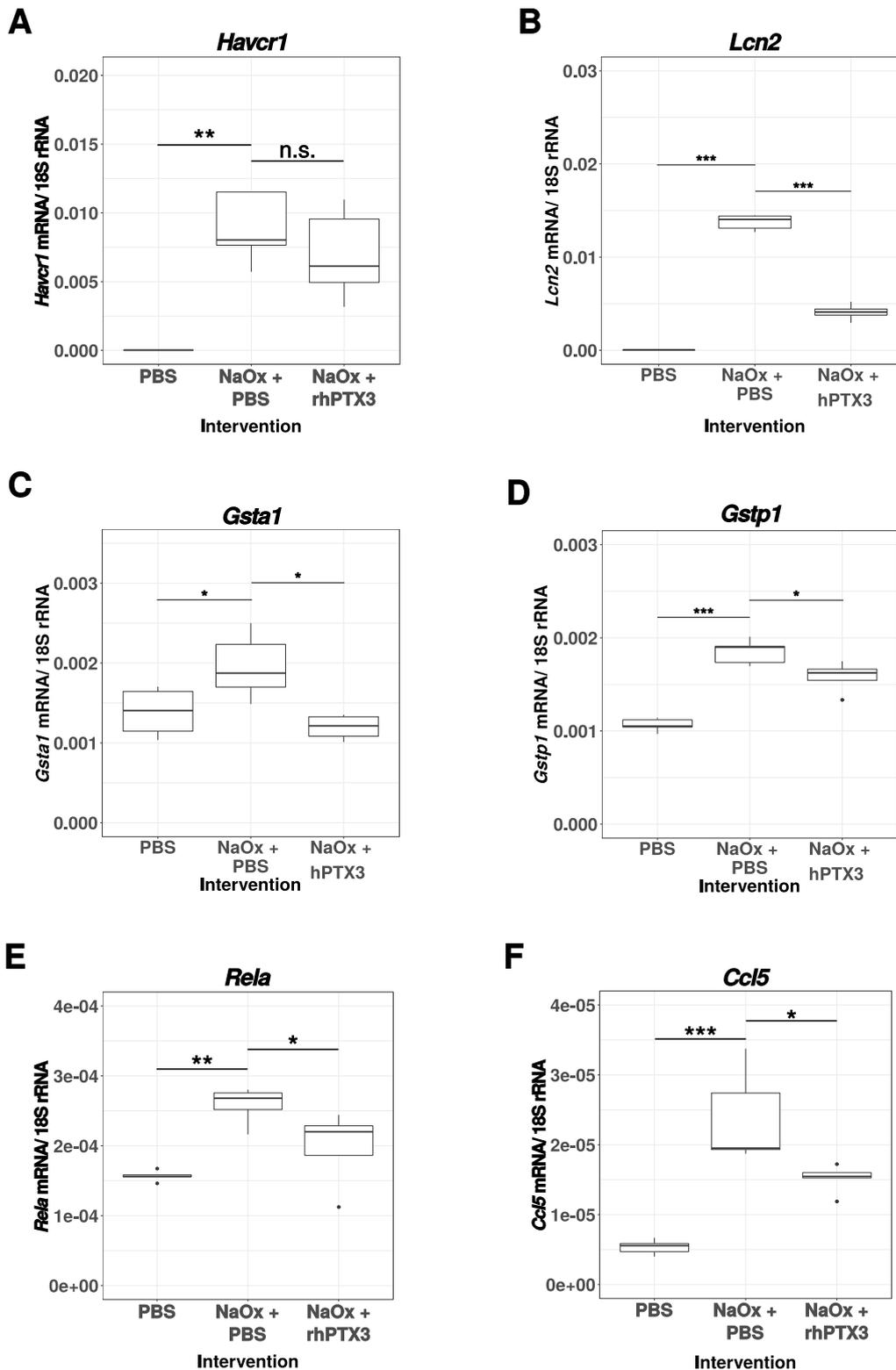


Abbildung 36: Effekt der rhPTX3-Gabe auf das mRNA Expressionsprofil von Nierenschadens- und Entzündungsparametern bei akuter Oxalatnephropathie. Nach Durchführung des in Abb. 33 beschriebenen Versuches wurden ein intrarenales mRNA-Expressionsprofil für jede der Interventionsgruppen mittels qPCR erhoben. Die Expressionslevel von (A) *Havcr1*, (B) *Lcn2*, (C) *Gsta1*, (D) *Gstp1*, (E) *Rela* und (F) *Ccl5* wurden auf das jeweilige Level der 18S rRNA normalisiert. Die dargestellten Daten stammen aus zwei unabhängigen Experiment mit jeweils 5 Tieren pro Interventionsgruppe und Experiment.

etablierte Schadensmarker *Havcr1* hingegen reagierte nur mit einer trendhaften Reduktion auf die therapeutische Intervention verglichen mit der PBS-Kontrolle (Abb. 36A). Dennoch lässt sich festhal-

ten, dass die rhPTX3-Intervention zu einer deutlich messbaren Schadensminderung im Nierenparenchym geführt hat.

Passend dazu war ebenso eine verminderte mRNA-Expression der NF- κ B-Untereinheit *Rela* in der rhPTX3-behandelten Interventionsgruppe zu detektieren, was für eine verminderte Aktivierung des Immunsystems spricht (Abb. 36E). Auch die Expression von *Ccl5*, einem wichtigen Chemokin, welches die Rekrutierung von T-Zellen und pro-entzündlichen Monozyten vermittelt, geht durch die rhPTX3-Therapie signifikant zurück (Abb. 36F).

Als zu Grunde liegender Mechanismus für den schadens- und entzündungshemmenden Effekt von rhPTX3 wurde - analog zu den IRI-Experimenten - die Modulation der Extravasation von Immunzellen in die geschädigte Niere durch eine kompetitive Inhibierung der P-Selektin-Psgl-1-Interaktion vermutet. Der reduzierten Präsenz von pro-entzündlichen Immunzellen folgt demnach eine reduzierte Immunzell-vermittelte sekundäre Gewebeschädigung.

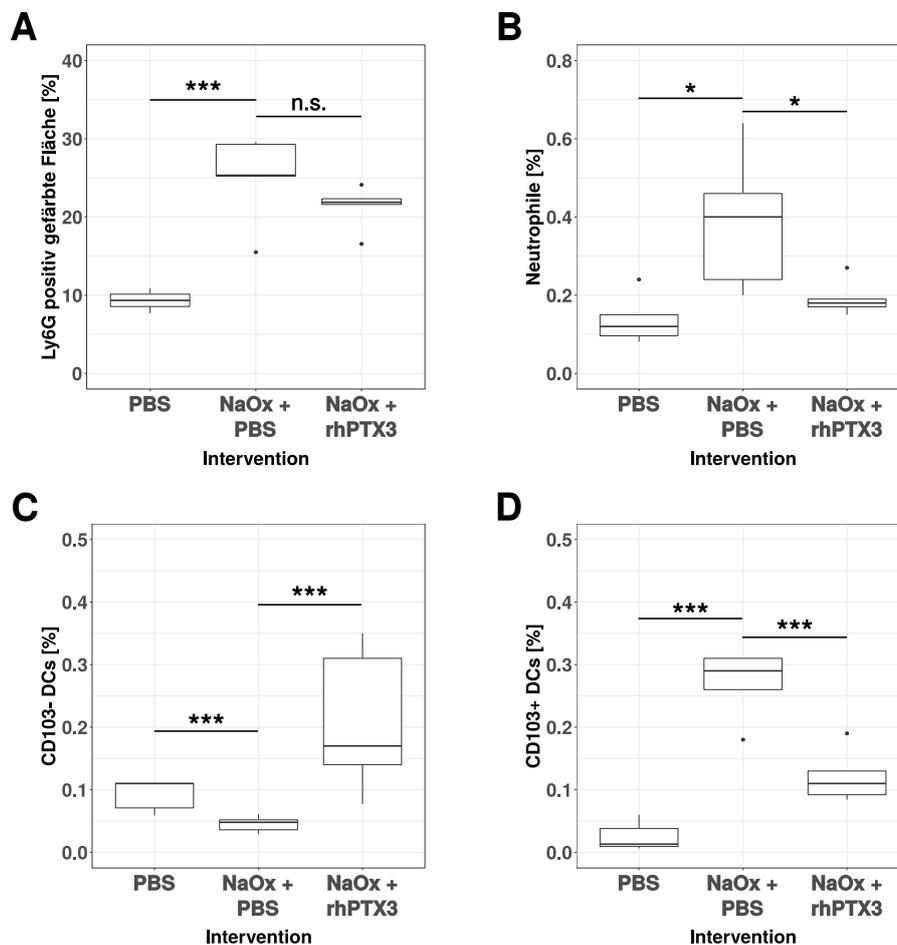


Abbildung 37: Effekt der rhPTX3-Gabe auf intrarenale Immunzellpopulationen bei akuter Oxalatnephropathie. Nach Durchführung des in Abb. 33 beschriebenen Versuches wurden (A) Paraffinschnitte der Nieren hergestellt, immunhistochemisch für Ly6G gefärbt und die positiv gefärbte Fläche quantifiziert, sowie (B) Gesamtnierenzellsuspensionen durchflusszytometrisch auf den prozentualen Anteil von (B) Neutrophilen, (C) CD103 negativen und (D) Cd103 positiven DCs hin untersucht. Die dargestellten Daten stammen aus zwei unabhängigen Experiment mit jeweils 5 Tieren pro Interventionsgruppe und Experiment.

Die ersten Immunzellen, die bei der akuten Oxalatnephropathie in die Nieren einwandern sind wie bei der IRI neutrophile Granulozyten. Immunhistochemisch beurteilt zeigt die rhPTX3-Therapie einen leichten Trend hin zu einer Reduktion der Neutrophilen-Präsenz (Abb. 37A). In der Durchflusszytometrie ließ sich dieser Trend bestätigen und erreichte statistische Signifikanz (Abb. 37B). Neben

Neutrophilen gehören auch Dendritische Zellen (DCs) zu den ersten Immunzellen des angeborenen Immunsystems die auf immunogene Gewebeschäden reagieren. Das DC-stämmige Integrin CD103 vermittelt dabei die Präsentation von Antigenen gegenüber CD8 positiven T-Zellen, die zunächst eine pro-entzündliche und zytotoxische Rolle in der Immunantwort einnehmen. Der rhPTX3-Bolus führte in den Nieren der behandelten Tiere zu einer profunden Reduktion der CD103 positiven DCs (Abb. 37D). Allerdings ist die Gesamtpopulation der DCs nicht verschwunden, wie in Abb. 37C zu sehen ist, lediglich die CD103-Expression ist durch die rhPTX3 Behandlung herunter reguliert worden.

Zusammenfassend hat die therapeutische Anwendung von rhPTX3 im Modell der akuten Oxalatnephropathie gegenüber der Kontrollgruppe zu einer signifikant besseren Nierenfunktion, einem geringeren Expressionslevel der Schadens- und Entzündungsmarker sowie einer geringeren Rekrutierung von Neutrophilen geführt. Damit konnte gezeigt werden, dass der therapeutische Erfolg von rhPTX3 in der akut-entzündlichen Phase nach Nierenschädigung nicht ein isoliertes Phänomen des IRI-Modells darstellt. Ob der zugrunde liegende Mechanismus der gleiche ist, bleibt an dieser Stelle unbeantwortet. Unklar ist außerdem, welche Rolle endogenes Ptx3 im Pathomechanismus der akuten Oxalatnephropathie spielt.

4.5 Rolle von endogenem Ptx3 in der akuten Oxalatnephropathie

Beide Fragen sollten im Folgenden durch die Induktion einer akuten Oxalatnephropathie in *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Geschwistern nach dem im Abb. 38 beschriebenen Design und die anschließende Phänotypisierung adressiert werden.

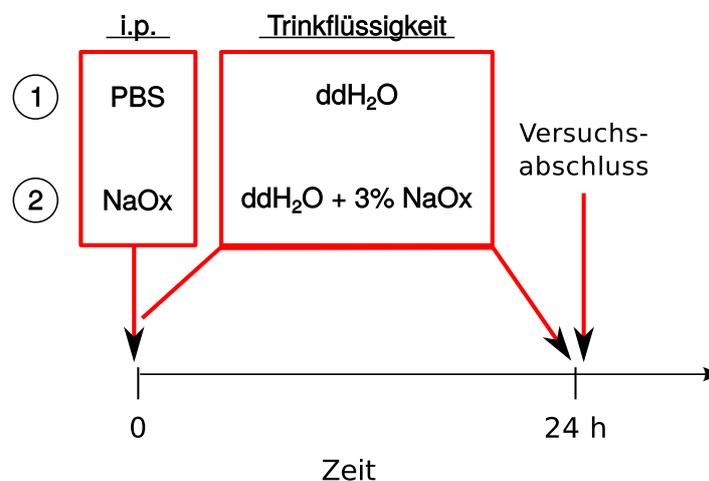


Abbildung 38: Versuchsanordnung zur Testung der Rolle von endogenem Ptx3 bei akuter Oxalatnephropathie. Männliche *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Mäusen im Alter von 7-8 Wochen wurden wie folgt behandelt: (1) 10 ml/kg KG PBS i.p. sowie (2) 100 mg/kg KG Natriumoxalat i.p. (in 10 ml/kg KG). Die Natriumoxalat-behandelten Tiere erhielten zudem eine 3 %-ige Natriumoxalatlösung anstelle des normalen Trinkwassers der Kontrollgruppe. Allen Tieren stand für die Versuchsdauer Futter ad libitum zur Verfügung. Nach 24 h wurde der Versuch durch zervikale Dislokation und Entnahme der Nieren zur weiteren Prozessierung beendet.

Sofern der therapeutische Erfolg der rhPTX3-Gabe primär auf demselben immunmodulatorischen Effekt basiert, der von Lech et al.^[151] für die IRI beschrieben wurde, so wäre in den *Ptx3^{-/-}* Tieren im Vergleich zu ihren *Ptx3^{+/+}* Geschwistern mit einer erhöhten Zahl infiltrierender Neutrophile und einer dadurch verursachten schwerwiegenderen Nierenschädigung zu rechnen.

Nach Durchführung der Experimente und histochemischer Färbung der angefertigten Paraffinschnitte nach Pizzolato ließ sich mit Sicherheit sagen, dass sich die Kristalldeposition in den Nieren von *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Tieren nicht voneinander unterschied (Abb. 39). Damit war die Grundvoraussetzung der Vergleichbarkeit der Genotypen miteinander gegeben.

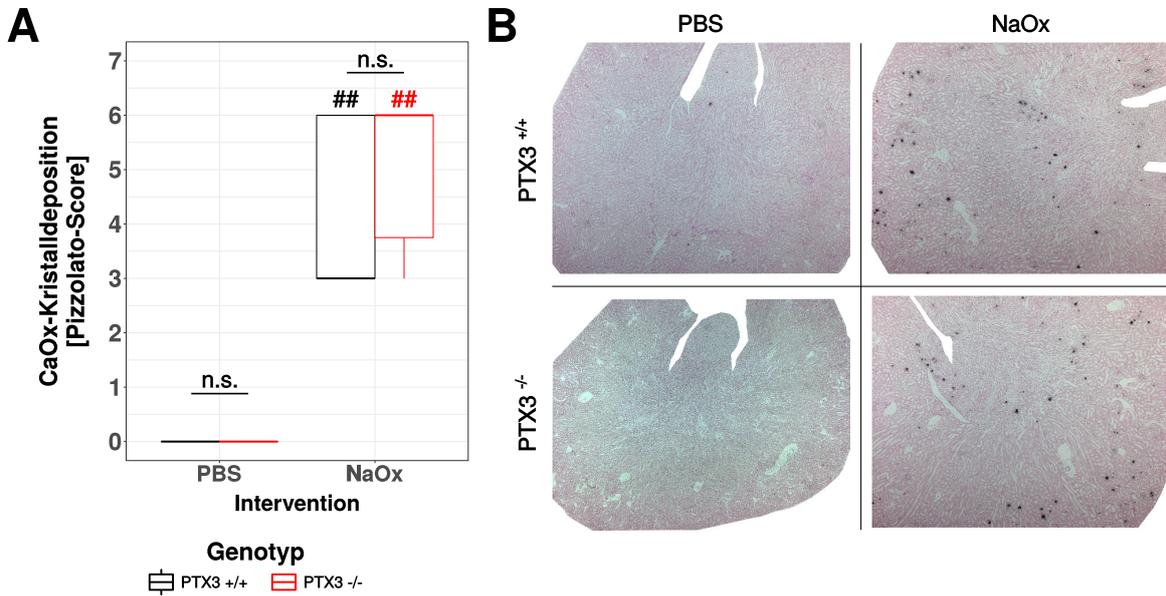


Abbildung 39: CaOx-Kristalldeposition bei akuter Oxalatnephropathie in *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Mäusen. Nach Durchführung des in Abb. 38 beschriebenen Versuches wurden die Tiere geopfert, die Nieren entnommen, aufbereitet und immunhistochemisch auf die Präsenz von CaOx-Kristallen hin untersucht. Die in (B) exemplarisch dargestellten Gesamtnierenschnittaufnahmen wurden mit Hilfe des Pizzolato-Scores semiquantitativ ausgewertet (A). Die dargestellten Daten stammen aus drei unabhängigen Experiment mit mindestens 5 Tieren pro Interventionsgruppe und Experiment.

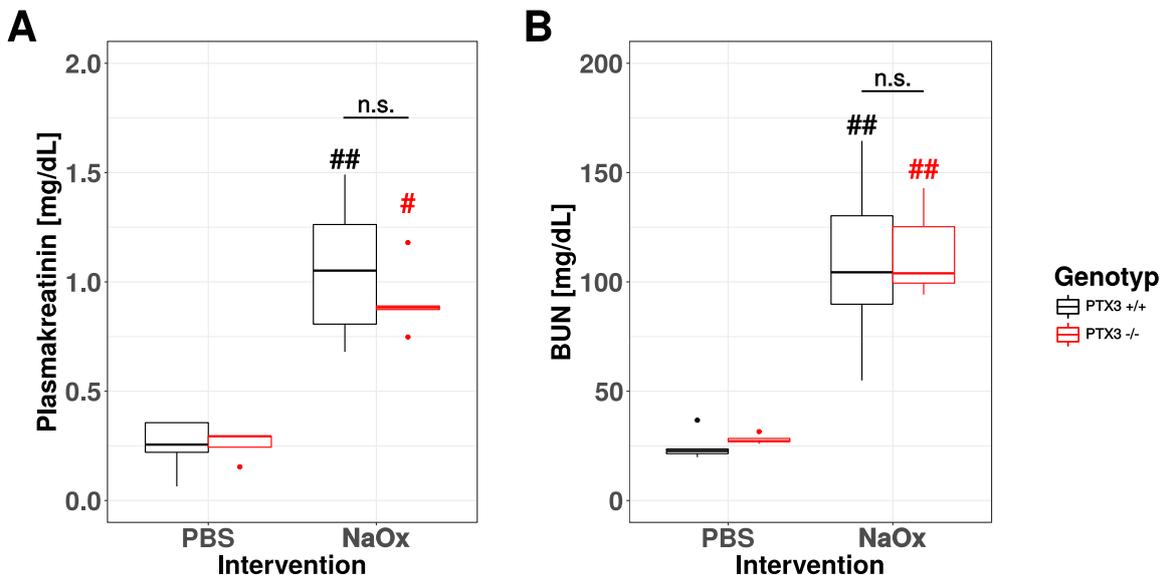


Abbildung 40: Exkretorische Nierenfunktion bei akuter Oxalatnephropathie in *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Mäusen. Nach Durchführung des in Abb. 38 beschriebenen Versuches wurde Blutplasma von den Tieren gewonnen und die Konzentrationen von (A) Kreatinin und (B) Harnstoff-Stickstoff bestimmt. Die dargestellten Daten stammen aus drei unabhängigen Experiment mit mindestens 5 Tieren pro Interventionsgruppe und Experiment.

Beide Genotypen reagierten gleichermaßen mit einer Erhöhung des Plasmakreatinins und Blut-Stickstoff-Harnstoffs (BUN) auf die Behandlung mit Natriumoxalat (Abb. 40A&B). Allerdings ließ sich kein Unterschied hinsichtlich der Verschlechterung der exkretorischen Nierenfunktion zwischen beiden Genotypen feststellen.

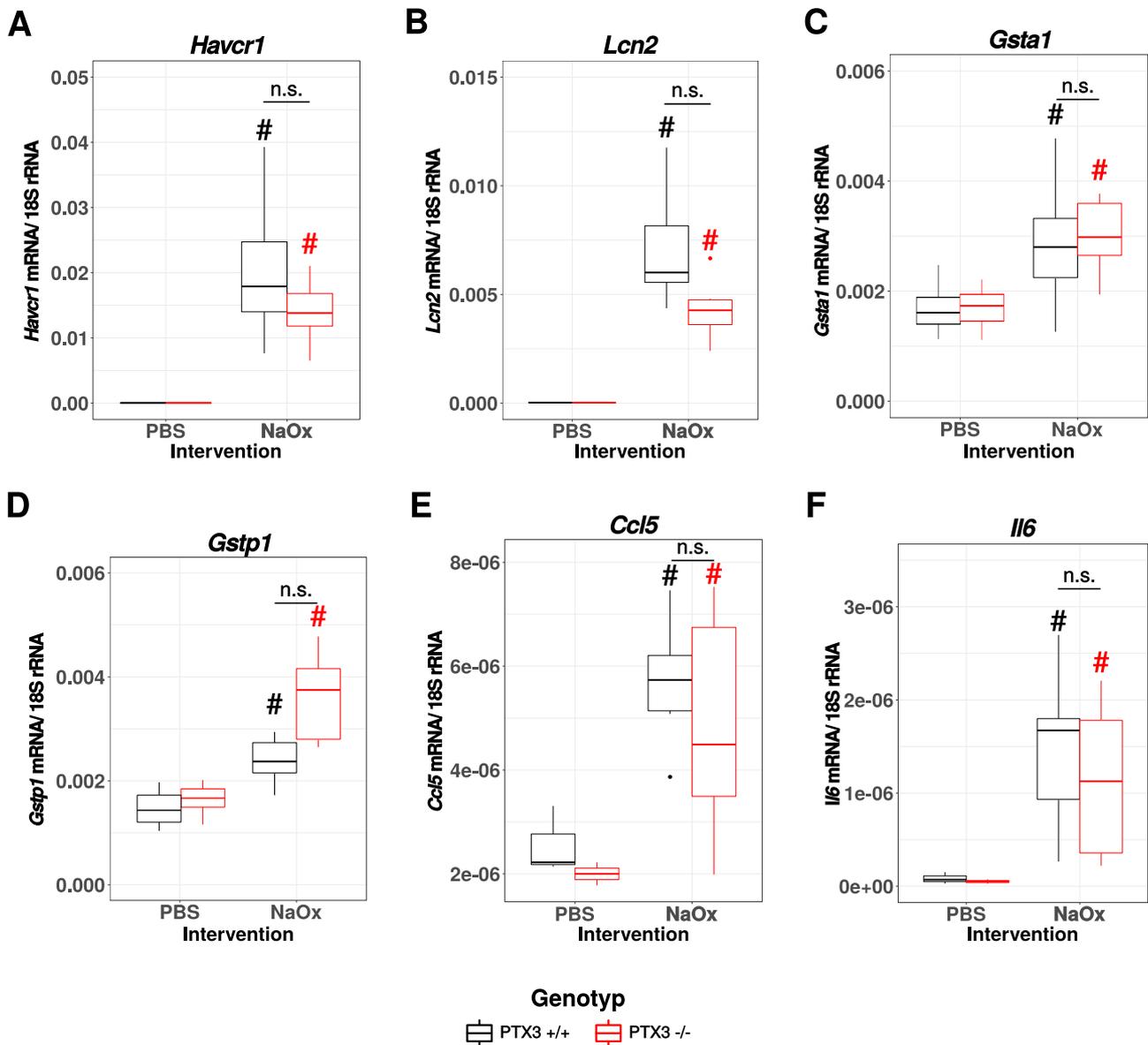


Abbildung 41: mRNA Expressionsprofil von Nierenschadens- und Entzündungsmarker bei akuter Oxalatnephropathie in *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Mäusen. Nach Durchführung des in Abb. 38 beschriebenen Versuches wurde Gesamt-RNA aus den Nieren gewonnen, umgeschrieben und per qPCR für die Expression von (A) *Havcr1*, (B) *Lcn2*, (C) *Gsta1*, (D) *Gstp1*, (E) *Ccl5* und (F) *Ii6* analysiert und auf das jeweilige Level der 18S rRNA normalisiert. Die dargestellten Daten stammen aus zwei unabhängigen Experiment mit jeweils 5 Tieren pro Interventionsgruppe und Experiment.

Zur Beantwortung der Frage ob sich Unterschiede im Schädigungsgrad der Nieren zwischen *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tieren feststellen ließen, wurde Gesamt-RNA aus dem Nierenparenchym gewonnen, umgeschrieben und per qPCR analysiert. Die etablierten Schadensmarker *Havcr1*, *Lcn2*, *Gsta1* und *Gstp1* (Abb. 41A-D) zeigten analog zu der Verschlechterung der Nierenfunktion auf mRNA-

Ebene einen signifikanten Anstieg in beiden Genotypen. Zwischen Oxalat-behandelten *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Tieren war wiederum kein Unterschied festzustellen.

Passend dazu konnten auf mRNA-Ebene ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Entzündungsmediatoren *Ccl5* und *Il6* (Abb. 41E&F) festgestellt werden. Auch hinsichtlich dieser Parameter reagierten *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Tiere gleichermaßen auf die Oxalat-Behandlung.

Die Konsistenz dieser Ergebnisse lässt wenig Zweifel daran, dass eine konstitutive *Ptx3*-Defizienz keinen Einfluss auf den Schweregrad einer akuten Oxalatnephropathie unter den gewählten Bedingungen hat. Wie in Abb. 42 gezeigt, wird endogenes *Ptx3* im Krankheitsverlauf von C57BL/6N Tieren nicht reguliert. Zusammengenommen mit den Daten aus den Knockout-Experimenten spricht das dafür, dass endogenes *Ptx3* bei akuter Oxalatnephropathie keine Rolle spielt.

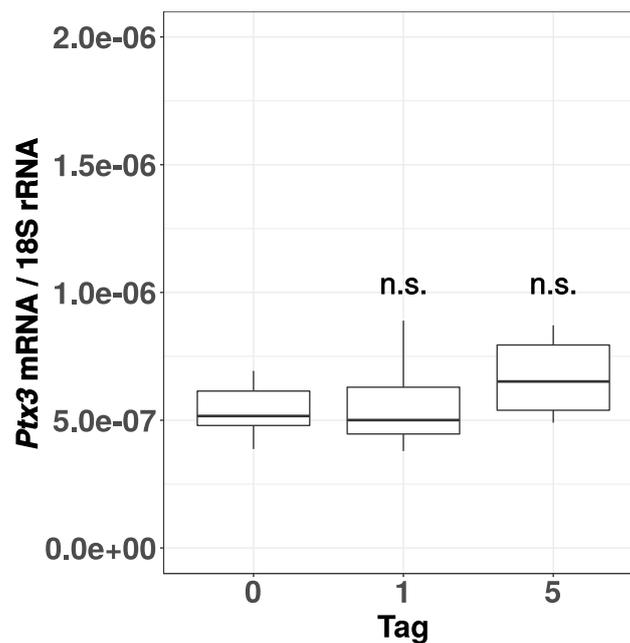


Abbildung 42: Intrarenale *Ptx3* mRNA Expression im Verlauf nach akuter Oxalatnephropathie. Vor und nach Induktion einer akuten Oxalatnephropathie an den Tagen 0, 1 und 5 wurde die Expression von *Ptx3* in den Nieren von C57BL/6N Tieren (männlich, 7-8 Wochen) mittels qPCR untersucht. Dargestellt sind Daten von 5 Tieren pro Zeitpunkt.

Es bleibt die Frage, ob die Absenz von endogenem *Ptx3* in diesem Modell zu einer vermehrten Leukozyteninfiltration in die Nieren führt. Die Zahl der infiltrierenden Neutrophilen zeigt keine Abhängigkeit vom Genotyp (Abb. 43A). Die Zahl der infiltrierenden Monozyten hingegen ist in den *Ptx3^{-/-}* Mäusen statistisch signifikant erhöht (Abb. 43B). Diese Daten erscheinen diskrepant, da Neutrophile und infiltrierende Monozyten gleichermaßen *Psgl-1* (den von *Ptx3* verdrängten P-Selektin-Liganden) in hoher Konzentration exprimieren^[108], sodass eine präferentielle Infiltration von Monozyten gegenüber Neutrophilen unwahrscheinlich erscheint.

An dieser Stelle lies sich festhalten, dass entgegen der aufgestellten Hypothese die Absenz von *Ptx3* im Modell der akuten Oxalatnephropathie nicht zu einer konsistenten Erhöhung der Zahl infiltrierender Immunzellen führt.

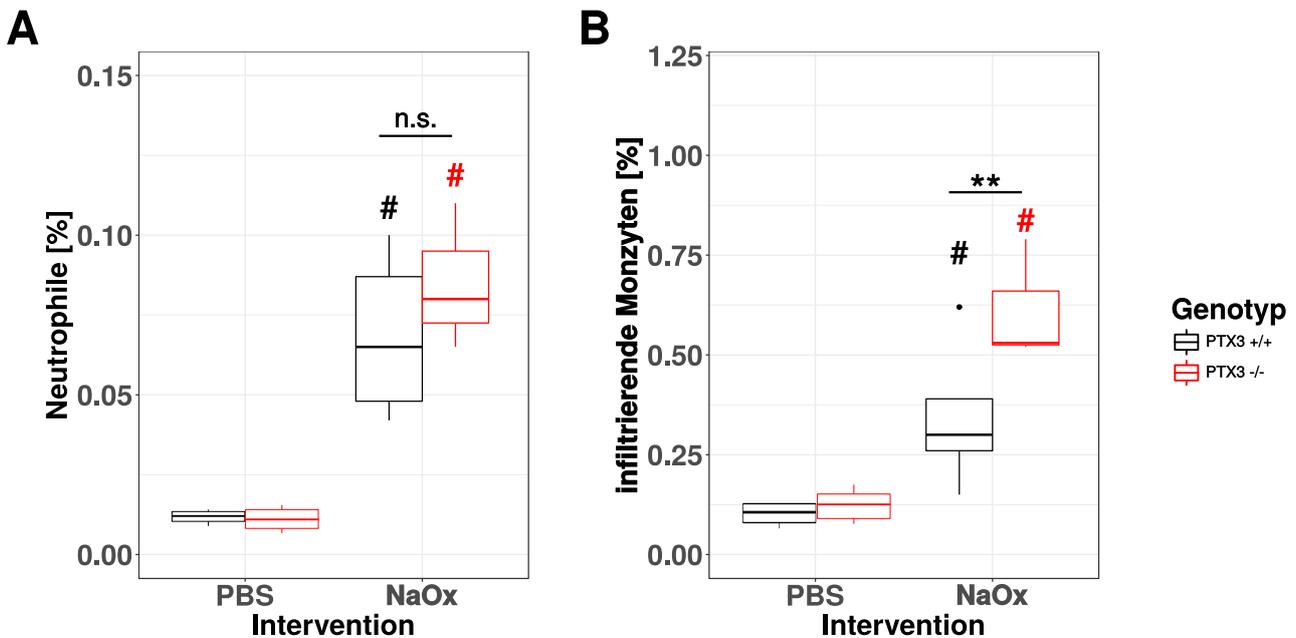


Abbildung 43: Durchflusszytometrische Quantifizierung infiltrierender Leukozyten in *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Mäusen bei akuter Oxalatnephropathie. Nach Durchführung des in Abb. 38 beschriebenen Versuches wurde eine Gesamtnierenzellsuspension hergestellt und der Anteil an (A) Neutrophilen und (B) infiltrierenden Monozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Die dargestellten Daten stammen aus einem Experiment mit 5 Tieren pro Gruppe.

4.6 Rolle von endogenem Ptx3 bei chronischer Oxalatnephropathie

Wie bereits in Kapitel 4.4 angesprochen, schädigen CaOx-Kristalle die Nieren durch eine Reihe von Mechanismen. Ein bisher noch nicht erwähnter, wichtiger Pathomechanismus ist die Obstruktion des tubulären Lumens mit Kristallen. Die schrittweise Aufkonzentration des glomerulären Filtrats sowie die aktive Sezernierung von Kalzium durch Tubuluszellen führt dazu, dass das Löslichkeitsprodukt von Kalzium- und Oxalationen überschritten wird, eine übersättigte Lösung entsteht und Kalziumoxalat als Feststoff auskristallisiert (Abb. 44). Einzelne Kristalle adhäreren an der luminalen Membran renaler Tubuluszellen indem sie an Annexin A2 oder CD44 binden. Damit stellen sie immobile Nuklei für die Bildung größerer polykristalliner Strukturen dar, die das Tubuluslumen zu obstruieren und die Nieren akut oder dauerhaft zu schädigen vermögen^[180].

Im Modell der akuten Oxalatnephropathie spielt dieser Mechanismus vermutlich auch eine Rolle, wenn auch eine untergeordnete. Hier wird das gesamte Nierenparenchym in kürzester Zeit mit Oxalationen übersättigt. Die ausfallenden Kristalle finden sich dabei vermehrt im Interstitialraum und nicht im tubulären Lumen, weshalb hier Zelltod und Entzündung als Pathomechanismen im Vordergrund stehen.

Das Modell der chronischen Oxalatnephropathie hingegen induziert eine langsamere Übersättigung mit Oxalationen, die mehrere Tage bis eine Woche dauern kann. Das über das Futter aufgenommene Natriumoxalat wird im Darm resorbiert und in den Nieren aus dem Blut frei filtriert. Die Überschreitung des Löslichkeitsproduktes von Kalzium- und Oxalationen findet daher primär im tubulären Lumen statt. Anders als beim akuten Modell sorgt die Fütterung mit einer Natriumoxalatangereicherten Diät für eine konstante Exposition, sodass die zu einem Zeitpunkt entstandenen Kristalle nicht mehr verschwinden, sondern im Gegenteil weiter wachsen können. Auch hier kommt jedoch das zytotoxische Potential der CaOx-Kristalle zum tragen und verursacht immunogenen

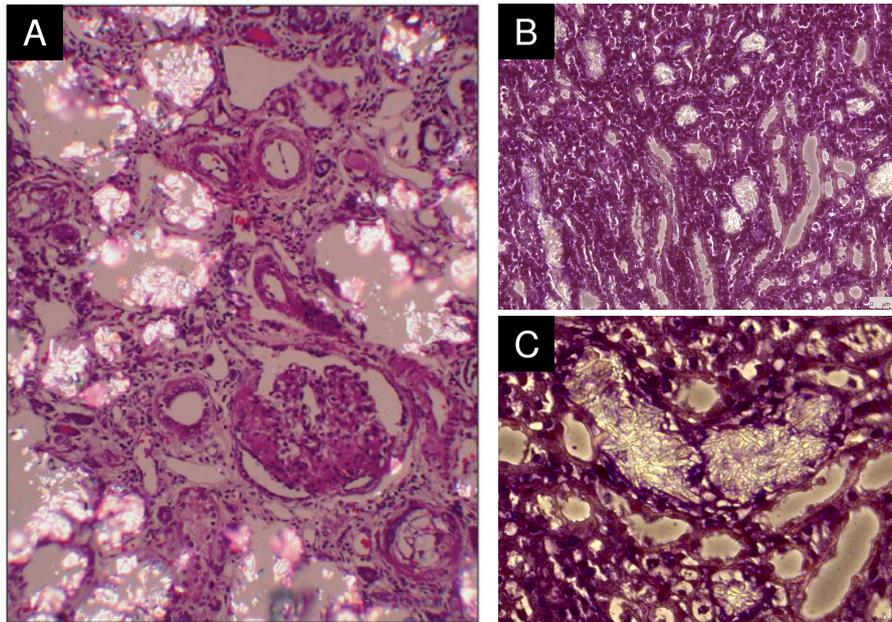


Abbildung 44: Kalziumoxalat-induzierte Nephrokalzinose in Mensch und Maus. (A-C) CaOx-Kristalle, die durch Phasenkontrastmikroskopie in Formalin-fixierten Nierenschnitten sichtbar gemacht werden können, lagern sich an der luminalen Seite der Tubuli an und obstruieren ganze Tubulusquerschnitte. (A) Nierenbiopsie eines Patienten mit Nephrokalzinose (aus^[128]). (B&C) Nephrokalzinose in C57BL/6N Mäusen nach 3 Wochen Oxalat-reicher Diät.

Zelltod und Entzündung, welche die Verschlechterung der Nierenfunktion im Verlauf beschleunigen. Ptx3 wird nicht nur von Immunzellen, sondern auch von renalen Tubuluszellen exprimiert^[124,193]. Wie in Kapitel 1.5 erwähnt, fungiert Ptx3 vielfach als Opsonin und bindet eine Reihe von DAMPs, darunter z.B. Histone, die bei Formen des nicht-apoptotischen Zelltods frei werden und selbst zytotoxisch sind. Auch ist nicht auszuschließen, dass Ptx3 mit Oxalatkristallen direkt interagiert.

Die Rolle, die Ptx3 in diesem Pathomechanismus summa summarum spielen könnte, war schwer abzuschätzen. Nach Meinung des Autors standen die folgenden drei möglichen Effekte zur Diskussion: (A) Ptx3 fungiert als CaOx-Kristalle-Opsonin und beeinflusst die Kristallaggregation und -deposition. (B) Die Kristalldeposition ist nicht verändert, Ptx3 neutralisiert bei nekrotischem Zelltod frei werdende DAMPs, wie z.B. Histone und beeinflusst damit den Schädigungsgrad. (C) Die Kristalldeposition und der resultierende Zellschaden sind nicht verändert, dafür moduliert Ptx3 die Infiltration von Immunzellen in das geschädigte Gewebe.

Zur Untersuchung dieser Fragestellungen sollten *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Mäuse über die Dauer von 3 Wochen mit Natriumoxalat-reicher Diät gefüttert und Kristalldeposition, Nierenschädigung, exkretorische Nierenfunktion und Immunzellrekrutierung im Verlauf untersucht werden (Abb. 45).

In einer vorangegangenen Studie, die der Autor der vorliegenden Arbeit in Zusammenarbeit mit Herrn Shrikant Mulay durchgeführt hat, wurde der Frage nachgegangen, in welchen der gängigen Mausstämmen das chronische Oxalatmodell induzierbar ist. Dazu wurden männliche und weibliche Tiere der Stämme C57BL/6N, BALB/c und CD-1 für 3 Wochen entweder mit Kontroll- oder Oxalatdiät gefüttert. Die nach Beendigung des Versuchs angestellten Analysen befassten sich mit dem Ausmaß der CaOx-Kristalldeposition, der exkretorischen Nierenfunktion und dem Nierengewicht.

Nur in BALB/c Männchen sowie C57BL/6N Männchen und Weibchen führte die Fütterung mit Oxalat zu einer Kristalldeposition (Abb. 46A&B), parenchymalem Schaden (Abb. 46C&D) und einer Einschränkung der exkretorischen Nierenfunktion (Plasmakreatinin- und Stickstoff-Harnstoff-

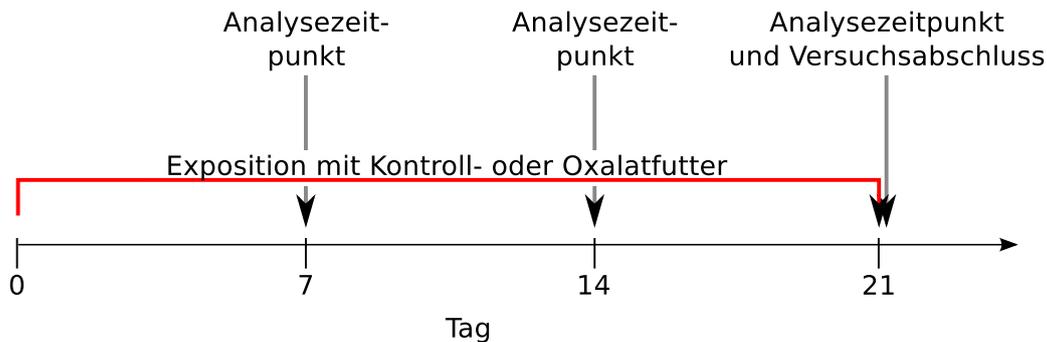


Abbildung 45: Versuchsanordnung zur Generierung einer Hyperoxalurie-induzierten Nephrokalzinose.

Tag 0: Urinabnahme und GFR-Messung, Start der Exposition mit Spezialfutter. Tag 7 und 14: GFR-Messungen, teilweiser Versuchsabschluss für histologische Untersuchungen und Durchflusszytometrie. Tag 21: Urinabnahme und GFR-Messung, endgültiger Versuchsabschluss durch zervikale Dislokation und Entnahme der Nieren zur weiteren Prozessierung.

Clearance, Abb. 46E&F). Frau Stefanie Steiger, ebenfalls Teil der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Anders, führte den gleichen Versuch auch für Tiere des Hintergrunds 129/SV durch und konnte weder Kristalldeposition noch Nierenfunktionseinschränkung beobachten (Daten nicht gezeigt). Welche Unterschiede zwischen den Geschlechtern und Hintergründen dazu führen, dass sich aus einer Hyperoxalurie eine Nephrokalzinose entwickelt, ist nach Wissen des Autors bis dato ungeklärt. Entscheidend für die Hypothese des geplanten Experiments mit *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Mäusen war an dieser Stelle, dass auf Grund des gemischten 129/SV-C57BL/6-Hintergrunds der Tiere nicht zwingend mit einer erfolgreichen Modellinduktion, also einer CaOx-Kristalldeposition, zu rechnen war.

Die CaOx-Kristalldeposition hängt primär von der Exposition der Tiere mit Oxalat ab. Den Mäusen beider Genotypen stand das Oxalat-reiche Futter für die Dauer des Experimentes ad libitum zur Verfügung, dennoch kann nicht zwangsläufig von einer vergleichbaren Futteraufnahme ausgegangen werden. Ein etabliertes Verfahren zur Überprüfung der Exposition mit Oxalat ist die kolorimetrische Bestimmung von Oxalsäure in angesäuertem Urin (Hyperoxalurie). Die Fütterung von *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Tieren mit Oxalat-reicher Diät für 3 Wochen führte in beiden Genotypen zu erhöhten Oxalsäureleveln im Urin. Zwischen den Gruppen lies sich hingegen kein Unterschied feststellen (Abb. 47A).

Trotz gleicher Exposition der Nieren der *Ptx3^{+/+}* Tiere zeigten nur *Ptx3^{-/-}* Mäuse den erwarteten Phänotyp progredienter Deposition von CaOx im Verlauf des Experimentes (Abb. 47B&C). Dieser Befund zeigt deutlich, dass endogenes Ptx3 eine entscheidende Rolle in der Ausbildung einer Nephrokalzinose bei Hyperoxalurie spielt. Der Frage, warum die *Ptx3^{+/+}* Tiere keine Kristalldeposition trotz Hyperoxalurie zeigen, wurde nicht detailliert nachgegangen. Basierend auf den Daten von Abb. 46 ist jedoch anzunehmen, dass der gemischte 129/SV-C57BL/6-Hintergrund, ähnlich wie 129/SV und CD-1 Tiere, nicht empfänglich für CaOx-induzierte Nephrokalzinosen ist.

Die *Ptx3^{-/-}* Tiere zeigten eine zunehmende Schädigung des Nierenparenchyms (Abb. 48A&B), eine progrediente Entzündungsreaktion in Form von infiltrierenden Immunzellen (Abb. 48C) und eine abnehmende exkretorische Nierenfunktion (Abb. 48D) im Verlauf der Oxalat-Fütterung. Passend zu der fehlenden Nephrokalzinose in *Ptx3^{+/+}* Tieren waren alle erhobenen Parameter unauffällig und wiesen auf keine Nierenpathologie hin (Abb. 48A-D).

Nach 3 Wochen zeigten die Oxalat-gefütterten *Ptx3^{-/-}* Tiere eine signifikant erhöhte Expression von Acta2 im Nierenparenchym, was auf eine erhöhte Präsenz und Aktivität von Myofibroblasten

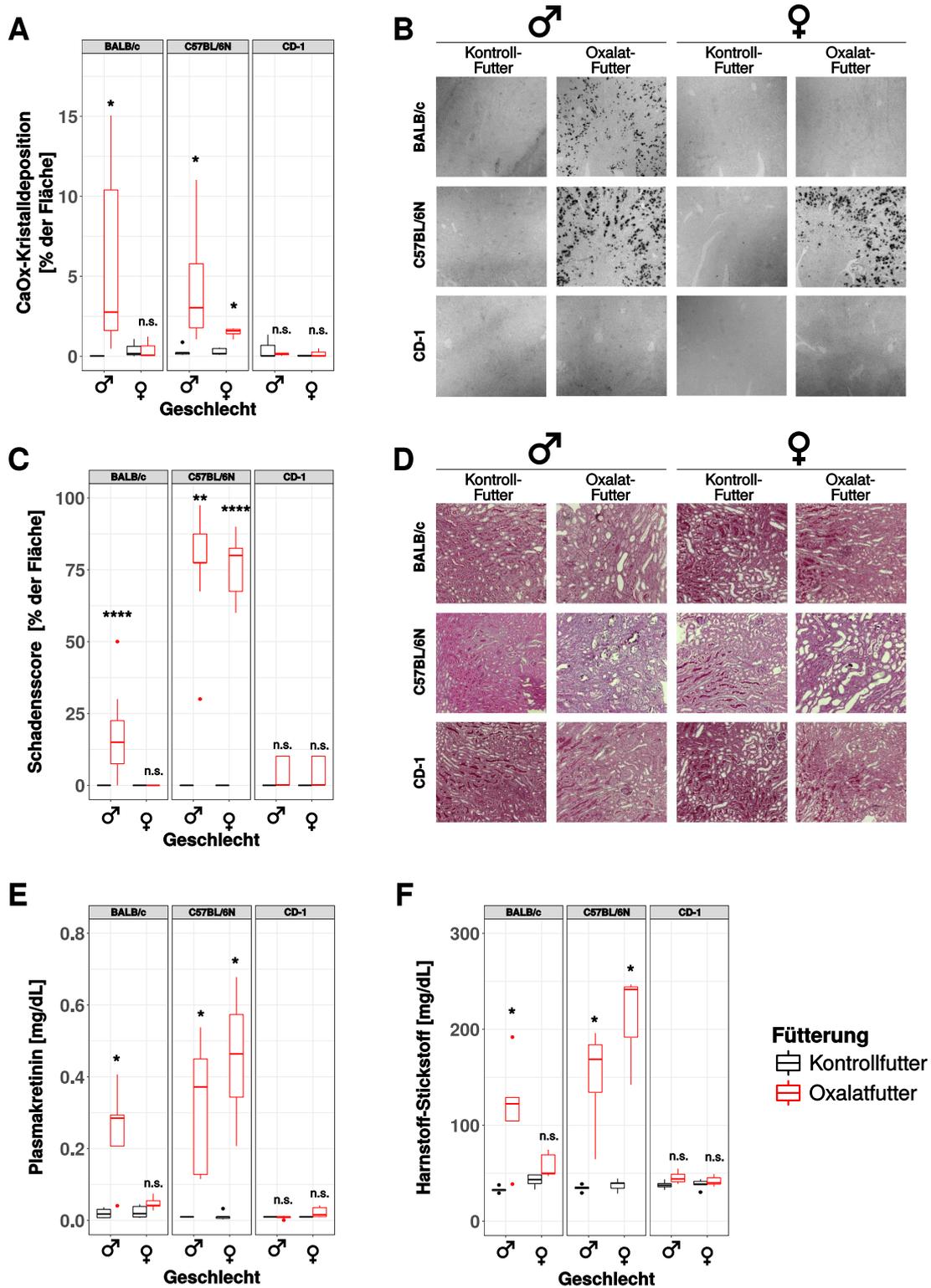


Abbildung 46: Renale CaOx-Kristalldeposition und Plasmakreatininlevel in verschiedenen Mausstämmen nach Oxalat-reicher Diät. Männchen und Weibchen der Mausstämmen BALB/c, C57BL/6N und CD-1 wurden im Alter von 7-8 Wochen für 3 Wochen mit Kontroll-Futter oder Oxalat-reicher Diät gefüttert. Nach Versuchsende wurden CaOx-Kristalldeposition in den Nieren (A) auf Basis der Pizzolato-Färbung (B), parenchymale Schädigung (C) an Hand von PAS-Färbungen (D) und die exkretorische Nierenfunktion anhand von Plasmakreatinin (E) und Stickstoff-Harnstoff (F) bestimmt. Dargestellt sind Daten aus einem Experiment mit je 5 Tieren pro Mausstamm und Geschlecht. Es sind nur statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Oxalat-Futter behandelten Tieren innerhalb eines Stammes und Geschlechts angegeben.

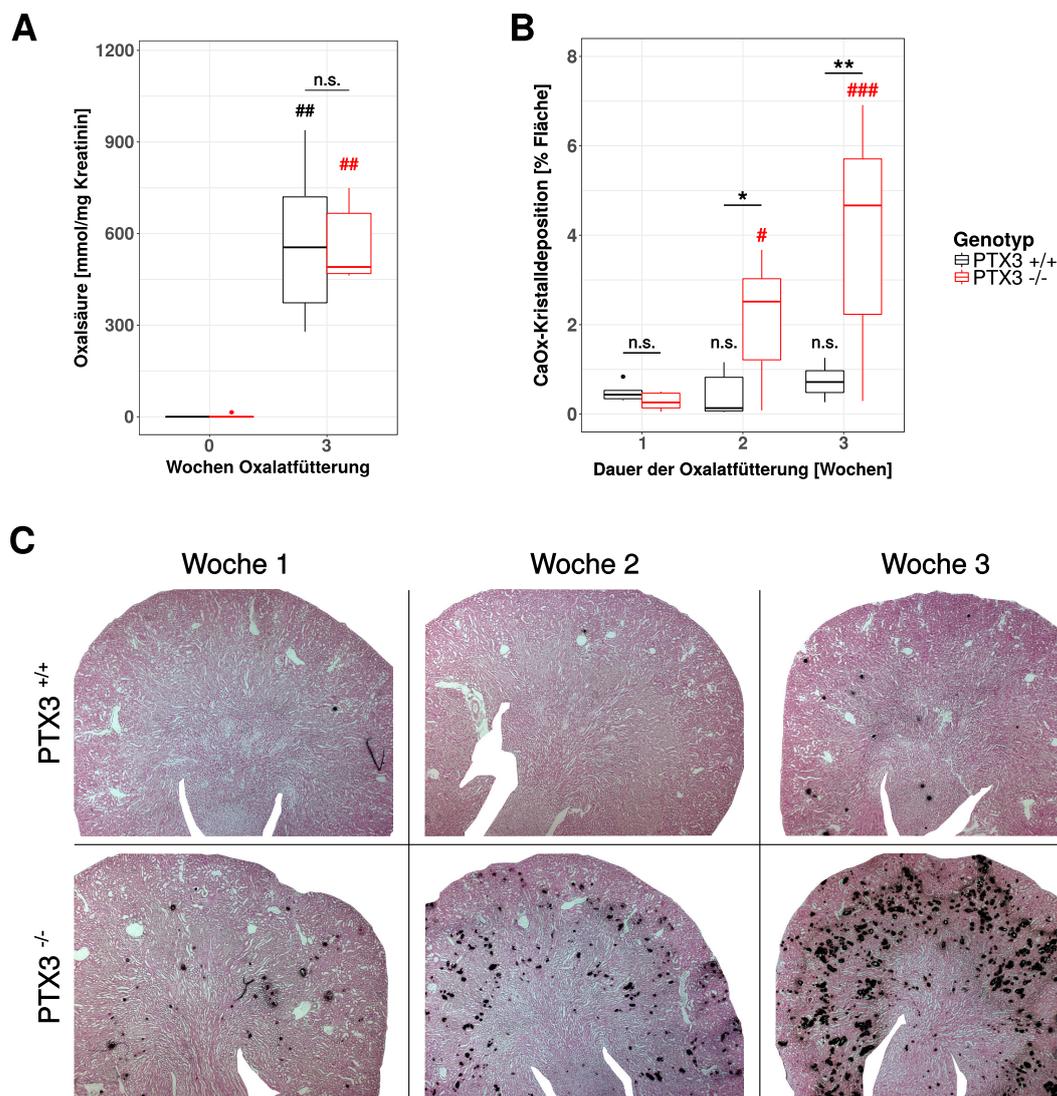


Abbildung 47: Renale CaOx-Kristalldeposition in *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tieren bei Hyperoxalurie. *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Mäuse wurden für 3 Wochen mit Oxalat-reicher Diät ad libitum gefüttert. (A) Oxalsäurelevel im Urin der Tiere vor Beginn und am Ende des Experiments. (B) CaOx-Kristalldeposition in den Nieren der Tiere 1,2 und 3 Wochen nach Beginn der Fütterung quantifiziert auf Basis der in (C) repräsentativ dargestellten und für Kalziumoxalat nach Pizzolatos Methode gefärbten Paraffin-Nierenschnitte. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimente mit insgesamt 9 Tieren pro Zeitpunkt (10-12 Wochen, weiblich). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen einem Beprobungszeitpunkt und dem Referenzzeitpunkt innerhalb eines Genotyps sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tieren zu einem bestimmten Zeitpunkt mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

hindeutet (Abb. 49A&B), ein typisches Zeichen für chronisches Nierenversagen (CNV). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Defizienz von Ptx3 in diesem speziellen Mausstamm unter hyperoxaluren Bedingungen für die Entwicklung einer Nephrokalzinose und CNV ausschlaggebend ist.

Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wäre zunächst ein Experiment denkbar in dem C57BL/6N Tiere mit Oxalat-reicher Diät gefüttert und gleichzeitig mit rhPTX3 oder PBS therapiert werden. Gegen dieses Design sprechen zwei Argumente: Zum einen wäre auf Grund der Dauer des Experiments von 3 Wochen (bis zur Ausbildung eines CNV) der Bedarf an rekombinantem Protein jenseits dessen, was sich im Rahmen dieses Projekts bereitstellen ließe. Zum anderen ist das PTX3-Oktamer ca. 340 kDa groß, sodass es nicht frei aus dem Blut gefiltert und im tubulären Lumen ankommen würde.

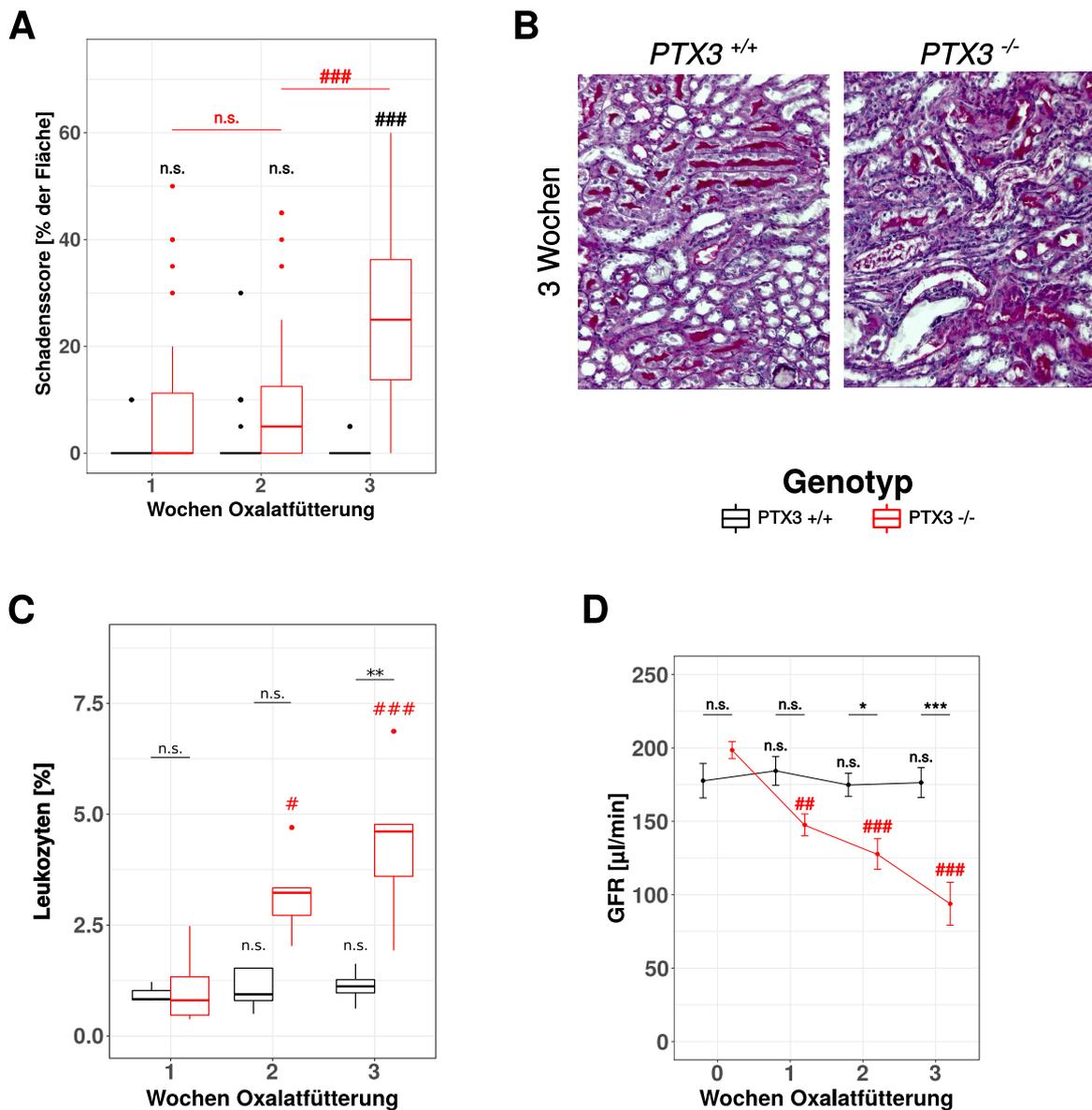


Abbildung 48: Phänotypisierung der Nierenpathologie bei *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tieren im Verlauf bei Hyperoxalurie. (A) Schadensscore des kortikalen und medullären Nierensegments im Verlauf auf Basis der in (B) exemplarisch für Woche 3 dargestellten PAS-Färbungen. (C) Durchflusszytometrisch bestimmte Leukozyteninfiltration und (D) transkutan bestimmte glomeruläre Filtrationsrate im Verlauf. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimente mit insgesamt 9 Tieren pro Zeitpunkt (10-12 Wochen, weiblich). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen einem Beprobungszeitpunkt und dem Referenzzeitpunkt innerhalb eines Genotyps sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tieren zu einem bestimmten Zeitpunkt mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

Denkbar wäre auch die Verwendung einer Mauslinie, die *Ptx3* überexprimiert^[69,244], allerdings ist diese bisher nur im CD-1 Hintergrund verfügbar und damit für diesen Versuch ungeeignet.

Somit blieb zunächst nur, die *Ptx3*-Proteinexpression bei Hyperoxalurie *in vivo* zu untersuchen. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene anti-*Ptx3*-Antikörper und Fixierungsmethoden getestet, um die Proteinexpression *in vivo* sichtbar zu machen. Da diese Versuche ohne Erfolg blieben wurden Paraformaldehyd-fixierte und kryokonservierte Nieren von *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tieren, die für 3 Wochen entweder Kontroll- oder Oxalat-Futter erhalten hatten, verblindet an Cecilia Garlanda und Alberto Mantovani übergeben. Deren Arbeitsgruppe entwickelte einen eigenen Antikörper und ein optimiertes Färbeprotokoll, das spezifische Ergebnisse liefert (Abb. 50B). Die

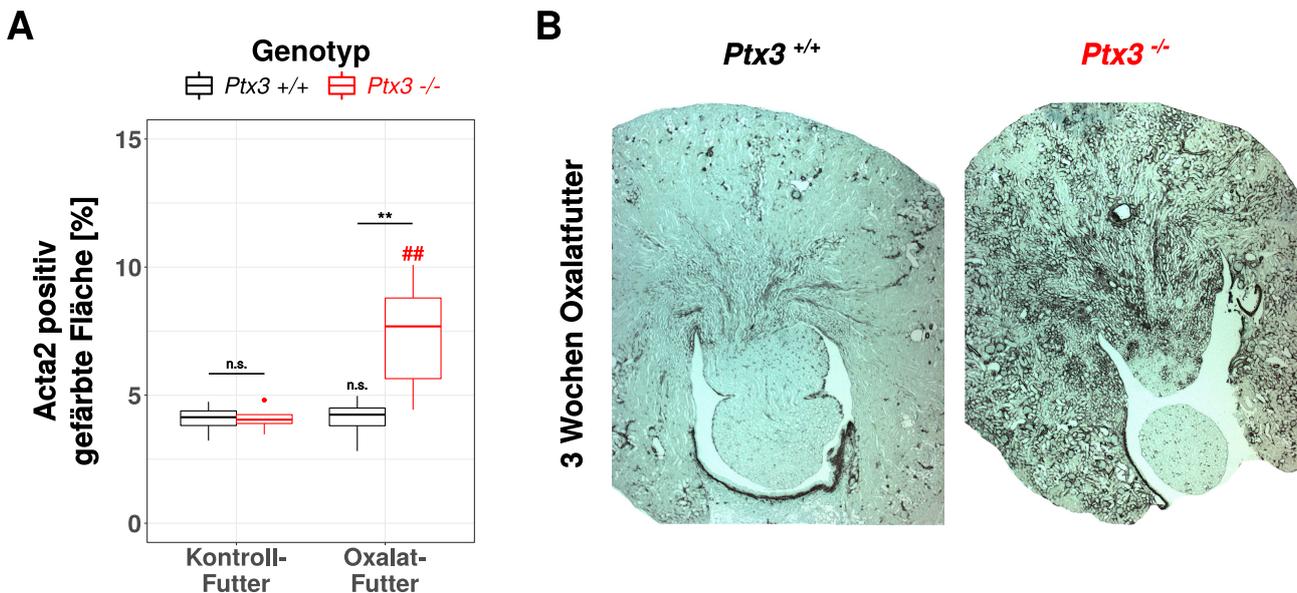


Abbildung 49: Nierenfibrosierung in $Ptx3^{+/+}$ und $Ptx3^{-/-}$ Tieren bei Hyperoxalurie. (A) Quantifizierung der in (B) exemplarisch dargestellten immunhistochemischen Acta2-Färbungen der Nieren von $Ptx3^{+/+}$ und $Ptx3^{-/-}$ Mäusen 3 Wochen nach Beginn der Exposition mit Kontroll- oder Oxalat-Futter. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 9 Tieren pro Zeitpunkt (10-12 Wochen, weiblich). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen einem Beprobungszeitpunkt und dem Referenzzeitpunkt innerhalb eines Genotyps sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen $Ptx3^{+/+}$ und $Ptx3^{-/-}$ Tieren zu einem bestimmten Zeitpunkt mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

gefärbten Schnitte wurden zurückgesandt und durch den Autor dieser Arbeit befundet und ausgewertet (Abb. 50A). Die Ergebnisse zeigen, dass Ptx3 in Wildtyptieren des gemischten 129/SV-C57BL/6N-Hintergrunds nach Exposition mit Oxalat-Futter in den renalen Tubuluszellen sehr deutlich hochreguliert wird. Die $Ptx3^{-/-}$ Tiere zeigten entsprechend kein Signal. Bei einer direkten Interaktion zwischen Ptx3 und den im tubulären Lumen präsenten CaOx-Kristallen wäre auch denkbar, dass sich das Protein im Urin nachweisen ließe, was die Ergebnisse der Färbung stützen würde. Tatsächlich war Ptx3 unter physiologischen Bedingungen im Urin von $Ptx3^{+/+}$ Tieren per Western Blot nicht nachweisbar, konnte nach 3 Wochen Oxalat-Fütterung allerdings zweifelsfrei detektiert werden (Abb. 50C&D). Als Ladekontrolle für das Gesamturinprotein diente hier nach dem Vorbild von Jaillon et al.^[119] die Ponceau Red Färbung von a2u-Globulinen.

Zusammengenommen mit der fehlenden Kristalldeposition in hyperoxaluren $Ptx3^{+/+}$ Mäusen bestätigen diese Ergebnisse, dass Ptx3 eine aktive Rolle im Pathomechanismus der Nephrokalzinose einnimmt. Hinsichtlich eines Erklärungsversuches für den zugrundeliegenden Mechanismus rückte die Hypothese, dass Ptx3 als Opsonin für CaOx-Kristall fungiert, in den Vordergrund.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurde ein *in chemico*-Experiment durchgeführt, in dem die Wirkung von rhPTX3 auf die Größe von CaOx-Kristallen untersucht wurde. Die Generierung von CaOx-Kristallen *in chemico* unter verschiedenen Bedingungen wurde detailliert u.a. bei Thongboonkerd et al.^[261] und Chaiyarit et al.^[42] beschrieben. Basierend auf diesen Arbeiten wurde ein Protokoll entwickelt, dass die Generierung von mikroskopisch gut differenzierbaren CaOx-Kristallen ermöglicht (siehe Kap. 3.7). In Kürze, 10 mM NaC_2O_4 wurde mit 100 pm bis 10 μM rhPTX3 oder gleichem Volumen PBS homogen gemischt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde zu allen Ansätzen 1 mM CaCl_2 gegeben und die Lösung für weitere 24 h bei 4 °C inkubiert. Die Bestimmung der Kristallgröße erfolgte per Aufnahme lichtmikroskopischer Bilder und der Kristall-

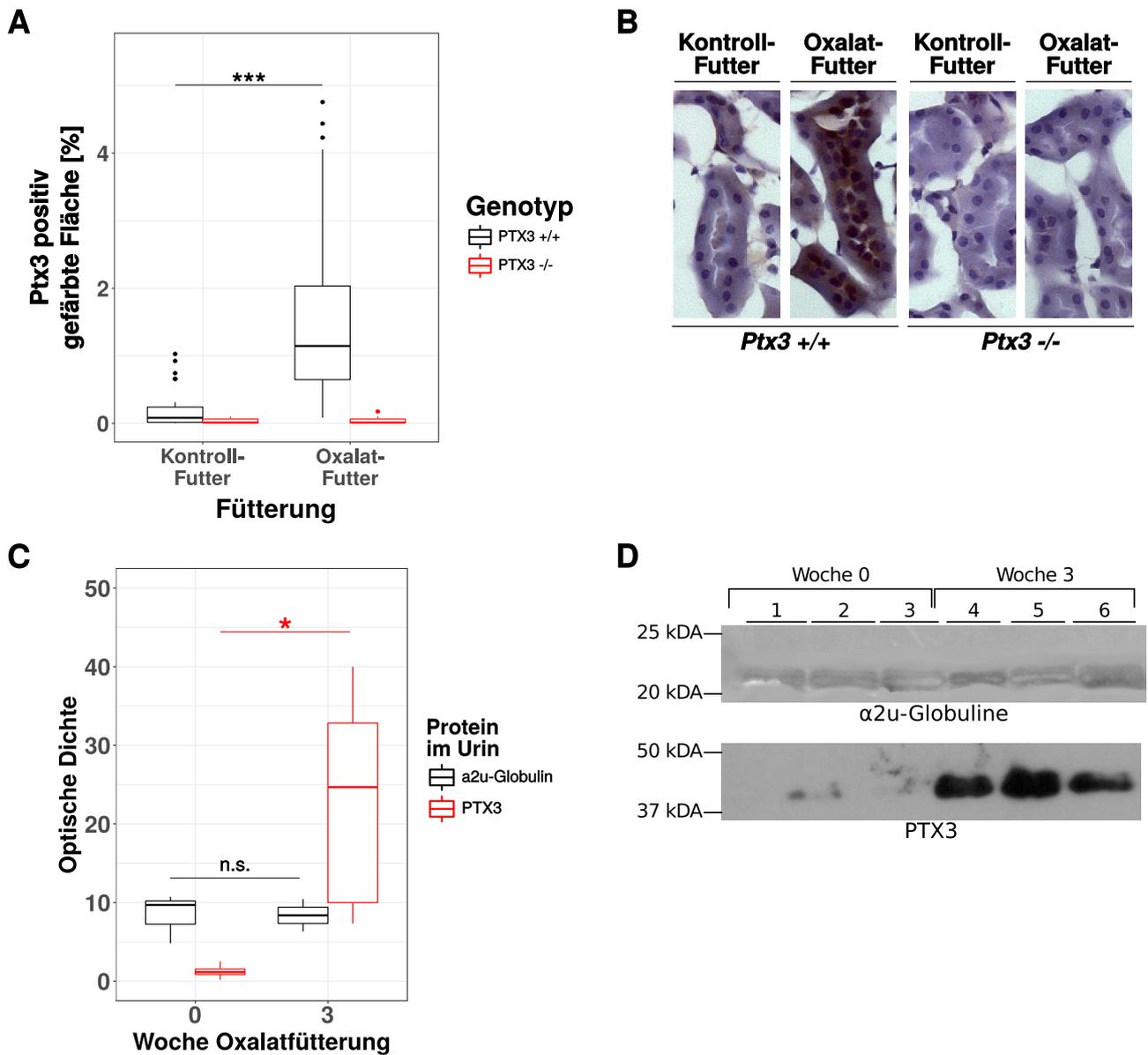


Abbildung 50: Ptx3-Proteinexpression bei Hyperoxalurie in *Ptx3*^{+/+} Tieren. Weibliche *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tiere im Alter von 10-12 Wochen wurden für 3 Wochen mit Oxalat- oder Kontroll-Futter gefüttert (n=5). Die Nieren wurden nach dem in Kap. 3.3.2 beschriebenen Protokoll für Ptx3 gefärbt: (A) Semiquantitative Auswertung der in (B) exemplarisch dargestellten Nierenschnitte. Vor Beginn und am Ende der Oxalat-Fütterung von 6 weiblichen *Ptx3*^{+/+} Mäusen im Alter von 10-12 Wochen wurde Urin abgenommen und wie in 3.1.10 beschrieben aufbereitet: (C) Quantifizierung der optischen Dichte von anti-Ptx3-gefärbten Western Blots für Ptx3 und der a2u-Globulin-Ladekontrolle (siehe Kap. 3.5.3) aus 2 unabhängigen Analysen und (D) repräsentative Darstellung eines Blots.

flächenberechnung per ImageJ. Abbildung 51 A zeigt, dass rhPTX3 *in chemico* die Größe der sich bildenden CaOx-Kristalle dosisabhängig reduziert. Um zu zeigen, dass es sich dabei nicht um einen unspezifischen Effekt der höher konzentrierten Proteinlösung z.B. auf Grund veränderter Viskosität handelt^[90], wurde der Effekt von 10 µM bovinem Serumalbumin (BSA) mit dem von 10 µM rhPTX3 in einem weiteren Experiment direkt verglichen (Abb. 51B). Dabei bestätigte sich, dass rhPTX3 die Größe der CaOx-Kristalle signifikant zu verkleinern vermag, äquimolares BSA hingegen nicht. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse mit einer anderen Methodik wurden rhPTX3- und BSA-haltige Kristallsuspensionen auch durchflusszytometrisch untersucht. Hier diente die Signalstärke des Forward

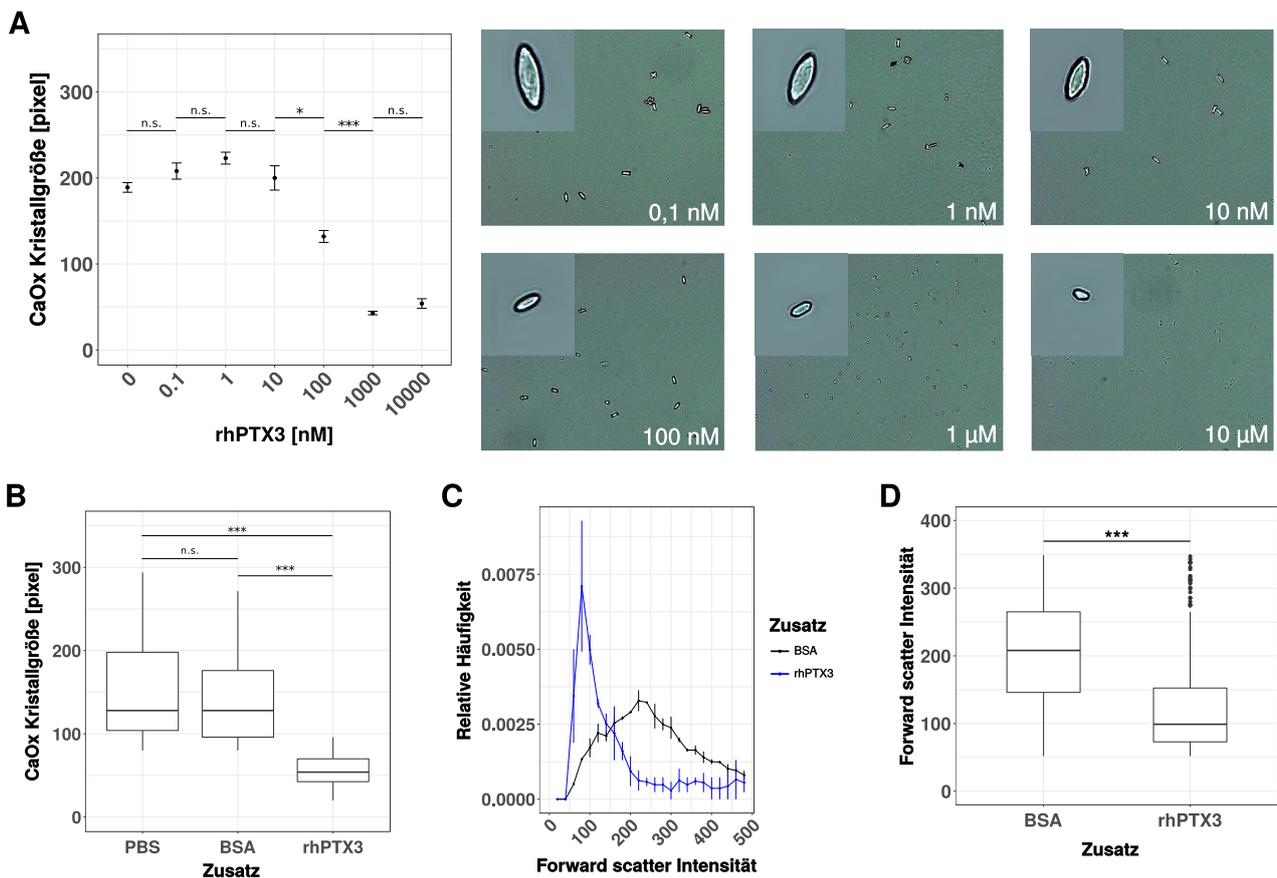


Abbildung 51: *In chemico* Inhibierung der Kristallisation von CaOx durch rhPTX3. CaOx-Kristalle wurden wie in Kap. 3.7 beschrieben hergestellt. (A) Quantifizierung der Kristallgrößen mit ImageJ nach Zugabe aufsteigender Konzentrationen von rhPTX3 an Hand von durchlichtmikroskopischen Aufnahmen. Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten. (B-D) Der Effekt von 10 μ M rhPTX3 auf die Kristallgröße wurde (B) durchlichtmikroskopisch und (C) durchflusszytometrisch mit äquimolarem BSA verglichen. (C) Relative Häufigkeit gemessener FSC-Intensitäten von Kristallpräparationen mit BSA oder rhPTX3. (D) Quantifizierung der in (C) dargestellten Ergebnisse. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten.

scatter (FSC) als Maß für die Partikelgröße. Die Histogramme in Abbildung 51C zeigen, dass der Einsatz von rhPTX3 zu einer deutlichen Verschiebung der annähernd normalverteilten (BSA) zu einer rechtsschiefen/ linkssteilen (rhPTX3) Verteilung führt. Dieser Befund zeigt sich in der Quantifizierung der FSC-Verteilung als statistisch signifikant (51D).

Der genaue Mechanismus der Kristallisationsinhibierung bleibt an dieser Stelle noch unklar. Denkbar wäre jedoch, dass rhPTX3 sich an kleine Kristalle anlagert - ähnlich einem Opsonin - und das weitere Wachstum der Kristalle durch Anlagerung von weiterem CaC_2O_4 dadurch unterbindet. Somit blieben die Kristalle bei einer bestimmten Größe stehen und wären durch rhPTX3 gleichsam maskiert. Der Beweis für diese Hypothese ist allerdings nicht erbracht.

Damit sich *in vivo* größere Kristallkonglomerate bilden können, die das tubuläre Lumen obstruieren bzw. die Tubuluszellen schädigen, ist die Bindung kleiner Kristalle an Adhäsionsmolekülen entscheidend. Dabei handelt es sich bei Tubuluszellen vor allem um die Oberflächenmoleküle Annexin 2 und CD44, deren Expression bei Kontakt mit CaOx-Kristallen hochreguliert wird^[180]. Der oben angeführten Hypothese folgend wäre anzunehmen, dass Kristalle, die mit Ptx3 opsoniert wurden, die Tubuluszellen nicht zur Expression von Annexin 2 und CD44 veranlassen, da ihre Reaktivität deutlich herabgesetzt wurde.

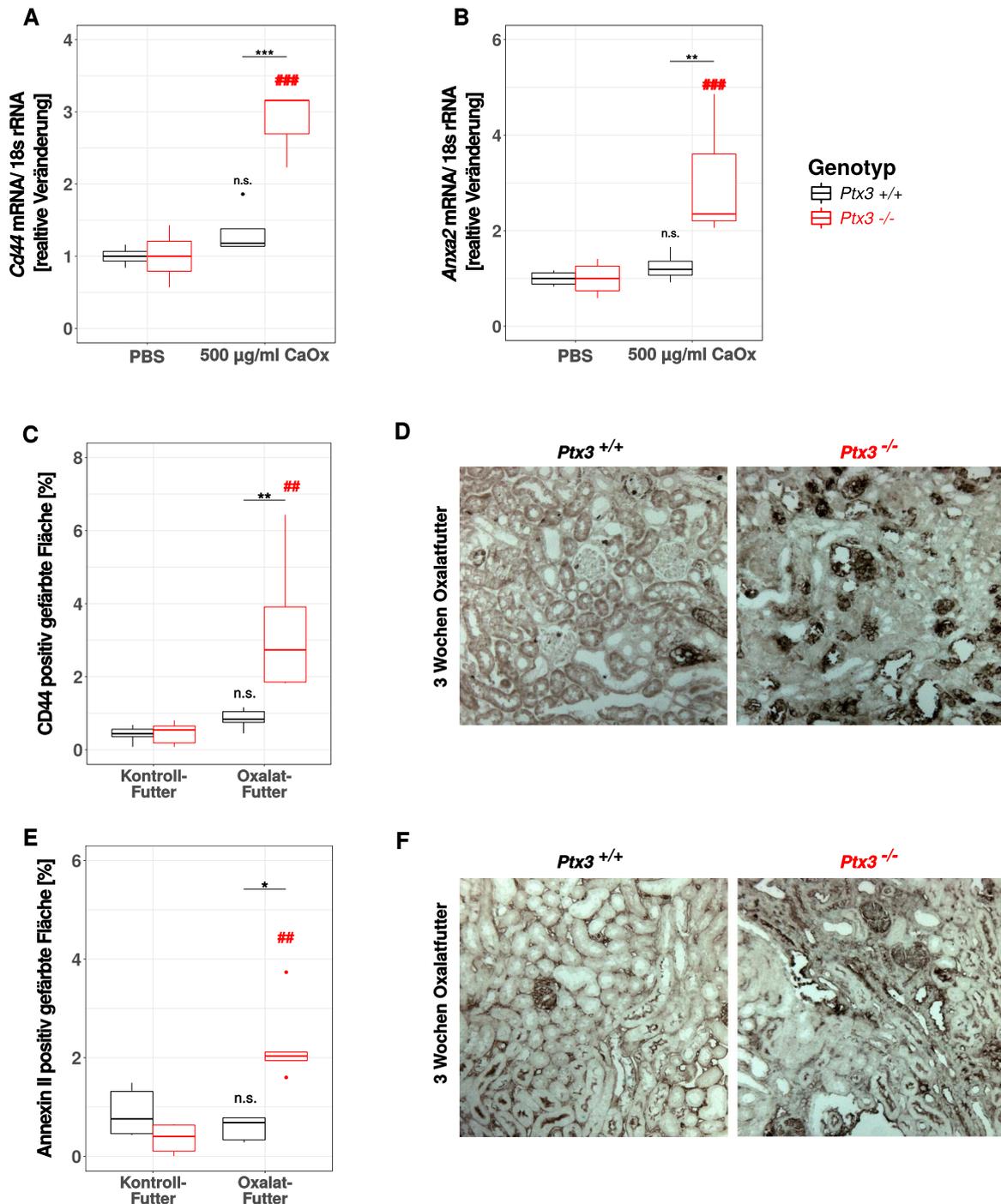


Abbildung 52: Expression von Adhäsionsmolekülen in *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tubuluszellen *in vitro* und *in vivo* nach Oxalat-Stimulation. (A-B) Primäre proximale Tubuluszellen wurden aus den Nieren von 3-4 Wochen alten *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Mäusen isoliert und für 24 h mit 500 µg/ml CaOx-Kristallen stimuliert. Die mRNA-Expression von (A) *Cd44* und (B) *Anxa2* wurde mittels qPCR in 4 unabhängigen Experimenten bestimmt. (C-F) Jeweils 6 *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tiere (weiblich, 10-12 Wochen alt) wurden für 3 Wochen mit Kontroll- oder Oxalatdiät gefüttert und ihre Formalin-fixierten Nierenschnitte mittels Immunhistochemie für die Expression von CD44 (C-D) und Annexin II (E-F) untersucht. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Interventionen sind mit Rauten (#), Unterschiede zwischen *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

Zur Untersuchung der Expression dieser Oberflächenmoleküle in Abhängigkeit von Kristallexposition und der Rolle von Ptx3 wurden aus 3-4 Wochen alten *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Mäusen primäre proximale Tubuluszellen isoliert und *in vitro* für 24 h mit CaOx-Kristallen stimuliert (siehe Kap. 3.6). Die Kristallkonzentration von 500 µg/ml ist so gewählt, dass die Zellen flächendeckend mit CaOx in

Berührung kommen ohne die Viabilität einzuschränken. Nach Isolation der Gesamt-RNA, RT-PCR und qPCR für *Cd44* und *Anxa2* wurde deutlich, dass nur *Ptx3*^{-/-} Tubuluszellen mit einer Hochregulation der Adhäsionsmoleküle auf die Stimulation mit CaOx reagierten, während sich die Expression in *Ptx3*^{+/+} Zellen gegenüber der PBS-Kontrolle nicht veränderte. Der Befund lässt die Vermutung zu, dass die Tubuluszellen der *Ptx3*^{+/+} Tiere nach Stimulation mit den CaOx-Kristallen vermehrt Ptx3 exprimierten, welches die Kristalle wiederum opsoniert und die Expression von *Cd44* und *Anxa* quasi vollständig unterbindet.

Dieselbe Beobachtung ließ sich in einem anschließenden Experiment *in vivo* anstellen, in dem *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Mäuse für 3 Wochen mit Oxalat- bzw. Kontrolldiät gefüttert wurden. Die immunhistochemische Färbung der entsprechenden Nierenschnitte für Cd44 und Anxa2 ergab eine starke Positivität beider Adhäsionsmoleküle nur in Oxalatfutter-behandelten *Ptx3*^{-/-} nicht aber in *Ptx3*^{+/+} Tieren.

Zusammengenommen konnte gezeigt werden, dass Ptx3 als CaOx-Kristallisationsinhibitor *in vivo* und *in chemico* fungiert. In dieser Funktion schützt er Mäuse unter hyperoxaluren Bedingungen vor der Ausbildung einer Nephrokalzinose und subsequentem chronischem Nierenversagen.

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des Akute-Phase-Proteins Ptx3 in dem weiter gefassten Kontext entzündlicher Nierenerkrankungen und unter Einbeziehung der Krankheitsdynamik im Zeitverlauf zu beschreiben. Die Hypothesen, die überprüft werden sollten, waren,

- (A) dass therapeutisch eingesetztes rhPTX3 nicht nur im Modell der rIRI^[151] sondern auch in anderen entzündlichen Nierenmodellen protektiv ist,
- (B) dieser Effekt letztlich nur bei Intervention in der akuten Schädigungsphase in Kraft tritt, während die therapeutische Intervention mit rhPTX3 in der Regenerationsphase nach der Schädigung ungünstige Effekte zeigt,
- (C) bei einem ebenfalls entzündlichen, chronisch verlaufenden Modell die Rolle von Ptx3 komplexer ist und andere immunmodulatorische Eigenschaften von Ptx3 jenseits seines Einflusses auf die Immunzellrekrutierung zum Tragen kommen.

Der Autor konnte zeigen, dass (A) therapeutisch eingesetztes rhPTX3 auch im Modell der akuten, entzündlichen Oxalatnephropathie protektiv wirkt, (B) ein verspäteter therapeutischer Einsatz von rhPTX3 in der Regenerationsphase nach IRI den Phänotyp verschlechtert und (C) endogenes Ptx3 unter hyperoxaluren Bedingungen als Kristallisations-inhibierendes Molekül fungiert.

5.1 PTX3 und Nekroinflammation

Die Kernhypothese der vorliegenden Arbeit fokussierte sich auf die P-Selektin-inhibierende Eigenschaft von Ptx3, die die Extravasation von Immunzellen in entzündetes Gewebe steuert (Abb. 53A1-3). Der profunde Einfluss der P-Selektin-abhängigen Rekrutierung von Immunzellen auf die Schädigung post-ischämischer Nieren konnte neben den Publikationen der Arbeitsgruppe Anders^[151] auch durch den therapeutischen Einsatz von löslichem Psgl-1^[252,82] oder einem monoklonalem anti-P-Selektin Antikörper^[284] in Ratten gezeigt werden. Beide, der Ligand sowie der Antikörper, dämmten die Extravasation von Leukozyten in die ischämisch geschädigten Nieren ein und verbesserten den Phänotyp. Diese Ergebnisse unterstreichen den signifikanten Beitrag der P-Selektin-Psgl-1-Signalkette im Pathomechanismus der rIRI und stützen die Hypothese, dass die Interaktion mit P-Selektin einen wichtigen Wirkmechanismus von Ptx3 darstellt.

Außer Acht gelassen darf dabei nicht werden, dass die immunmodulatorischen Eigenschaften von Ptx3 deutlich darüber hinausgehen. So begünstigt die Bindung von Ptx3 z.B. auf apoptotischen Zellen oder extrazellulärer Matrix die Rekrutierung von Negativregulatoren des Komplementsystems (Factor H, Factor H-related protein 5, C4b-binding protein^[65,33,56]), was zu einer Verringerung der Aktivität des humoralen Arms der angeborenen Immunreaktion bei entzündlichen Geschehen führt (Abb. 53B1-2)^[40]. Das Komplementsystem ist eine der treibenden Kräfte im Pathomecha-

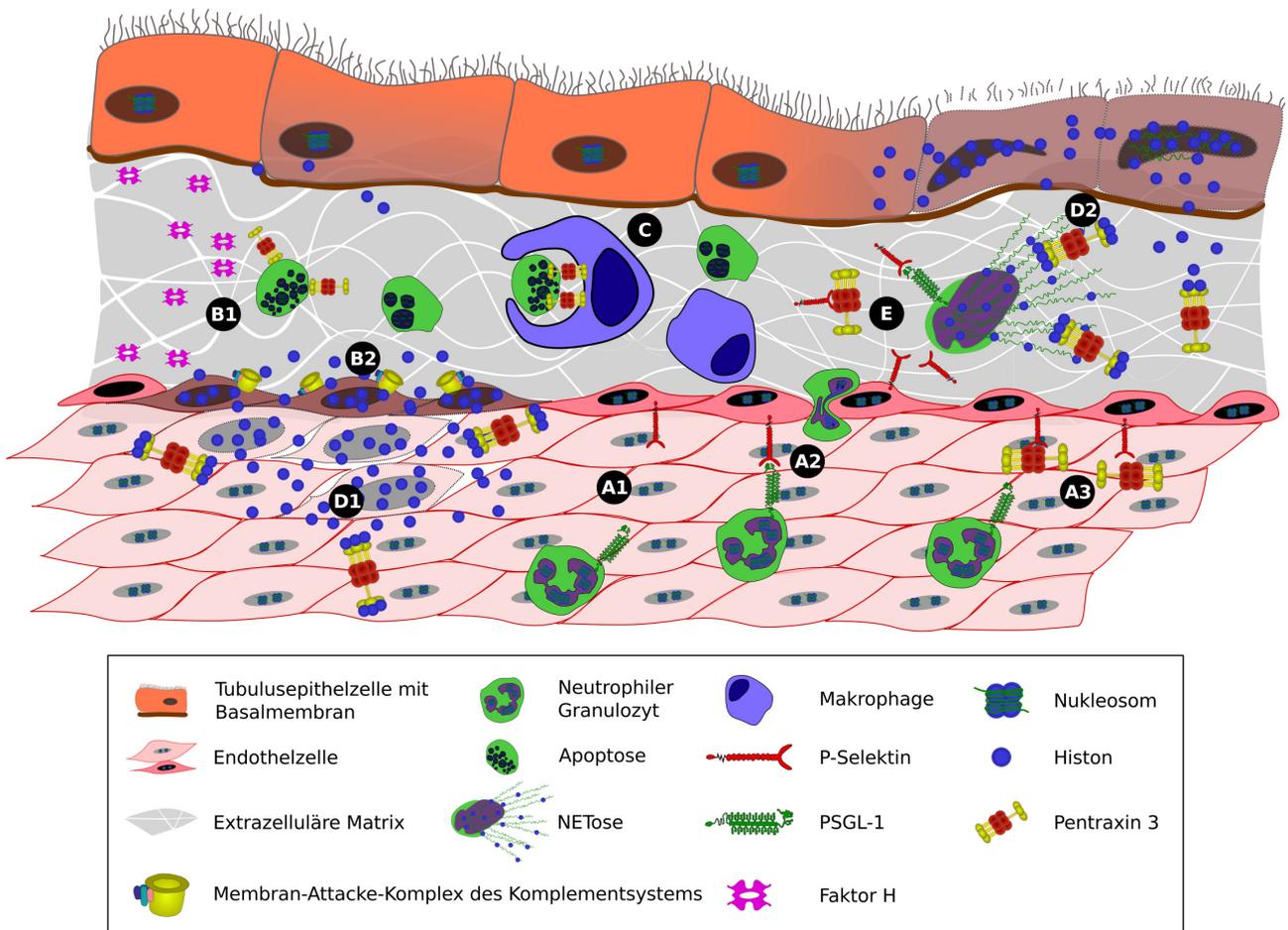


Abbildung 53: Wirkmechanismen von Ptx3 bei renaler Nekroinflammation. Nekroinflammation im Rahmen akuter Nierenschädigung schädigt sowohl Tubulus- als auch peritubuläre Endothelzellen. Ptx3 könnte an verschiedenen Pathomechanismen, die hier zusammenwirken, ansetzen. (A1-2) Der P-Selektin-Psgl-1-Signalweg vermittelt die Adhäsion von Neutrophilen und anderen Immunzellen und leitet die Extravasation in das renale Interstitium ein. (A3) Ptx3 kann diese Bindung blockieren. (B1) Die Bindung von Ptx3 an apoptotischen Neutrophilen vermittelt die Rekrutierung von Faktor H und anderen Negativregulatoren des Komplementsystems. (B2) Dies wirkt der Komplement-vermittelten Zellyse durch Membran-Attacke-Komplexe entgegen. (C) Ptx3 erleichtert die Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen durch Makrophagen. (D) Histone werden bei nicht-apoptotischem Zelltod von (D1) Endothel- und (D2) Epithelzellen freigesetzt. Extrazelluläre Histone sind zytotoxisch, sodass sich die Nekrose auf umliegendes Gewebe ausbreitet, und fungieren als DAMPs, sodass sie die Rekrutierung weiterer Immunzellen vermitteln. (D2) Histone werden auch von Neutrophilen bei der NETose in großem Umfang freigesetzt. Ptx3 ist in der Lage Histone zu neutralisieren. (E) Lösliches P-Selektin kann Neutrophile in die NETose treiben. Eine Sequestrierung des Selektins durch Ptx3 könnte diesem Prozess entgegenwirken.

nismus der rIRI^[62]. Somit ist davon auszugehen, dass Ptx3 auch an dieser Stelle Einfluss auf den Phänotyp nimmt.

Jaillon et al.^[118] konnten zeigen, dass Ptx3 bei apoptotischen Neutrophilen aktiv aus den zytosolischen Granuli an die Zelloberfläche transloziert und damit die Erkennung und Beseitigung der sterbenden Zellen durch Makrophagen erleichtert (Abb. 53C). Neutrophile sind mit die ersten Leukozyten, die nach einer akuten Tubulusnekrose in die Niere infiltrieren und den entzündlichen Kollateralschaden einleiten. Dieser Prozess dauert nur wenige Stunden, die Beseitigung toter Neutrophile kann jedoch mehrere Tage in Anspruch nehmen^[32], sodass auch hier anzunehmen ist, dass Ptx3 eine wichtige Rolle bei der Resolution der Entzündung spielt. In beiden Fällen handelt es sich ausdrücklich nur um Annahmen, die bisher noch nicht für die rIRI überprüft wurden.

Bei verschiedenen Formen des nekrotischen Zelltods, wie sie auch bei der renalen IRI auftreten^[160], werden zelluläre Bestandteile in den Extrazellularraum abgegeben^[268], die zum einen direkt für die Rekrutierung von Immunzellen^[173,174], zu anderen für die Ausweitung der Nekrose durch direkte Zytotoxizität sorgen können. Zu diesen Molekülen gehören z.B. Histone, deren profunder Beitrag zur Organschädigung bei Entzündung unter anderem auch im Modell der renalen IRI bewiesen werden konnte^[6,239,189]. Dabei werden Histone sowohl von nekrotischen renalen Endothel- und Epithelzellen als auch von Neutrophilen im Rahmen der NETose freigesetzt (Abb. 53D1-2). NETose beschreibt den Prozess der Freisetzung von de-kondensiertem Chromatin und zytosolischem Material aus Neutrophilen in Form netzartiger Strukturen, den sog. NETs (neutrophil extracellular traps)^[9]. Das Auftreten von NETs bei renaler IRI und ihre Rolle im Pathomechanismus, u.a. durch die Freisetzung von Histonen, konnte in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden^[189,123]. Daigo et al.^[60] lieferten den Beweis, dass Ptx3 die zytotoxischen Effekte von extrazellulären Histonen in einem experimentellen Sepsismodell neutralisiert, in dem es mit Histonen co-aggregiert. Auch wenn dieser Effekt für renale IRI bisher nicht gezeigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass Ptx3 auch mit diesem Aspekt des Pathomechanismus interagiert und protektiv wirken kann, sei es im vaskulären, interstitiellen oder tubulären Kompartiment (Abb. 53D1-2). Fraglich ist jedoch, ob dieser Prozess eine so große biologische Relevanz hat, dass ein messbarer Effekt auf einen pathophysiologischen Phänotyp zu beobachten wäre, und ob dieser Effekt von anderen, wie z.B. der Blockade von P-Selektin-Bindungsstellen und deren Folgen, differenzierbar wäre.

Ein weiteres Zusammenspiel der verschiedenen Mechanismen mit einer möglichen Rolle von Ptx3 ergibt sich aus der Beobachtung, dass Membran-ungebundenes P-Selektin NETose induzieren kann^[76]. Eine Interaktion zwischen Ptx3 und der löslichen Form des Adhäsionsmoleküls wurde nach Wissensstand des Autors bisher in der Literatur nicht beschrieben, ist auf Grund der wiederholt positiven Befunde mit gebundenem P-Selektin allerdings stark anzunehmen^[66,151]. So ist vorstellbar, dass Ptx3 lösliches P-Selektin abfängt und NETose bzw. NETose-vermittelte Zellnekrosen zu unterbinden hilft (Abb. 53E).

Zelltod und Entzündung sind zwei Prozesse, die einander bedingen^[277], sich aber vor allem gegenseitig verstärken können. Dieser Verstärkungsmechanismus wird Nekroinflammation genannt^[183] und beschreibt, dass die bei verschiedenen Arten von nekrotischem Zelltod frei werdenden DAMPs (z.B. Histone) Zelltod und Immunzellrekrutierung fördern. Die daraufhin infiltrierenden Immunzellen vermitteln ihrerseits wiederum nekrotischen Zelltod, der weitere DAMPs freisetzt. Basierend auf den oben beschriebenen Effekten kann man sagen, dass Ptx3 diesem Kreislauf sowohl auf der Zelltod- als auch der Entzündungsseite entgegenwirken kann: Zum einen über die Hilfe zur raschen Beseitigung von totem Zellmaterial und der Neutralisierung von zytotoxischen Histonen und zum anderen über die Verminderung der Rekrutierung von weiteren Immunzellen und der Herunterregulierung der Komplement-Aktivierung (Abb. 54).

Somit bleibt unbestritten, dass die P-Selektin-inhibierende Eigenschaft von Ptx3 bei renaler IRI eine dominante Rolle spielt und den Phänotyp gut messbar beeinflusst^[151]. Dennoch lassen sich in der Literatur gute Gründe für die Annahme finden, dass Komplement-Inhibierung, Histon-Neutralisierung, die Opsonierung toter Neutrophile und die sekundäre Inhibierung von NETose auch im Kontext von rIRI und Oxalatkristall-induzierter Tubulusnekrose von Ptx3 beeinflusst werden könnten. Daher sollte der mögliche Beitrag dieser Mechanismen zum Gesamtphänotyp bei der Interpretation der erhobenen Daten berücksichtigt werden.

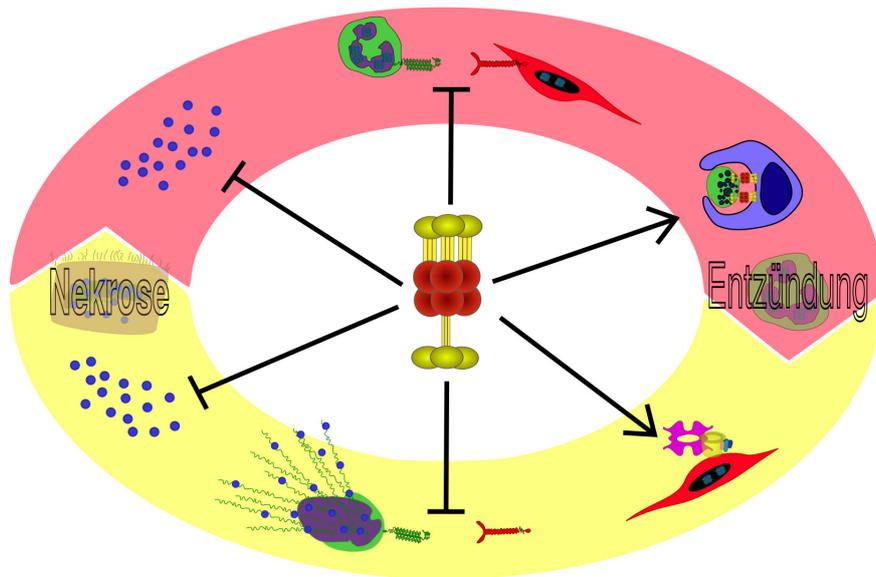


Abbildung 54: Ptx3 inhibiert Nekroinflammation. Diese Abbildung setzt die in Abb. 53 dargestellten Wirkmechanismen konzeptionell in Zusammenhang zueinander. Die Literaturlage zu Ptx3 lässt diese Schlüsse zu, wobei die jeweiligen (denkbaren) Effektstärken außer Acht gelassen sind. Diese müssen für jeden Krankheitskontext, in dem Nekroinflammation eine Rolle spielt, gesondert untersucht und entsprechend gewichtet werden. Für renale Nekroinflammation wurde bisher nur die Inhibierung der Immunzellinfiltration via P-Selektin bewiesen (oben Mitte), die Rolle der anderen Mechanismen bleibt derzeit für die Niere spekulativ. \dashv induziert eine Inhibierung, \rightarrow eine Verstärkung.

5.2 Kompartiment-spezifische Effekte von Ptx3

Zieht man die unterschiedlichen Funktionen von Ptx3 in Betracht, die prinzipiell zur Verminderung der Nekroinflammation beitragen können, sollten ebenso Überlegungen zur etwaigen Kompartiment-Spezifität dieser Funktionen angestellt werden, um die Plausibilität der Annahmen - besonders im Hinblick auf eine therapeutische Intervention mit rhPTX3 - zu hinterfragen. Auch wenn Ptx3 von einer Vielzahl von Zellen produziert werden kann, sind es während der akut-entzündlichen Phase nach ischämischer Nierenschädigung vor allem intrarenale CD11c-positive Zellen, die Ptx3 exprimieren^[151]. An infiltrierenden Immunzellen sind es vor allem Neutrophile, die durch Degranulation größere Mengen Ptx3 freisetzen, was sowohl im Interstitium als auch endothelialen Lumen die lokalen Konzentrationen beeinflussen kann^[66]. Das lässt die Annahme zu, dass endogenes Ptx3 unter akut entzündlichen Bedingungen nicht nur im vaskulären Kompartiment über P-Selektin-Bindung die Immunzellrekrutierung dezimiert, sondern - je nach Schädigungsmuster - sowohl in den Blutgefäßen als auch im Interstitium zur Verfügung steht um Zelldebris zu opsonieren oder extrazelluläre Histone zu neutralisieren. Die Schädigung des Nierenendothels spielt in der Pathophysiologie der rIRI eine dominante Rolle^[30]. Direkte mildernde Effekte von Ptx3 in diesem Kompartiment könnten den Phänotyp merklich positiv beeinflussen.

Diese Zusammenhänge sind für das Verständnis der Funktion sowohl von endogenem Ptx3 als auch therapeutisch eingesetztem rhPTX3 wichtig. Das Ptx3-Oktamer könnte unabhängig von seiner ursprünglichen Quelle die endotheliale Barriere während einer florierenden Entzündungsreaktion leicht überwinden, da sich die vaskuläre Permeabilität in Abhängigkeit von Metalloproteasen drastisch erhöht^[250,274]. Die hier vorgestellten Daten zur Pharmakokinetik von rhPTX3 zeigten, dass das Protein nach 24 oder 48 h zwar in Leber, Milz und Plasma, nicht aber in den Nieren wiederge-

funden werden konnte. Dieser Befund schließt allerdings nicht die Möglichkeit aus, dass rhPTX3 bei erhöhter vaskulärer Permeabilität in der entzündeten, post-ischämischen Niere auch in den Interstitialraum übertreten kann und dort mit Histonen, Zelldebris und apoptotischen Zellen interagiert und den Krankheitsverlauf auch von diesem Kompartiment aus beeinflusst.

Vor dem Hintergrund der oben näher beschriebenen Vielfalt an möglichen Wirkmechanismen, die Ptx3 bei einer akut entzündlichen Nierenerkrankung zeigen könnte, bleibt die Hypothese, dass therapeutisch eingesetztes rhPTX3 auch in einem anderen Modell außer der rIRI wirksam sein könnte, unangetastet.

5.3 PTX3 bei akuter Oxalatnephropathie

Unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen ist das Entzündungsgeschehen bei akuter Oxalatnephropathie im Gegensatz zur renalen IRI vergleichsweise mild. Therapeutisch eingesetztes rhPTX3 zeigte sich präemptiv gegeben als äußerst effektiv bei der Verringerung des Oxalat-induzierten Nierenschadens, sodass kaum eine Verschlechterung der exkretorischen Nierenfunktion 24 h nach intraperitonealer Oxalat-Gabe feststellbar war. Die Reduktion der infiltrierende Neutrophile durch die rhPTX3-Behandlung erreichte in der FACS-Auswertung zwar statistische Signifikanz, es scheint allerdings unwahrscheinlich, dass sich dahinter der einzige Grund für den stark nephroprotektiven Effekt der Therapie verbirgt. Die deutliche Reduktion der CD103-Expression auf intrarenalen dendritischen Zellen in rhPTX3-therapierten Tieren kann ein Hinweis darauf sein, dass die DCs weniger Material zur Antigenpräsentation für zytotoxische T-Zellen in den geschädigten Nieren vorfinden^[221]. Ein Ansatz von rhPTX3 bei der Reduktion der Antigenlast durch Begünstigung der Phagozytose toter Zellen oder Reduktion von Zelltod durch Histonneutralisierung würde sich nach dem Konzept der Nekroinflammation auch in einer Reduktion der weiteren Immunzellrekrutierung äußern, was die verringerten Neutrophilenzahlen ebenso erklären könnte, wie die Inhibierung einer P-Selektin-vermittelten Immunzellrekrutierung. Die Frage, welcher Mechanismus unter den gewählten Experimentbedingungen dominiert, lässt sich hier nicht klären. Die Ergebnisse sind jedoch zu denen von Lech et al.^[151] kongruent und die Annahme, dass eine Ptx3-abhängige Leukozyteninfiltrations-Blockade substantiell zur Verbesserung des Phänotyps beiträgt, erscheint plausibel.

Der Vergleich zwischen *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Tieren im gleichen Modell sollte mehr Einsicht in die Rolle des endogenen Ptx3 im Pathomechanismus generieren. Nachdem der Befund durch die rhPTX3-Intervention deutlich aggraviert war, lag zunächst die Vermutung nahe, dass sich die *Ptx3^{-/-}* Tiere gegenüber ihren *Ptx3^{+/+}* Wurfgeschwistern mit einem schwereren Nierenschaden präsentieren würden. Die durchgeführten Experimenten zeigten allerdings, dass endogenes Ptx3 keinen messbaren Einfluss auf die Verschlechterung der exkretorischen Nierenfunktion oder die Expression von Entzündungs- und Schädigungsmarkern nimmt. Inkonklusiv blieb die durchflusszytometrische Charakterisierung der intrarenalen Immunzellen. Während die Population der Neutrophilen bei beiden Genotypen relativ ähnlich ausgeprägt erhöht war, waren Ccr2-positive Monozyten in den Nieren der *Ptx3^{-/-}* Tiere in etwas höherer Zahl zu finden. Beide Zelltypen werden P-Selektin-Psgl-1-vermittelt rekrutiert^[287,109] und eine vergleichbare Reaktion auf die kompetitive Inhibierung durch Ptx3 wäre zu erwarten gewesen. Obwohl beide Populationen nur einen sehr kleinen Anteil an der Gesamtnierenzellpopulation ausmachen, ist der Prozentsatz Ccr2-positiver Zellen etwa zehnmal höher als der der Neutrophilen. Pharmakologisch betrachtet lässt sich die kompetitive Hemmung (bzw. deren Ausblei-

ben) durch einen Antagonisten erst ab einem bestimmten Schwellenwert des natürlichen Agonisten feststellen^[21]. So ließe sich argumentieren, dass der kompetitive Ptx3-Psgl-1-Antagonismus prinzipiell für beide Zelltypen gleichermaßen gilt, das Ausbleiben der Inhibierung auf Grund der geringeren Neutrophilenzahlen (und der damit geringen Zahl Psgl-1-Moleküle) aber nicht messbar ist. Für diesen Fall müsste geschlussfolgert werden, dass der extravasationsinhibierende Effekt von endogenem Ptx3 im Modell der akuten Oxalatnephropathie den Phänotyp hinsichtlich exkretorischer Nierenfunktion, Nierenschädigung und intrarenalen Entzündungsparametern nicht messbar beeinflusst. Dasselbe gilt entsprechend für die anderen Funktionen, die Ptx3 im Kreislauf der Nekroinflammation ausüben kann. Nichts desto trotz bestärken diese Ergebnisse die Annahme, dass Ptx3 bei akut entzündlichen Nierenerkrankungen in erster Linie über die P-Selektin-Achse in Erscheinung tritt.

Warum endogenes Ptx3 im Modell der akuten Oxalatnephropathie eine untergeordnete Rolle auf die erhobenen Parameter zu spielen scheint ist nicht vollständig klar. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre die gegenüber der rIRI deutlich geringere Präsenz neutrophiler Granulozyten auf dem Höhepunkt der Modellinduktion (eigene Beobachtung). Neutrophile speichern Ptx3 in Granuli, deren Inhalt unter entzündlichen Bedingungen in den Extrazellularraum abgegeben wird^[66]. Dies kann lokal zu hohen pharmakologisch relevanten Ptx3-Konzentrationen führen^[120]. Hinzu kommt, dass sich zumindest auf mRNA-Ebene keine messbare Regulation von *Ptx3* im Krankheitsverlauf zeigte, was ebenfalls keinen profunden Einfluss der endogenen Ptx3-Defizienz auf den Gesamtphänotyp erwarten lässt.

5.4 PTX3 in der post-ischämischen Regenerationsphase

Ein besseres Verständnis für die Rolle von Ptx3 in der post-ischämischen Niere ist nicht nur im Rahmen von grundlagenwissenschaftlichen Überlegungen interessant, sondern vor allem für die Beurteilung einer möglichen therapeutischen Anwendung im Sinne translationaler Forschung hoch relevant. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen einer Gabe von rhPTX3 nach Ende der akuten Schädigungsphase bei unilateraler rIRI untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass ein therapeutischer Einsatz von rhPTX3 sowohl in Präsenz als auch in Absenz von endogenem Ptx3 den Nierenschaden deutlich aggraviert. Überträgt man diese Ergebnisse - unter der Annahme, dass gleiche Effekte beim Menschen zu erwarten wären - auf die klinische Situation, erscheint die Anwendbarkeit von Ptx3 als Pharmakon sehr eingeschränkt, wenn nicht sogar kontraindiziert.

In der Klinik wird akutes Nierenversagen (ANV), wie es auch durch eine akute Tubulusnekrose verursacht wird, oft erst durch den Anstieg des Serumkreatinins, also einer Einschränkung der exkretorischen Nierenfunktion, festgestellt^[246]. Serumkreatinin ist ein sehr wenig sensitiver Biomarker, der erst bei einer profunden Verschlechterung messbar ansteigt^[129,5]. Daraus folgt, dass zum Zeitpunkt der Diagnose eines intrarenalen ANV bereits ein hoher struktureller Schaden entstanden ist. Die Auswirkung dieser Schädigung lässt sich am besten daran abschätzen, dass jede ANV-Episode das Risiko für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz im Verlauf signifikant begünstigt^[271,48].

Spätestens hier stellt sich die Frage nach der Größe des therapeutischen Fensters einer Intervention, die auf die Verringerung einer weiteren parenchymalen Schädigung abzielt. Bei einem Therapiebeginn 6 h nach experimenteller ischämischer Schädigung zeigte rhPTX3 bereits keinerlei protektiven Effekt mehr^[151]. Somit kann man davon ausgehen, dass nach der Diagnose von ANV die Therapie eines Patienten mit rhPTX3 keine Verbesserung des Phänotyps erwarten ließe. Darüber

hinaus lassen die hier gezeigten Daten sogar den Schluss zu, dass eine verspätete Therapie zu einer Verschlechterung führen könnte und damit kontraindiziert wäre.

Die Ptx3-abhängige Mechanismen, die der Nekroinflammation entgegen wirken sollten und deren pathophysiologische Relevanz für andere Erkrankungsmodelle etabliert sind (siehe oben), scheinen im Gesamtphänotyp dieser speziellen Nierenpathologie nicht ins Gewicht zu fallen. Eine Verschlimmerung des post-ischämischen Nierenschadens lässt sich nach Stand des Wissens plausibel nur über die Modulation der Immunantwort an der P-Selektin-Schnittstelle erklären, wonach die Infiltration von Immunzellen, welche die Resolution der Entzündung und die fibrotische Stabilisierung untergegangener Nephrone begünstigen, durch die Gabe von rhPTX3 behindert würde. Welche Hinweise bieten die Daten der vorliegenden Arbeit auf die Richtigkeit dieser Hypothese?

Die Therapie von Wildtyp-Tieren nach IRI mit rhPTX3 führte zu mehr Entzündung und der Präsenz von mehr Immunzellen, namentlich Makrophagen. Letzteres scheint sich zunächst nicht mit der Hypothese in Einklang bringen zu lassen, nach der rhPTX3 die Infiltration von Immunzellen in die Niere eher unterbinden sollte. Eine anhaltende Entzündungsreaktion sorgt allerdings nicht nur für die weitere Rekrutierung von Immunzellen sondern unter Umständen auch für die Proliferation von residenten Immunzellen, wie es z.B. für diverse Makrophagenpopulationen in Mensch und Maus gezeigt werden konnte^[126,117]. Erst die Rekrutierung von anti-entzündlichen Zellen, wie z.B. regulatorischen T-Zellen, forciert die Entzündungsresolution und schützt das Parenchym vor weiterem Schaden bei intrarenalen Entzündungsreaktionen^[136]. Wird dieser Prozess durch die Ptx3-abhängige Inhibierung des Psgl-1-P-Selektin-Signalweges unterbunden, bleibt die Entzündung bestehen und eine lokale Proliferation von intrarenalen Immunzellen findet entsprechend weiter statt. Somit stützt der Befund nach verzögerter rhPTX3-Therapie post-ischämischer Nieren zwar die aufgestellte Hypothese, ein schlussendlicher Beweis dieses Zusammenhanges konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht erbracht werden.

Der Ausschluss von endogenem Ptx3 aus dem Pathomechanismus durch Verwendung von *Ptx3*^{-/-} Tieren bei gleichzeitiger Substitution mit rhPTX3 während der Regenerationsphase nach IRI erbrachte essentiell das gleich Ergebnis, nämlich eine Verschlimmerung des Phänotyps. Aber ist der zugrundeliegende Mechanismus der gleiche? Eine genauere Charakterisierung der intrarenalen Immunzellen 10 Tage nach Reperfusion zeigte ein vom Wildtyp-Experiment abweichendes Muster. Anders als in den Ptx3-kompetenten Wildtyp-Tieren führte die Therapie mit rhPTX3 nicht zu einer Expansion intrarenaler Makrophagen. Stattdessen war der einzig detektierbare Unterschied eine rhPTX3-abhängige Reduktion dendritischer Zellen. Dendritische Zellen spielen in der Regeneration nach renaler IRI, ebenso wie M2-Makrophagen, eine wichtige Rolle^[146,134,217] und die Reduktion ihrer Anzahl in Abhängigkeit von rhPTX3 könnte ursächlich für eine Verminderung der Resolution von Entzündung und die verzögerte Heilung sein. Eine verminderte Rekrutierung von DCs in die entzündeten Nieren würde die aufgestellte Hypothese stützen. Aber auch hier kann ein Einfluss von rhPTX3 auf die Proliferation residenter Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Zusammengenommen kann die Hypothese, dass rhPTX3 bei Administration in der Regenerationsphase nach IRI die Rekrutierung von anti-entzündlichen bzw. pro-regenerativen Immunzellen stört und damit die Heilung nach IRI verzögert, auf Grundlage der durchgeführten Experimente nicht abgelehnt werden. Ein zweifelsfreier Beweis für ihre Richtigkeit wurde jedoch auch nicht erbracht. Tatsächlich scheint endogenes Ptx3 die Immunzellzusammensetzung unabhängig von der Gabe von exogenem rhPTX3 maßgeblich mit zu gestalten. Ob das endogene Protein in diesem Kontext

hauptsächlich von renalen Parenchym- oder Immunzellen freigesetzt wird ist unklar. Über mögliche Mechanismen könnte an dieser Stelle nur spekuliert werden, da die Datenlage für schlüssige Vermutungen oder die Aufstellung fundierter neuer Hypothesen nicht ausreicht. Am Ende der angestellten Untersuchungen ist zumindest der Eindruck entstanden, dass die Rolle von Ptx3 in der Regenerationsphase nach rIRI vielschichtiger ist als zunächst angenommen.

Im Licht neuerer Erkenntnisse über die Zusammensetzung der Immunzellpopulation in der Niere müssen die hier gezeigten Daten kritisch hinterfragt werden. Die Debatte über die zweifelsfreie Identifikation von Dendritischen Zellen und Makrophagen sowie die Zuordnung von der jeweiligen Zellen zum Pool der Nieren-residenten bzw. infiltrierenden Immunzellen ist Gegenstand einer andauernden Debatte^[93,106]. Für die Beurteilung der hier vorgestellten Ergebnisse ist dabei vor allem von Relevanz, dass die Verwendung von CD11c und Adgre1 zur Diskriminierung von DCs und Makrophagen mittlerweile als insuffizient gewertet wird. Anspruchsvollere Färbestrategien als die hier verwendeten würden besseren Einblick in den jeweiligen Anteil infiltrierender gegenüber residenter Immunzellen geben und möglicherweise auch einen Hinweis auf den Ursprung der Zellen geben.

Die hier durchgeführten Experimente dienten dazu, einen Einblick in mögliche Konsequenzen einer Therapie mit rekombinantem PTX3 nach akuter Tubulusnekrose zu gewinnen. Auch wenn die Rolle von endogenem Ptx3 in der Regenerationsphase nach IRI hier nicht dezidiert untersucht wurde, verbirgt sich unter Umständen in den Daten zum Einsatz von rhPTX3 ein Hinweis darauf, dass auch endogenes Ptx3 nach der akuten Schädigungsphase negative Auswirkungen auf die Entzündungsresolution und parenchymale Heilung haben könnte. Dieser Hypothese konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nachgegangen werden. Denkbar wäre die Antikörper-vermittelte Neutralisierung von Ptx3 als therapeutisches Werkzeug zur schnelleren Entzündungsresolution nach ANV.

Dass rekombinantes PTX3 in post-ischämischen Nieren in Abhängigkeit vom Therapiebeginn völlig unterschiedliche Effekte nach sich ziehen kann, ist bemerkenswert und ist bezeichnend dafür, dass das Protein hier eine Schlüsselrolle einnimmt, die je nach Kontext gänzlich unterschiedliche Konsequenzen nach sich ziehen kann. Das zeigte sich auch bei Studien zur Interaktion zwischen dem Komplementprotein C1q und Ptx3. Nauta et al.^[192] konnten zeigen, dass Ptx3 den klassischen Weg der Komplementaktivierung entweder begünstigen oder inhibieren kann. Ausschlaggebend für den Effekt ist hierbei, ob Ptx3 an freiem (Inhibierung) oder gebundenem C1q (Aktivierung) bindet.

In einem anderen Zusammenhang wurden ähnlich gegensätzliche Beobachtungen angestellt. Bonavita et al.^[29] berichteten, dass Ptx3 durch die Regulierung des Komplementsystems Tumorfördernde Entzündungsreaktionen eindämmen und somit als extrinsischer Tumorsuppressor in Mensch und Maus fungieren kann. Zudem kann Ptx3 den Fibroblasten-Wachstumsfaktor Fgf2 durch direkte Interaktion inhibieren^[38,110], was bei Melanomzellen *in vitro* die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) unterbindet und somit ihre Kanzerogenität potentiell reduziert^[218,195].

Im Gegensatz dazu wurde Ptx3 auch als Tumorpromotor identifiziert. Ptx3 ist für die Proliferation und Metastasierung von Gliomzellen in Abhängigkeit von einem Protein der Split-ends-Familie (Spocd1) verantwortlich^[164]. Ptx3 aktiviert C-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) und reguliert somit EMT^[107]. Passend dazu reduzierte der Knockdown von Ptx3 die Kanzerogenität und Metastasierung von Zervixkarzinomzellen *in vitro* und *in vivo*, wohingegen eine Ptx3-Überexpression die Proliferation und Invasion von Tumorzellen förderte^[292]. Im klinischen Kontext konnten erhöhte Ptx3-Plasmalevel mit einer schlechteren Prognose bei kolorektalen Karzinomen assoziiert werden^[297].

Diese Zusammenhänge sind Ergebnis jüngerer Forschungsarbeiten, sodass abzuwarten bleibt, ob sich eine der beiden widersprüchlichen Funktionen in der Zukunft als dominant abzeichnet oder ob Ptx3 im Kontext von Karzinogenese und Metastasierung eine bivalente Rolle behalten wird. Im Moment erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass Ptx3 wie bei der Modulation der Extravasation von Immunzellen in entzündetes Gewebe auch hier eine komplexe Rolle einnimmt, die je nach Situation unterschiedliche Folgen nach sich ziehen kann.

5.5 PTX3 als Kristallisationsinhibitor

Die unterschiedlichen Auswirkungen von Ptx3, die während einer akuten Entzündungsreaktion und der darauffolgenden Resolutionsphase beobachtet werden konnten, machen es schwer seine Rolle bei einem chronisch entzündlichen Nierenschaden, bei dem die Phasen nicht so klar getrennt sind, abzuschätzen. Zur Untersuchung der Frage, ob Ptx3 den Phänotyp in so einem Kontext messbar beeinflusst, wurde in der vorliegenden Arbeit das Modell der Hyperoxalurie-induzierten Nephrokalzinose bei *Ptx3^{-/-}* und *Ptx3^{+/+}* Tieren herangezogen. Hyperoxalurie bedeutet zunächst nur die erhöhte Ausscheidung von Oxalat, bzw. Oxalsäure über den Urin. Pathophysiologisch zu unterscheiden sind die primäre und sekundäre Hyperoxalurie. Erstere beruht auf erblichen Gendefekten, die zu verringerter Aktivität von Enzymen des Pyruvatmetabolismus führen. Zweitere beruht auf erhöhter Aufnahme von Oxalat oder Oxalatvorläufern über die Nahrung und einer veränderten Absorption im Magen-Darm-Trakt^[54,24].

Die Pathologie rührt von der quasi ausschließlichen Filtrierung von Oxalat über die Nieren her, was zu einer Hypersaturierung des Primärfiltrats mit Oxalat, nachfolgender Präzipitation des schwer löslichen Kalziumoxalatsalzes und dessen Anhaften an Tubulusepithelzellen führt^[283,103]. Die Präsenz von endogenen Kristallisations-Promotoren, bzw. das Fehlen entsprechender Inhibitoren in ausreichender Menge sind wichtige Faktoren, die die Kristallbildung von der Keimbildung, dem Wachstum, der Aggregation bis zur Retention im tubulären Lumen modulieren^[2]. Die primären Mikrokristalle adhärieren an der luminalen Membran der Tubulusepithelzellen über eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, u.a. Annexin II, CD44, Hyaluronsäure und α -Enolase^[14,272,141,80]. Die Kristalle werden innerhalb weniger Sekunden an den Zellen immobilisiert^[157]. Durch die Immobilisierung der Kristalle werden Wachstum und Aggregation vermutlich begünstigt. Zudem nimmt die Expression der Adhäsionsmoleküle mit der Dauer der CaOx-Kristall-Expositionsdauer zu^[14].

Die Kristalle zeigen eine direkte Zytotoxizität gegenüber Tubulusepithelzellen^[262] und können bei Agglomeration von mehreren Kristallen zu Nierensteinen letztendlich zur Verstopfung des tubulären Lumens führen. CaOx-Kristalle aktivieren zudem direkt das Nlrp3-Inflammasom und induzieren damit eine Entzündungsreaktion^[182] und die Rekrutierung von Immunzellen^[264].

Sowohl primäre als auch sekundäre Hyperoxalurie können ein Erkrankungsspektrum von wiederkehrenden Nierensteinen, Nephrokalzinose, Pyelonephritis, Atrophie, chronischer Nierenerkrankung bis hin zu terminalem Nierenversagen aufweisen. Primäre Hyperoxalurie kann nur über eine kombinierte Leber- und Nierentransplantation geheilt werden. Andere therapeutische Möglichkeiten sind der Einsatz von Kristallisationsinhibitoren oder Dialyse^[103].

Mit zunehmendem Verständnis für den Pathomechanismus der Nephrokalzinose^[191] begann die Suche nach potentiellen exogenen und endogenen Kristallisationsinhibitoren vor über 40 Jahren^[187,188,186] und die Liste möglicher Kandidaten wächst bis heute weiter^[142,219,4]. Erste Hinwei-

se auf eine gemeinsame funktionelle CaOx-Bindungsdomäne in einer heterogenen Gruppe von Kalziumoxalat-bindenden Proteinen bietet die Arbeit von Roop-ngam et al.^[219]. Dem gegenüber steht die Erkenntnis, dass sich hinter dem Terminus „Kristallisationsinhibierung“ zum Teil sehr unterschiedliche Mechanismen verbergen.

Die Modifikation von Kristallwachstum und der Kristallstruktur wird generell durch die Bindung von Glykoproteinen an der CaOx-Kristalloberfläche vermittelt^[188,223,130]. Diese Makromoleküle begünstigen eine heterogene Keimbildung durch die Anziehung von Kalziumionen an ihren Kalziumbindungsdomänen^[163]. Dadurch kann die Ausbildung einer soliden Kristallstruktur gestört und ihre Desintegration begünstigt werden^[223], wie z.B. im Fall von Uromodulin^[275] oder Nephrocalcin^[44]. Die Bindung von Osteopontin hingegen begünstigt die Aggregation von Kristallen zu Nierensteinen^[197,43]. Hohe Uromodulinkonzentrationen haben ebenfalls einen gegenteiligen Effekt und fördern Kristallisation und Aggregation^[275]. Albumin wiederum begünstigt die Keimbildung von Kristallen und senkt damit die zunächst hypersaturierte CaOx-Lösung unter die Löslichkeitsgrenze^[41]. Albumin und Osteopontin begünstigen zudem die Entstehung von CaOx-di- und trihydraten^[43,163]. Diese Spezies adhären deutlich schlechter an der luminalen Tubulusmembran als das hauptsächlich in CaOx-Nierensteinen vorzufindende CaOx-Monohydrat^[191,238] und werden damit leichter mit dem Primärfiltrat ausgeschwemmt^[163].

Neuere Arbeiten von Chung et al.^[53] zeigen, dass die zwei therapeutisch eingesetzten Kristallisationsinhibitoren Citrat und Hydroxycitrat entgegen der oben beschriebenen und zunächst für allgemeingültig angenommenen Mechanismen nicht das Wachstum bremsen, sondern durch Adsorption an den Kristallen deren Auflösung begünstigen und damit sekundär das Wachstum verlangsamen.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass rhPTX3 das Wachstum von CaOx-Monohydratkristallen *in chemico* dosisabhängig inhibiert. Dazu passend entwickelten nur Ptx3-defiziente Tiere *in vivo* eine Nephrokalzinose, während Ptx3-kompetente Tiere desselben Hintergrunds keinerlei Kristalldeposition und davon abgeleitete Nierenschäden aufwiesen. Ohne eine genauere Untersuchung der Interaktion von Ptx3 und CaOx-Kristallen auf der Basis von Rasterkraftmikroskopie nach dem Vorbild von Chung et al.^[53] durchzuführen lässt sich nur an Hand der hier erhobenen Daten nicht sagen, nach welchem Prinzip Ptx3 das Kristallwachstum beeinflusst und ob sich dieser Mechanismus mit einem der oben beschriebenen deckt. Die zuvor indentifizierte CaOx-Bindungsdomäne, die in einer Reihe von CaOx-bindenden Proteinen identifiziert wurde^[219], findet sich in der Aminosäuresequenz von Ptx3 zumindest nicht wieder.

Auf der Suche nach möglichen Parallelen zwischen Ptx3 und anderen CaOx-Kristallisationsinhibitoren stößt man schnell auf Sialinsäure. Ptx3 ist nur an einer Stelle der Aminosäuresequenz glykosyliert (Asn220) und weist hier einen komplexen, mehrfach verzweigten fucosylierten und sialinierten Zuckerbaum auf^[111]. Die Rolle dieses Oligosaccharids, bzw. der Sialinsäure darin ist relativ gut untersucht. Es beeinflusst nachweislich das Bindungsverhalten des Proteins gegenüber einer Reihe von Liganden, darunter Moleküle des Komplementsystems, Influenzaviren und P-Selektin^[112].

Im Zusammenhang mit CaOx-Kristallen konnte gezeigt werden, dass Uromodulin einen Teil seiner inhibitorischen Eigenschaft einbüßt, nachdem seine Sialinsäurereste enzymatisch entfernt wurden^[50]. Der zugrundeliegende Mechanismus ist nicht abschließend geklärt, mögliche Erklärungsansätze reichen von der Sequestrierung von freiem Kalzium^[125] bis zu Veränderung des Bindungsverhaltens von Kristallen^[273].

Ob die Ptx3-stämmige Sialinsäure der Teil des Moleküls ist, der *in chemico* das verringerte Wachstum von CaOx-Kristallen vermittelt, ist unklar und bleibt bis auf weiteres spekulativ. Derzeit versucht der Autor in Zusammenarbeit mit Herrn Antonio Inforzato durch den direkten Vergleich von nativem mit desialisiertem rhPTX3 in dem hier vorgestellten Kristallisationsassay eine Antwort darauf zu finden.

Die Ptx3-kompetenten Mäuse, die nachweislich eine Hyperoxalurie, aber keine Kristalldeposition nach dreiwöchiger Exposition mit Oxalatfutter entwickelten, zeigten auch keine signifikante Hochregulation der Expression von CD44 oder Annexin II in den Nieren. Die *Ptx3*^{-/-} Tiere hingegen reagierten auf die Kristalldeposition mit signifikanter Hochregulation beider Moleküle (Abb. 55). Dazu konklusive Ergebnisse lieferte auch das vereinfachte *in vitro* System aus CaOx-stimulierten primären Tubuluszellen von *Ptx3*^{-/-} und *Ptx3*^{+/+} Tieren. Wie lassen sich diese Befunde erklären?

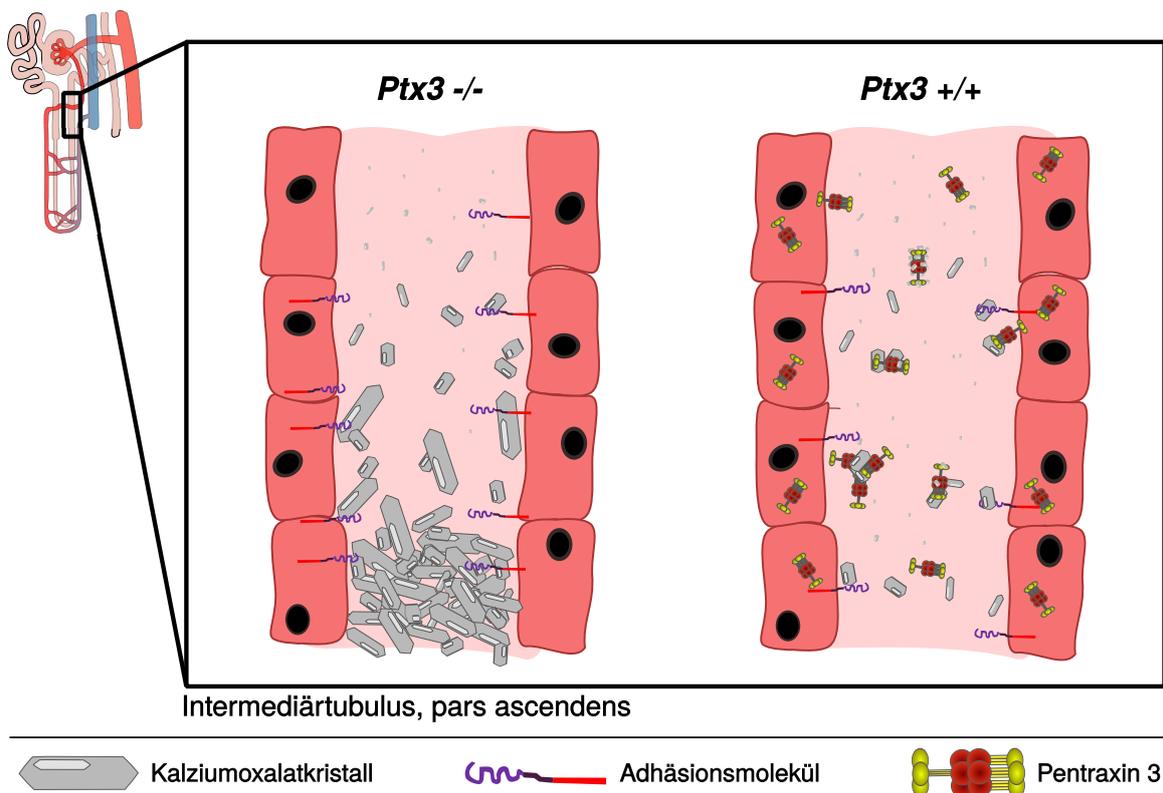


Abbildung 55: Mögliche Wirkmechanismen von endogenem Ptx3 bei chronischer Oxalatnephropathie. Während die Abwesenheit von Ptx3 in *Ptx3*^{-/-} Tieren den pathophysiologischen Prozess aus Kristallisation, Kristallwachstum, Adhäsion und Aggregation bis hin zur Tubulusobstruktion nicht stört (links), könnte das Protein in *Ptx3*^{+/+} Tieren dafür sorgen, dass die Kristalle nur bis zu einer bestimmten Größe heranwachsen, kaum an der luminalen Tubulusmembran adhären und nicht zu großen Konglomeraten heranwachsen können (rechts).

Geht man von der Annahme aus, dass Ptx3 – analog zu anderen Kristallisationsinhibitoren - in irgendeiner Form direkt mit der Oberfläche der CaOx-Kristalle interagiert, wäre eine mögliche Erklärung, dass Ptx3 den Teil des Kristalls, der normalerweise von den Adhäsionsmolekülen erkannt wird, maskiert und somit ihre weitere Expression nicht stimuliert. Eine Maskierung könnte sich auch dahingehend bemerkbar machen, dass die Kristalle ihre zytotoxische Wirkung nicht mehr entfalten können.

Alternativ wäre denkbar, dass Ptx3 als Oponin fungiert und die Phagozytose von CaOx-Kristallen durch Tubuluszellen begünstigt, ein Prozess, der die Kristalllast im tubulären Lumen direkt

reduziert und der Nephrokalzinose entgegen wirkt^[157]. Die begünstigende Funktion von Ptx3 bei der Phagozytose wurde in der Literatur für apoptotische Makrophagen und Harnwegsinfektionen beschrieben^[96,119]. Es existieren allerdings auch Daten, die darauf hinweisen, dass Ptx3 die Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen inhibiert^[267]. Auf Grund fehlender Hinweise in der Literatur auf eine etwaige Opsonierung anderer kristalliner Partikel und die generell beschriebene Abhängigkeit des Effekts vom expliziten (Krankheits-) Kontext, erscheint die Hypothese, dass Ptx3 als Opsonin für CaOx-Kristalle fungiert und ihre Phagozytose durch Tubuluszellen begünstigt, im Moment wenig plausibel.

Auch wenn rhPTX3 die Größe der CaOx-Kristalle *in chemico* dosisabhängig beeinflusst, soll hier klar darauf verwiesen sein, dass das höchstens als Hinweis auf einen möglichen Mechanismus *in vivo* gelten darf. Die Konditionen *in chemico* sind einerseits für diese Fragestellung optimiert und zudem selbstverständlich stark vereinfacht. Die Diskrepanz wird z.B. dadurch deutlich, dass das als Kontrolle verwendete Albumin keinen messbaren Effekt auf das Kristallwachstum hatte, obwohl es in der Literatur als potenter Kristallisationsinhibitor bekannt ist. Das zeigt, dass der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Kristallisationsassay möglicherweise sehr weit von der realen Kinetik *in vivo* entfernt ist. In letzter Konsequenz dürfen also andere Erklärungsansätze für den im Mausmodell beobachteten Befund nicht außer Acht gelassen werden.

Dass Tubuluszellen Ptx3 sezernieren können, ist dokumentiert^[124,193], warum sie es - wie hier gezeigt - unter hyperoxaluren Bedingungen *in vivo* tun, allerdings noch unklar. Ptx3 Expression wird vornehmlich von Tnf induziert^[1], einem pro-entzündlichen Zytokin, das neben anderen im Modell der chronischen Oxalatnephropathie in der Niere exprimiert wird^[181]. Es wäre denkbar, dass sich initial formende Kristalle eine leichte Entzündungsreaktion einleiten, die zur Expression und Sezernierung von Ptx3 führen, welches wiederum das Kristallwachstum reduziert und der Kristalladhäsion an der luminalen Membran der Tubuluszellen entgegenwirkt. Mit Sicherheit lässt sich an dieser Stelle jedoch nur sagen, dass – sollte sie vorliegen – eine leichte, schwelende Entzündung unter hyperoxaluren Bedingungen unter den in dieser Arbeit gewählten Konditionen nicht zu messbarem Gewebeumbau oder der Rekrutierung von Immunzellen in die Nieren führte. Insofern bleibt der zugrundeliegende Mechanismus hinter der Ptx3-Expression in diesem Modell derzeit noch Gegenstand von Spekulationen.

Eine weitere Frage, die sich aus den hier erhobenen Daten ergibt, bezieht sich auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Ptx3 und dem Fehlen von CaOx-Kristallen in Oxalat-exponierten Tieren in Abhängigkeit von Hintergrund und Geschlecht. Auf Grund der Vielzahl bekannter endogener Kristallisationsinhibitoren erscheint es nicht wahrscheinlich, dass Ptx3-Expression in Tubuluszellen oder Polymorphismen des *Ptx3*-Gens die einzigen Variablen darstellen, die zwischen Ausbleiben und Auftreten einer Nephrokalzinose in verschiedenen Hintergründen und Geschlechtern entscheiden. Dennoch erscheint die Hypothese, dass das Fehlen von CaOx-Kristalldepositionen in den Nieren von hyperoxaluren BALB/c Weibchen, CD-1 Männchen sowie CD-1 Weibchen mit geringeren Ptx3-Konzentrationen assoziiert ist, begründet. Teile der hier gezeigten Daten zur Rolle von Ptx3 bei chronischer Oxalatnephropathie wurden kürzlich im Journal „Frontiers in Immunology“ publiziert^[168]. Im Rahmen des Revisionsprozesses wurde dieser Frage nachgegangen und die Studie entsprechend wiederholt. Es zeigte sich, dass unter den Oxalat-exponierten Tieren Geschlechts- und Hintergrunds-übergreifend eine Assoziation zwischen CaOx-Kristalldeposition und Absenz von Ptx3-Expression bestand (Daten nicht gezeigt)^[168].

Dementsprechend stellt sich jetzt die Frage nach Polymorphismen in der *Ptx3*-Gensequenz, die für die unterschiedlichen Expressionslevel von Ptx3 in dieser Studie verantwortlich sein könnten. Verschiedene PTX3-Blutplasmakonzentrationen beim Menschen lassen sich drei unterschiedlichen *Ptx3*-Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) zuordnen^[57]. Der Zusammenhang zwischen *Ptx3*-Haplotyp, PTX3-Plasmakonzentration und Krankheitsverlauf wurde zudem für Patienten mit akutem Myokardinfarkt^[16] und Abstoßungsreaktionen nach Lungentransplantation belegt^[68]. Assoziationen zwischen *Ptx3*-SNPs und Erkrankungsrisiko ließen sich außerdem für opportunistische Infektionen bei Patienten mit zystischer Fibrose^[51] und Lungentuberkulose^[198] herstellen^[57].

Im Kontext von Nierensteinerkrankungen konnten SNPs des Kristallisationsmoleküls Osteopontin mit unterschiedlichem Erkrankungsrisiko assoziiert werden^[84]. Daher ist durchaus vorstellbar, dass sich dem entsprechend *Ptx3*-SNPs auch in Patienten mit Hyperoxalurie im Schweregrad der Nephrokalzinose bemerkbar machen.

Basierend auf diesen Ergebnissen und Überlegungen bleibt zu Fragen, ob sich aus dieser Grundlagenforschung eine neue Therapieoption für Patienten, die an CaOx-Nierensteinen leiden, ergeben könnten. Das vollständige PTX3-Oktamer ist zu groß, um durch den glomerulären Filter zu passen^[110], sodass exogen appliziertes PTX3 vermutlich nicht im tubulären Lumen – also am Ort der Kristallbildung – anzutreffen wäre. Eine Untersuchung der Interaktion zwischen Kristall und Protein auf molekularer Ebene, sowie die Testung von verkürzten Aminosäuresequenzen des Proteins (z.B. N- oder C-terminale Regionen) in einem Kristallisationsassay könnten Aufschluss über die funktionelle Domäne geben. Positive Befunde solcher Experimente würden weitere Spekulationen über eine klinische Anwendbarkeit zulassen. Basierend auf dem status quo dieser Arbeit ist hingegen nicht davon auszugehen, dass exogenes PTX3 als Kristallisationsinhibitor in Frage kommt.

Inwiefern endogenes Ptx3 im Modell der Hyperoxalurie-induzierten Nephrokalzinose, abgesehen von seiner möglichen Funktion als Kristallisationsinhibitor, eine durch Kristalle verursachte Entzündungsreaktion beeinflussen kann, konnte hier nicht untersucht werden. Ebenso wie bei anderen entzündlichen Modellen, ist jedoch auch hier prinzipiell davon auszugehen, dass Opsonierung von Zellmaterialien, Neutralisierung von extrazellulären Histonen und Modulation der Immunzellinfiltration eine Entzündungsreaktion beeinflussen würden. Durch das Ausbleiben der Kristalldeposition in *Ptx3^{+/-}* Tieren stellte sich die Frage nach Veränderungen der nachgeschalteten Nekroinflammation allerdings nicht mehr. Im Sinne der Entwicklung einer neuen pharmakologischen Intervention für Patienten mit Kalziumoxalatnephropathie wäre die Beantwortung dieser Frage nach wie vor relevant. Während die pharmakologischen Therapieoptionen mit hoher Flüssigkeitszufuhr, Citrat und Phosphat u.a.^[103] darauf abzielen, Kristallisation zu vermindern, bzw. zu inhibieren, birgt Ptx3 per se das Potential zusätzlich dazu die sekundäre Entzündungsreaktion zu lindern.

5.6 Limitationen der Arbeit

Die Erkenntnisse dieser Arbeit fußen zum allergrößten Teil auf *in vivo* bzw. Maus-Experimenten. Solche Studien sind für die Untersuchung von Pathomechanismen unabdingbar geworden und stellen den Goldstandard in der translationalen Forschung dar^[63]. Das gilt auch für die Bereiche Immunologie und Nephrologie^[64,20,15]. Die wissenschaftlichen Erfolge, die durch *in vivo* Studien erzielt wur-

den, dürfen jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass diese Vorgehensweise einige Schwächen aufweist. Die Translation der Ergebnisse vom Labor in die Klinik kann teils sensibel gestört sein.

Das Ziel translationaler Forschung ist es, Pathologien, die den Menschen betreffen, mechanistisch zu verstehen und nach Möglichkeit therapeutische Optionen als mögliche Gegenmaßnahmen aufzuzeigen. Entscheidend ist also, wie der Mensch auf einen biologischen Prozess reagiert, in diesem Fall auf einen pathologischen. Entsprechend muss jedes nicht-menschlichen Testsystems, sei es *in vivo* oder *in silico*, welches darauf abzielt eine Voraussage für eine Reaktion im Menschen zu treffen, danach bewertet werden, wie gut es die menschliche Biologie in dem gewählten Kontext abbildet^[236]. Für viele Erkrankungen im Menschen, die grundlagenwissenschaftlich und translational untersucht werden, wird die Maus - unter den gesellschaftlich gegebenen ethischen und finanziellen Möglichkeiten - als angemessenes Surrogat für den Menschen angenommen, obschon das nicht für alle Fachbereiche gleichermaßen zutreffen muss^[236].

Gegen diese Annahme spricht zum Beispiel, dass zum allergrößten Teil ingezüchtete Mauslinien in der Forschung verwendet werden. Diese können homozygot für eine ganze Reihe rezessiver Defekte sein, die z.B. die Regulation der Immunantwort maßgeblich verändern können^[276], ein Umstand, der unter den standardmäßig keimfreien Haltungsbedingungen nicht auffallen muss. Die Inzucht führt darüber hinaus dazu, dass es sich bei den verwendeten Tieren letztlich um Klone eines Individuums handelt, die sich bestenfalls durch das Auftreten spontaner Mutationen voneinander unterscheiden^[276]. Zudem werden in Mausstudien nicht selten nur Tiere eines Geschlechtes und eines bestimmten Alters verwendet. Dem gegenüber wäre es in der klinischen Forschung undenkbar, eine generalisierte Schlussfolgerung aus der Untersuchung eines einzelnen Patienten auf einen Pathomechanismus zu ziehen^[276].

Während das *Mouse Genome Sequencing Consortium* 2002^[179] noch mutmaßte, dass über 90% der Genome von Maus und Mensch korrespondierende Bereiche konservierter Snytänie aufweisen, berichtet die *Mouse Genome Database* der Jackson-Labore^[241] heute (<http://www.informatics.jax.org/homology.shtml>, Stand: 07.12.2018) von 6935 bestätigten in Maus und Mensch homologen Genen, bei jeweils etwas über 30000 Protein-kodierenden Genen in jeder der beiden Spezies. Bedenkt man die evolutionäre Distanz beider Arten, die je nach Quelle auf 65 bis 85 Millionen Jahre geschätzt wird^[63,202], erscheint eine Homologie von ca. 25% nicht unplausibel. Über die Genetik hinaus ist allerdings auch offensichtlich, dass sich Mensch und Maus hinsichtlich Körpergröße, Grundumsatz, Lebenserwartung, ökologischer Nische, Ernährung, Reproduktionsverhalten, Mikrobiom und relevanter Pathogene unterscheiden, um nur einige Punkte zu nennen^[202].

Im Hinblick auf das Immunsystem existieren viele Unterschiede zwischen Mensch und Maus sowohl in der angeborenen, als auch in der adaptiven Immunität. Dies betrifft z.B. das Mischungsverhältnis von Lymphozyten und Neutrophilen im peripheren Blut, Rezeptorexpressionsmuster auf Immunzellen, Expression und Synthese anti-mikrobieller Peptide, Immunglobulinklassen, Hämatopoese und Zelldifferenzierung^[71,177]. Dazu kommt, dass Labormäuse in der Regel unter keimfreien Bedingungen gehalten werden, was der menschlichen Situation ebenfalls nicht gerecht wird. Unter Immunologen kursieren Überlegungen, welche Auswirkungen diese Haltungsbedingungen auf Immunantworten haben kann und wie sich das System verbessern ließe^[280]. Dass diese Unterschiede in der Immunologie beider Spezies ebenso Pathophysiologien beeinflussen können, erscheint ebenfalls nachvollziehbar. Anschauliche Beispiele dafür, wie undurchsichtig die Zusammenhänge hierbei sein können, bieten Multiple Sklerose (bzw. experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis) und Typ-

IV-Allergien. Für beide Modelle existieren Erfolgsgeschichten, in denen die Translation von der Labormaus zum Patienten geglückt ist, allerdings auch Berichte über klinische Studien, die auf Grund der Verschlechterung des Zustandes der Patienten durch die neue Therapie abgebrochen werden mussten^[177].

Generell steht der prognostische Wert von Tiermodellen zunehmend in der Kritik, da nur etwa 4% der vorklinisch identifizierten und getesteten Substanzen am Ende den Patienten erreichen^[205]. Als Hauptursachen für diese geringe Erfolgsquote werden fehlende Effektivität und Sicherheitsprobleme der Substanzen im Menschen genannt, beides Punkte, die im Tierversuch nicht vorhergesagt werden konnten^[3].

Diese grundsätzliche Kritik an der Maus als Modellorganismus bedeutet nicht, dass alle beobachteten Ergebnisse pauschal anzuzweifeln sind. Es soll nur betont werden, dass die Analogie der in der Maus beobachteten Effekte für den Menschen zwar angenommen, selten allerdings bewiesen werden kann^[177]. Konzeptionell ist die vorliegende Arbeit von der translationalen Schwäche der Mausmodelle in vollem Umfang betroffen und entsprechend vorsichtig muss mit der Extrapolation der angestellten Beobachtungen umgegangen werden. Dies betrifft vor allem die immunologischen Gesichtspunkte, insbesondere da über die Unterschiede in der PTX3-Biologie zwischen Mensch und Maus fast nichts bekannt ist.

In der experimentellen Nephrologie gibt es kaum Modelle, die alle Aspekte der human Pathophysiologie und der klinischen Repräsentation detailgetreu abbilden^[20]. Dafür gibt es viele gute Modelle, die zumindest bestimmte Erkrankungsaspekte wiedergeben^[102]. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell der rIRI ist derzeit das am weitesten verbreitet Surrogat für klinisches ANV und Transplantationsstudien^[101]. Der rIRI wird dabei im Vergleich zu anderen Modellen eine relativ hohe klinische Relevanz zugesprochen^[15]. Für die experimentelle akute und chronische Oxalatnephropathie existieren noch keine vergleichenden Studien, welche die Symptomaten und Ursachen in Mensch und Maus systematisch vergleichen. Entsprechend müssen die hier erhobenen Daten kritisch hinsichtlich ihres translationalen Wertes betrachtet werden. Auch die in Abb. 46 gezeigten Daten mahnen dazu, Erkenntnisse aus Experimenten in einem genetischen Hintergrund und in einem Geschlecht nicht auf die Spezies Maus oder Mensch zu generalisieren.

Ungeachtet der konzeptionellen Limitationen, die diese Arbeit mit sich bringt, bleiben noch methodische Unsicherheiten zu erwähnen. Der große Fundus an existierenden Originalarbeiten zur Phänotypisierung von *Ptx3^{+/+}* und *Ptx3^{-/-}* Tieren in verschiedenen Krankheitsmodellen zeigt ganz klar, dass B6;129-*Ptx3^{tm1Mant}* Mäuse kein funktionales Ptx3 exprimieren. Dennoch ergab die kritische Beurteilung dieser *Ptx3*-defizienten Mäuse (Kap. 3.1.2), dass eine Form der *Ptx3* mRNA auch in *Ptx3^{-/-}* Tieren noch transkribiert wurde. Diese mRNA enthält ein Startcodon (ATG) im offenen Leserahmen, das nach der Transkription als interne ribosomale Eintrittsstelle fungieren könnte. Dadurch ergibt sich eine Unsicherheit hinsichtlich aller durchgeführten Experimente, in denen diese Tiere eingesetzt wurden, vor allem solcher, die Negativdaten ergaben (z.B. Kap. 4.5). Es ist nicht auszuschließen, dass die trunkierte mRNA translatiert wird und ein Protein entsteht, das eine teilweise Funktionalität besitzt. In diesem Fall wäre die *Ptx3*-Defizienz zu unrecht angenommen worden und die Ergebnisse müssten in Zweifel gezogen werden. Einen Beweis für diese Hypothese zu erbringen ist schwierig und überstieg die zeitlichen und methodischen Möglichkeit dieser Arbeit, weswegen dieser Punkt an dieser Stelle lediglich zur Diskussion stehen bleiben kann. Folgt man aber dem Gedanken weiter, ist auch nicht auszuschließen, dass das trunkierte *Ptx3* durch entsprechende immunohistochemische Methoden de-

tektiert werden könnte. Wie in Kap. 3.3.2 beschrieben, wurden verschiedene Ptx3-Antikörper getestet, die unspezifische Ergebnisse in *Ptx3*^{-/-} Gewebeschnitten lieferten. Unter Umständen handelte es sich hierbei jedoch um spezifische Signale eines Ptx3-Epitopes, welches in der trunkierten Version des Proteins erhalten geblieben ist.

5.7 Ausblick

Verglichen zu anderen Pentraxinen, wie z.B. CRP, ist PTX3 ein deutlich weniger beforschtes Molekül, zumindest wenn man nur die Anzahl Publikationen zu diesem Thema berücksichtigt (Abb, 56A). Seit seiner Erstbeschreibung 1990 durch Lee et al.^[154] nimmt die Zahl an Publikationen normalisiert auf die Gesamtzahl Publikationen im Feld der angeborenen Immunität kontinuierlich zu (Abb, 56B).

Dieses überproportionale Interesse hat mehrere Gründe. Zum einen verdanken wir mehr als 15% der bis heute (Stand 6.08.2018, 158 von 995) publizierten Originalarbeiten zu PTX3 dem Engagement von Alberto Mantovani, der bis dato der Experte zu diesem Thema ist. Auf diesem Fundament aufbauend wird PTX3 mittlerweile als Therapeutikum oder therapeutisches Target für eine Reihe von Pathologien gehandelt, darunter chronische Lungenentzündung^[178], Atherosklerose^[210] und akuter Myokardinfarkt^[81]. Zum anderen diskutieren Kliniker das Protein zunehmend als vielversprechenden Biomarker, der in manchen Pathologien das deutlich besser etablierte CRP als diagnostisches und prognostisches Hilfsmittel zu verdrängen scheint^[27]. Während der Großteil der publizierten Arbeiten immer noch dem Herz-Kreislauf-System und der Immunologie zuzuordnen sind, hält PTX3 mittlerweile auch Einzug in andere Fächer. Darunter befinden sich Nephrologie, Urologie, Onkologie, aber auch Chirurgie und Psychiatrie (Abb, 56C).

Die Daten dieser Arbeit unterstützen die bisherige Auffassung, dass Ptx3 auch für entzündliche Nierenerkrankungen eine Relevanz besitzt. Auf Grund des engen Zeitfensters, in dem sich protektive Effekte durch die Gabe von exogenem rhPTX3 in Mäusen erzielen lassen, beschränkt sich eine mögliche Anwendung im Menschen auf Szenarien, in denen ein ANV abzusehen ist, z.B. bei der Nierentransplantation.

Darüber hinaus bieten die hier gezeigten Daten eine gute Rationale, um über die bisher in der Literatur beschriebenen Effekte von Ptx3 hinaus zu denken. Mit dem grundsätzlichen Problem in der klinischen Nephrologie, dass ANV-Patienten oft sehr lange beschwerdefrei bleiben und sich daher erst nach Ende der eigentlichen Schädigungsphase beim Nephrologen vorstellen, besteht ein großer Bedarf an therapeutischen Möglichkeiten zur Verbesserung der Nierenregeneration nach Schädigung. Die hier gezeigten Daten zum renalen Ischämie- und Reperfusionsschaden lassen die Hypothese zu, dass eine Neutralisierung von endogenem Ptx3, z.B. durch spezifische Antikörper, in der Regenerationsphase die Infiltration von Immunzellen unterstützt und somit die Heilung unter Umständen beschleunigt. Ein entsprechender Ansatz wurde nach Stand des Wissens weder bei entzündlichen Nierenerkrankungen noch bei anderen Pathologien versucht. Auch die Identifikation von Ptx3 als endogenem Kristallisationsinhibitor bei experimenteller Nephrokalzinose eröffnet neue Perspektiven. Es werden aktuell vermehrt Anstrengungen unternommen, durch genomweite Sequenzierung von Nierensteinpatienten solche Allele zu identifizieren, die die Ausbildung von Nierensteinen begünstigen^[282,222]. Dadurch verspricht man sich nicht nur ein besseres Verständnis der unterschiedlichen Formen der Uro- und Nephrolithiasis, sondern auch neue Diagnose- und Therapieoptionen zum besseren Management dieser Patienten^[270]. Eine entsprechende relevante Fra-

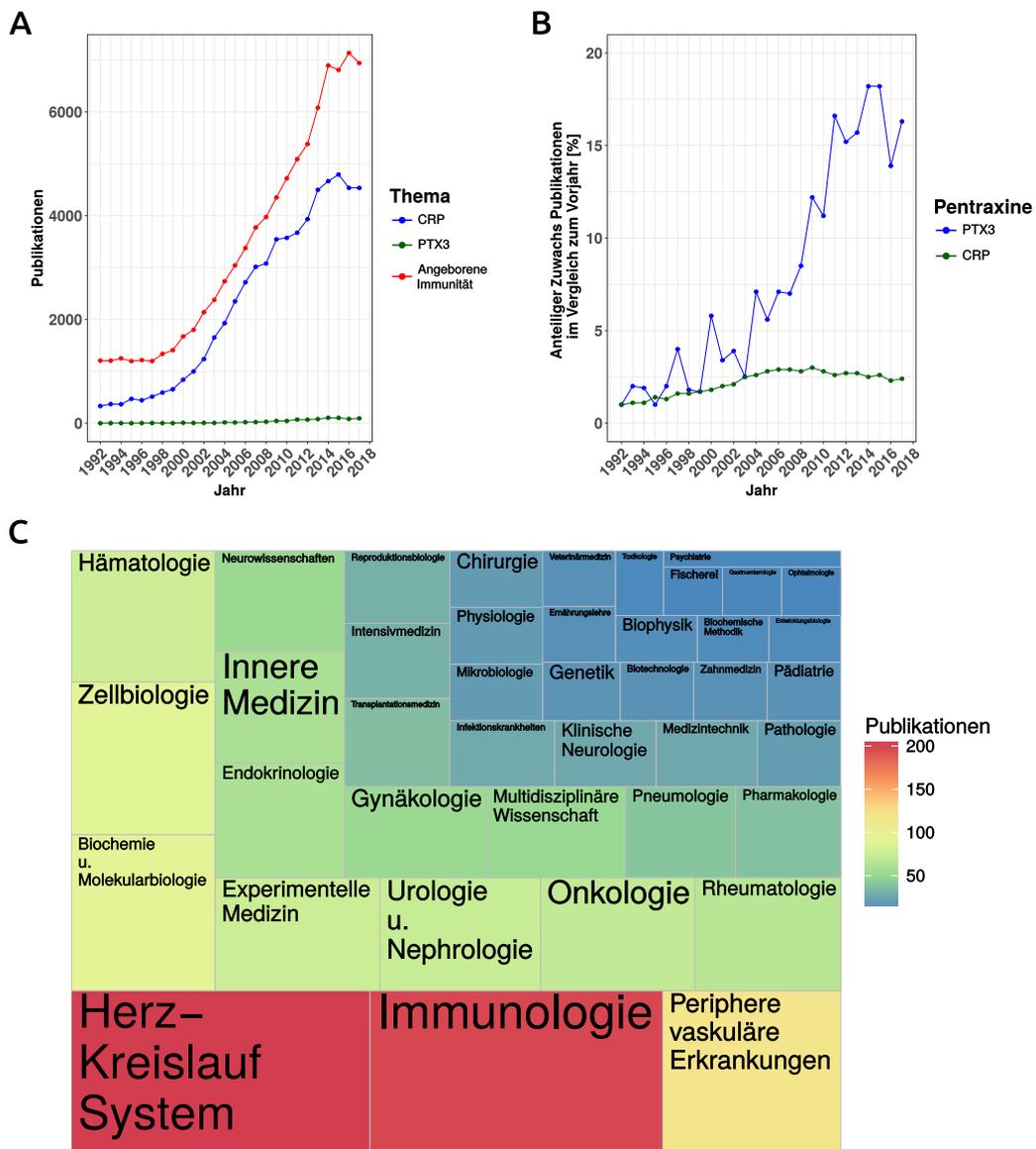


Abbildung 56: Publikationsanalyse zu PTX3. Basierend auf einer Literaturrecherche am 06.08.2018 in *Web of Science* (<https://http://apps.webofknowledge.com>) wurden die folgenden Graphen erstellt. (A) Absolute Publikationszahl zu den Suchbegriffen 'innate immunity', 'C-reactive protein' und 'Pentraxin 3'. (B) Änderung des Anteils der Publikationszahl zu den Suchbegriffen 'C-reactive protein' oder 'Pentraxin 3', jeweils normalisiert auf die Publikationszahl zum Suchbegriff 'innate immunity', gegenüber dem Jahr 1992 ($(PTX3_{JahrX} * 100 / InnateImmunity_{JahrX}) / PTX3_{1992} * 100 / InnateImmunity_{1992}$). (C) Kacheldiagramm zur Veranschaulichung der Anteile jedes Themengebiets an der gesamten Literatur zum Thema PTX3.

gestellung diesbezüglich wäre, ob *Ptx3*-Polymorphismen mit der Suszeptibilität von Individuen für Nierensteinerkrankungen korreliert.

Es scheint derzeit nicht so, als ob die vielschichtige und kontextspezifische Funktionalität von *Ptx3* bereits vollständig verstanden wäre, sodass die nächsten Jahre vermutlich weitere überraschende Erkenntnisse über dieses Protein liefern werden. Dabei wird seine nicht-redundante Rolle im humoralen Arm der angeborenen Immunität auch weiterhin Anlass dafür geben, seine pharmakologische Verwertbarkeit - entweder als Therapeutikum oder als Zielmolekül - auszuloten.

Zusammenfassung

Entzündliche Nierenerkrankungen stellen weltweit eine gesundheitliche Bürde dar. Ein Versagen der Nierenfunktion, egal ob es in akuter oder chronischer Form auftritt, ist potentiell lebensbedrohlich und besonders im chronischen Verlauf aufwendig in der Therapie. Die Rolle des Immunsystems dabei wird immer besser charakterisiert und immunmodulatorische Biomoleküle werden zunehmend Ziel pharmakotherapeutischer Ansätze.

Das Akute-Phase Protein Pentraxin 3 (PTX3) fungiert als Mustererkennungsrezeptor des humoralen Arms des angeborenen Immunsystems. *In vivo* vermittelt Ptx3 u.a. die Phagozytose von bestimmten Mikroorganismen sowie die Neutralisierung von körpereigenen Gefahrensignalen und fungiert als regulatorisches Molekül bei Wundheilungsprozessen und der Rekrutierung von Immunzellen in entzündetes Gewebe. In der klinischen Forschung wächst das Interesse an PTX3 als Bioindikator verschiedenster entzündlicher Erkrankungen. Vorangegangene tierexperimentelle Arbeiten konnten zeigen, dass Ptx3 die Niere nach ischämischer Gewebeschädigung und während der Reperfusion dadurch vor weiteren entzündungsbedingten Schäden schützen kann, dass es die Rekrutierung von Immunzellen in die Nieren unterbindet. Das Immunsystem verursacht aber nicht nur Kollateralschäden bei sterilen Entzündungsreaktionen, sondern hilft auch bei der parenchymalen und mesenchymalen Heilung verletzter Strukturen. Es ist anzunehmen, dass während dieser Regenerationsphase die Blockierung von Immunzellinfiltraten in geschädigte Nieren kontraproduktiv wäre.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Ptx3 in einem weiter gefassten Kontext entzündlicher Nierenerkrankungen als der bisher untersuchten und unter Einbeziehung der Krankheitsdynamik im Zeitverlauf zu beschreiben, um sowohl das therapeutische Fenster als auch das pharmakologische Potential besser abschätzen zu können. Die Hypothesen, die überprüft werden sollten, waren, dass (A) therapeutisch eingesetztes Ptx3 nicht nur im Mausmodell der renalen Ischämie-Reperfusion sondern auch in anderen entzündlichen Nierenmodellen protektiv ist, (B) dieser Effekt letztlich nur bei Intervention in der akuten Schädigungsphase in Kraft tritt, während die therapeutische Intervention mit Ptx3 in der Regenerationsphase nach der Schädigung ungünstige Effekte zeigt, (C) bei einem ebenfalls entzündlichen, chronisch verlaufenden Modell die Rolle von Ptx3 hier - auf Grund der Parallelität von Schädigung und Regeneration - komplexer ist und andere immunmodulatorische Eigenschaften von Ptx3 jenseits seines Einflusses auf die Immunzellrekrutierung zum Tragen kommen.

Nach ausführlicher Charakterisierung der zeitlichen Abfolge von Schädigung und Regeneration nach renaler Ischämie/ Reperfusion wurden entsprechend operierte Tiere mit Abklingen der Schädigungsphase für eine Woche mit rekombinantem humanen PTX3 (rhPTX3) behandelt. Die Phänotypisierung der post-ischämischen Nieren ergab eine deutliche strukturelle Verschlechterung mit einer persistierenden Entzündung. Bei globaler *Ptx3*-Defizienz, welche durch die Verwendung gentechnisch veränderter B6;129-*Ptx3*^{tm1Mant} Mäuse (*Ptx3*^{-/-}) erreicht wurde, und Substitution mit rhPTX3 ausschließlich während der Regenerationsphase konnte parallel zur Phänotypverschlechterung eine Verschiebung der intrarenalen Immunzellpopulation hin zu weniger anti-inflammatorischen

dendritischen Zellen (DC) beobachtet werden. Damit bestätigte sich die Vermutung, dass sich das therapeutische Fenster von rhPTX3 auf die akute Schädigungsphase beschränkt. Andere Mechanismen als die rhPTX3-bedingte Infiltrationsblockade pro-regenerativer und anti-inflammatorischer Immunzellen konnten nicht ausgeschlossen werden.

Der protektive Effekt von rhPTX3 auf das Ausmaß der Gewebeschädigung bei einer akut entzündlichen Nierenpathologie ließ sich im Folgenden auch für das Modell der akuten Oxalatnephropathie bestätigen. Hierbei werden die Nieren in kürzester Zeit mit Oxalsäure übersättigt, so dass im gesamten Parenchym Kalziumoxalatkristalle ausfallen, die nekrotische Gewebeschäden und Entzündung verursachen. Die präemptive Therapie mit einem rhPTX3-Bolus reduzierte die Rekrutierung pro-inflammatorischer Immunzellen, strukturelle Schädigung, Entzündung und Nierenfunktionsverschlechterung. Auch hier war eine Veränderung der intrarenalen DC-Population erkennbar. Die Induktion des akuten Oxalatmodells in *Ptx3*-defizienten Mäusen zeigte, dass endogenes Ptx3 hier kaum eine Rolle spielt. Dennoch kam es zu einer vermehrten Infiltration von pro-inflammatorischen in diesen Tieren, was die eingangs aufgestellte Hypothese hierzu stützt.

Zur Untersuchung der Rolle von Ptx3 bei chronischem Nierenversagen sollte das Ausmaß von Gewebeschädigung und Entzündung in einem Modell untersucht werden, das auf einer langsameren aber dafür kontinuierlichen Übersättigung der Nieren mit Oxalsäure beruht. Die sich entwickelnde Deposition von CaOx-Kristallen in den renalen Tubuli führt ähnlich dem akuten Modell zu nekrotischem Zelltod und Entzündung. Der Vergleich von *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Tieren in diesem Modell ergab, dass endogenes Ptx3 als Kristallisationsinhibitor unter hyperoxaluren Bedingungen fungiert, da nur *Ptx3*^{-/-} Tiere eine Nephrokalzinose entwickelten, während *Ptx3*^{+/+} Mäuse keinen Phänotyp entwickelten. Da die *Ptx3*-kompetenten Tiere dieses gemischten Mausstammes auf Grund der fehlenden Kristalldeposition kein chronisches Nierenversagen entwickelten, konnte eine vergleichende Analyse des Phänotyps mit Hinblick auf die Funktion von Ptx3 nicht sinnvoll durchgeführt werden. Anschließende *in chemico* und *in vitro* Befunde zum Einfluss von rhPTX3 auf CaOx-Kristallwachstum sowie zum Verhalten von primären Tubuluszellen von *Ptx3*^{+/+} und *Ptx3*^{-/-} Mäusen auf die Exposition mit CaOx-Kristallen untermauerten die *in vivo* angestellten Beobachtungen.

Zusammengefasst zeigte sich, dass (A) therapeutisch eingesetztes rhPTX3 auch im Modell der akuten, entzündlichen Oxalatnephropathie protektiv wirkt, (B) ein verspäteter therapeutischer Einsatz von rhPTX3 in der Regenerationsphase nach IRI den Phänotyp verschlechtert und (C) endogenes Ptx3 unter hyperoxaluren Bedingungen als Kristallisations-inhibierendes Molekül fungiert. Diese Erkenntnisse untermauern zum einen die bisher etablierte Rolle, die Ptx3 bei entzündlichen (Nieren-) Erkrankungen spielt. Zum anderen bieten die hier gezeigten Daten eine gute Rationale, um über die bisher in der Literatur beschriebenen Effekte von Ptx3 hinaus zu denken. Das betrifft vornehmlich die Untersuchung des therapeutischen Effektes einer PTX3-Neutralisierung während der Regenerationsphase nach akutem Nierenversagen und die Charakterisierung von *PTX3*-Varianten bei Nierensteinpatienten im Hinblick auf einen zusätzlichen diagnostischen Wert sowie die Suche nach neuen Therapieoptionen basierend auf PTX3.

Literaturverzeichnis

- [1] Abderrahim-Ferkoune, A., Bezy, O., Chiellini, C., Maffei, M., Grimaldi, P., Bonino, F., Moustaid-Moussa, N., Pasqualini, F., Mantovani, A., Ailhaud, G. and Amri, E.-Z. [2003], 'Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNF α -induced secreted protein of adipose cells', *Journal of Lipid Research* 44(5), 994–1000.
- [2] Aggarwal, K. P., Narula, S., Kakkar, M. and Tandon, C. [2013], 'Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators.', *BioMed research international* 2013, 292953.
- [3] Akhtar, A. [2015], 'The Flaws and Human Harms of Animal Experimentation', *Cambridge Quarterly of Healthcare Ethics* 24(4), 407–419.
- [4] Alamani, B. G. and Rimer, J. D. [2017], 'Molecular modifiers of kidney stones', *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 26(4), 1.
- [5] Alge, J. L. and Arthur, J. M. [2015], 'Biomarkers of AKI: a review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications.', *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 10(1), 147–55.
- [6] Allam, R., Kumar, S. V. R., Darisipudi, M. N. and Anders, H. J. [2014], 'Extracellular histones in tissue injury and inflammation', *Journal of Molecular Medicine* 92(5), 465–472.
- [7] Alles, V. V., Bottazzi, B., Peri, G., Golay, J., Introna, M. and Mantovani, A. [1994], 'Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes.', *Blood* 84(10), 3483–93.
- [8] Altmeyer, A., Klampfer, L., Goodman, A. R. and Vilcek, J. [1995], 'Promoter structure and transcriptional activation of the murine TSG-14 gene encoding a tumor necrosis factor/interleukin-1-inducible pentraxin protein.', *The Journal of biological chemistry* 270(43), 25584–90.
- [9] Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. and Zychlinsky, A. [2012], 'Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease', *Annual Review of Immunology* 30(1), 459–489.
- [10] Anders, H.-J. [2013], 'The immune system modulates kidney regeneration'.
- [11] Anders, H.-J. and Ryu, M. [2011], 'Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis.', *Kidney international* 80(9), 915–25.
- [12] Anders, H.-J. and Schaefer, L. [2014], 'Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25(7), 1387–400.
- [13] Andersson, K. B., Florholmen, G., Winer, L. H., Tønnessen, T. and Christensen, G. [2006], 'Regulation of neuronal type genes in congestive heart failure rats.', *Acta physiologica (Oxford, England)* 186(1), 17–27.
- [14] Asselman, M., Verhulst, A., De Broe, M. E. and Verkoelen, C. F. [2003], 'Calcium oxalate crystal adherence to hyaluronan-, osteopontin-, and CD44-expressing injured/regenerating tubular epithelial cells in rat kidneys.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14(12), 3155–66.
- [15] Bao, Y.-W., Yuan, Y., Chen, J.-H. and Lin, W.-Q. [2018], 'Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets.', *Zoological research* 39(2), 72–86.
- [16] Barbati, E., Specchia, C., Vilella, M., Rossi, M. L., Barlera, S., Bottazzi, B., Crociati, L., D'Arienzo, C., Fanelli, R., Garlanda, C., Gori, F., Mango, R., Mantovani, A., Merla, G., Nicolis, E. B., Pietri, S., Presbitero, P., Sudo, Y., Vilella, A. and Franzosi, M. G. [2012], 'Influence of pentraxin 3 (PTX3) genetic variants on myocardial infarction risk and PTX3 plasma levels.', *PLoS one* 7(12), e53030.

- [17] Baruah, P., Dumitriu, I. E., Peri, G., Russo, V., Mantovani, A., Manfredi, A. A. and Rovere-Querini, P. [2006], 'The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells.', *Journal of leukocyte biology* 80(1), 87–95.
- [18] Bas, A., Forsberg, G., Hammarström, S. and Hammarström, M.-L. [2004], 'Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes.', *Scandinavian journal of immunology* 59(6), 566–73.
- [19] Basile, A., Sica, A., D'Aniello, E., Breviario, F., Garrido, G., Castellano, M., Mantovani, A. and Introna, M. [1997], 'Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF-kappaB in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulation.', *The Journal of biological chemistry* 272(13), 8172–8.
- [20] Becker, G. J. and Hewitson, T. D. [2013], 'Animal models of chronic kidney disease: Useful but not perfect', *Nephrology Dialysis Transplantation* 28(10), 2432–2438.
- [21] Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. [2013], *Stryer Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [22] Bergsbaken, T., Fink, S. L. and Cookson, B. T. [2009], 'Pyroptosis: host cell death and inflammation.', *Nature reviews. Microbiology* 7(2), 99–109.
- [23] Bertram, J. F., Douglas-Denton, R. N., Diouf, B., Hughson, M. D. and Hoy, W. E. [2011], 'Human nephron number: implications for health and disease.', *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 26(9), 1529–33.
- [24] Bhasin, B., Ürekli, H. M. and Atta, M. G. [2015], 'Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma.', *World journal of nephrology* 4(2), 235–44.
- [25] Blake, J. A., Eppig, J. T., Kadin, J. A., Richardson, J. E., Smith, C. L., Bult, C. J. and the Mouse Genome Database Group [2017], 'Mouse Genome Database (MGD)-2017: community knowledge resource for the laboratory mouse.', *Nucleic acids research* 45(D1), D723–D729.
- [26] Bolisetty, S. and Agarwal, A. [2009], 'Neutrophils in acute kidney injury: Not neutral any more', *Kidney International* 75(7), 674–676.
- [27] Bonacina, F. [2013], 'The Long Pentraxin PTX3: A Biomarker Spanning From Cardiovascular Disorders to Cancer', *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis* 04(02).
- [28] Bonacina, F., Baragetti, A., Catapano, A. L. and Norata, G. D. [2013], 'Long pentraxin 3: experimental and clinical relevance in cardiovascular diseases.', *Mediators of inflammation* 2013, 725102.
- [29] Bonavita, E., Gentile, S., Rubino, M., Maina, V., Papait, R., Kunderfranco, P., Greco, C., Feruglio, F., Molgora, M., Laface, I., Tartari, S., Doni, A., Pasqualini, F., Barbati, E., Basso, G., Galdiero, M. R., Nebuloni, M., Roncalli, M., Colombo, P., Laghi, L., Lambris, J. D., Jaillon, S., Garlanda, C. and Mantovani, A. [2015], 'PTX3 is an extrinsic onco-suppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer.', *Cell* 160(4), 700–714.
- [30] Bonventre, J. V. and Yang, L. [2011], 'Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury', *Journal of Clinical Investigation* 121(11), 4210–4221.
- [31] Bottazzi, B., Vouret-Craviari, V., Bastone, A., De Gioia, L., Matteucci, C., Peri, G., Spreafico, F., Pausa, M., D'Ettore, C., Gianazza, E., Tagliabue, A., Salmona, M., Tedesco, F., Introna, M. and Mantovani, A. [1997], 'Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component.', *The Journal of biological chemistry* 272(52), 32817–23.
- [32] Bratton, D. L. and Henson, P. M. [2011], 'Neutrophil clearance: When the party is over, clean-up begins', *Trends in Immunology* 32(8), 350–357.
- [33] Braunschweig, A. and Józsi, M. [2011], 'Human pentraxin 3 binds to the complement regulator c4b-binding protein.', *PLoS one* 6(8), e23991.

- [34] Breviario, F., D'Aniello, E. M., Golay, J., Peri, G., Bottazzi, B., Bairoch, A., Saccone, S., Marzella, R., Predazzi, V. and Rocchi, M. [1992], 'Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component.', *The Journal of biological chemistry* 267(31), 22190–7.
- [35] Bult, C. J., Krupke, D. M., Begley, D. A., Richardson, J. E., Neuhauser, S. B., Sundberg, J. P. and Eppig, J. T. [2015], 'Mouse Tumor Biology (MTB): a database of mouse models for human cancer.', *Nucleic acids research* 43(Database issue), D818–24.
- [36] Bussolati, B., Peri, G., Salvidio, G., Verzola, D., Mantovani, A. and Camussi, G. [2003], 'The long pentraxin PTX3 is synthesized in IgA glomerulonephritis and activates mesangial cells.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170(3), 1466–72.
- [37] Calne, R. Y., Alexandre, G. P. and Murray, J. E. [1962], 'A study of the effects of drugs in prolonging survival of homologous renal transplants in dogs.', *Annals of the New York Academy of Sciences* 99, 743–61.
- [38] Camozzi, M., Rusnati, M., Bugatti, A., Bottazzi, B., Mantovani, A., Bastone, A., Inforzato, A., Vincenti, S., Bracci, L., Mastroianni, D. and Presta, M. [2006], 'Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3.', *The Journal of biological chemistry* 281(32), 22605–13.
- [39] Caruso, R., Warner, N., Inohara, N. and Núñez, G. [2014], 'NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease.', *Immunity* 41(6), 898–908.
- [40] Castellano, G., Di Vittorio, A., Dalfino, G., Loverre, A., Marrone, D., Simone, S., Schena, F. P., Pertosa, G. and Grandaliano, G. [2010], 'Pentraxin 3 and complement cascade activation in the failure of arteriovenous fistula', *Atherosclerosis* 209(1), 241–247.
- [41] Cerini, C., Geider, S., Dussol, B., Hennequin, C., Daudon, M., Veessler, S., Nitsche, S., Boistelle, R., Berthézène, P., Dupuy, P., Vazi, A., Berland, Y., Dagorn, J. C. and Verdier, J. M. [1999], 'Nucleation of calcium oxalate crystals by albumin: involvement in the prevention of stone formation.', *Kidney international* 55(5), 1776–86.
- [42] Chaiyarit, S., Mungdee, S. and Thongboonkerd, V. [2010], 'Non-radioactive labelling of calcium oxalate crystals for investigations of crystal-cell interactions and internalization', *Analytical Methods* 2, 1536–1541.
- [43] Chan, B. P. H., Vincent, K., Lajoie, G. A., Goldberg, H. A., Grohe, B. and Hunter, G. K. [2012], 'On the catalysis of calcium oxalate dihydrate formation by osteopontin peptides.', *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 96, 22–8.
- [44] Chang, L. C., Lin, H. S. and Chen, W. C. [2001], 'The reappraisal of nephrocalcin—its role in the inhibition of calcium oxalate crystal growth and interaction with divalent metal ions.', *Urological research* 29(2), 89–93.
- [45] *Chapter 1: Definition and classification of CKD*. [2013], *Kidney international supplements* 3(1), 19–62.
- [46] Chawla, L. S., Eggers, P. W., Star, R. a. and Kimmel, P. L. [2014a], 'Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes.', *The New England journal of medicine* 371(1), 58–66.
- [47] Chawla, L. S., Eggers, P. W., Star, R. a. and Kimmel, P. L. [2014b], 'Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes.', *The New England journal of medicine* 371, 58–66.
- [48] Chawla, L. S. and Kimmel, P. L. [2012], 'Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome', *Kidney International* 82, 516–524.
- [49] Chen, J., Matzuk, M. M., Zhou, X. J. and Lu, C. Y. [2012], 'Endothelial pentraxin 3 contributes to murine ischemic acute kidney injury', *Kidney International* 82(11), 1195–1207.
- [50] Chen, W. C., Lin, H. S., Chen, H. Y., Shih, C. H. and Li, C. W. [2001], 'Effects of Tamm-Horsfall protein and albumin on calcium oxalate crystallization and importance of sialic acids.', *Molecular urology* 5(1), 1–5.
- [51] Chiarini, M., Sabelli, C., Melotti, P., Garlanda, C., Savoldi, G., Mazza, C., Padoan, R., Plebani, A., Mantovani, A., Notarangelo, L. D., Assael, B. M. and Badolato, R. [2010], 'PTX3 genetic variations affect the risk of *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients', *Genes & Immunity* 11(8), 665–670.

- [52] Chong, C. R. and Sullivan, D. J. [2007], 'New uses for old drugs', *Nature* 448(7154), 645–646.
- [53] Chung, J., Granja, I., Taylor, M. G., Mpourmpakis, G., Asplin, J. R. and Rimer, J. D. [2016], 'Molecular modifiers reveal a mechanism of pathological crystal growth inhibition', *Nature* 536(7617), 446–450.
- [54] Cochat, P. and Rumsby, G. [2013], 'Primary hyperoxaluria.', *The New England journal of medicine* 369(7), 649–58.
- [55] Compton, S. J. and Jones, C. G. [1985], 'Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay.', *Analytical biochemistry* 151(2), 369–74.
- [56] Csincsi, Á. I., Kopp, A., Zöldi, M., Bánlaki, Z., Uzonyi, B., Hebecker, M., Caesar, J. J. E., Pickering, M. C., Daigo, K., Hamakubo, T., Lea, S. M., Goicoechea de Jorge, E. and Józsi, M. [2015], 'Factor H-related protein 5 interacts with pentraxin 3 and the extracellular matrix and modulates complement activation.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194(10), 4963–73.
- [57] Cunha, C., Aversa, F., Lacerda, J. F., Busca, A., Kurzai, O., Grube, M., Löffler, J., Maertens, J. A., Bell, A. S., Inforzato, A., Barbati, E., Almeida, B., Santos e Sousa, P., Barbui, A., Potenza, L., Caira, M., Rodrigues, F., Salvatori, G., Pagano, L., Luppi, M., Mantovani, A., Velardi, A., Romani, L. and Carvalho, A. [2014], 'Genetic PTX3 deficiency and aspergillosis in stem-cell transplantation.', *The New England journal of medicine* 370(5), 421–32.
- [58] Dagna, L., Salvo, F., Tiraboschi, M., Bozzolo, E. P., Franchini, S., Doglioni, C., Manfredi, A. A., Baldissera, E. and Sabbadini, M. G. [2011], 'Pentraxin-3 as a marker of disease activity in Takayasu arteritis.', *Annals of internal medicine* 155(7), 425–33.
- [59] Daigo, K., Inforzato, A., Barajon, I., Garlanda, C., Bottazzi, B., Meri, S. and Mantovani, A. [2016], 'Pentraxins in the activation and regulation of innate immunity.', *Immunological reviews* 274(1), 202–217.
- [60] Daigo, K., Nakakido, M., Ohashi, R., Fukuda, R., Matsubara, K., Minami, T., Yamaguchi, N., Inoue, K., Jiang, S., Naito, M., Tsumoto, K. and Hamakubo, T. [2014], 'Protective effect of the long pentraxin PTX3 against histone-mediated endothelial cell cytotoxicity in sepsis.', *Science signaling* 7(343), ra88.
- [61] Dander, E., De Lorenzo, P., Bottazzi, B., Quarello, P., Vinci, P., Balduzzi, A., Masciocchi, F., Bonanomi, S., Cappuzzello, C., Prunotto, G., Pavan, F., Pasqualini, F., Sironi, M., Cuccovillo, I., Leone, R., Salvatori, G., Parma, M., Terruzzi, E., Pagni, F., Locatelli, F., Mantovani, A., Fagioli, F., Biondi, A., Garlanda, C., Valsecchi, M. G., Rovelli, A. and D'Amico, G. [2016], 'Pentraxin 3 plasma levels at graft-versus-host disease onset predict disease severity and response to therapy in children given haematopoietic stem cell transplantation.', *Oncotarget* 7(50), 82123–82138.
- [62] Danobeitia, J. S., Ziemelis, M., Ma, X., Zitur, L. J., Zens, T., Chlebeck, P. J., Van Amersfoort, E. S. and Fernandez, L. A. [2017], 'Complement inhibition attenuates acute kidney injury after ischemia-reperfusion and limits progression to renal fibrosis in mice.', *PloS one* 12(8), e0183701.
- [63] Davis, M. M. [2008], 'A Prescription for Human Immunology', *Immunity* 29(6), 835–838.
- [64] Davis, M. M. [2012], 'Immunology Taught by Humans', *Science Translational Medicine* 4(117), 117fs2–117fs2.
- [65] Deban, L., Jarva, H., Lehtinen, M. J., Bottazzi, B., Bastone, A., Doni, A., Jokiranta, T. S., Mantovani, A. and Meri, S. [2008], 'Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181(12), 8433–40.
- [66] Deban, L., Russo, R. C., Sironi, M., Moalli, F., Scanziani, M., Zambelli, V., Cuccovillo, I., Bastone, A., Gobbi, M., Valentino, S., Doni, A., Garlanda, C., Danese, S., Salvatori, G., Sassano, M., Evangelista, V., Rossi, B., Zenaro, E., Constantin, G., Laudanna, C., Bottazzi, B. and Mantovani, A. [2010], 'Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3.', *Nature immunology* 11(4), 328–334.
- [67] Delbridge, M. S., Shrestha, B. M., Raftery, A. T., El Nahas, A. M. and Haylor, J. L. [2007], 'The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury.', *Transplantation proceedings* 39(10), 2983–5.

- [68] Diamond, J. M., Meyer, N. J., Feng, R., Rushefski, M., Lederer, D. J., Kawut, S. M., Lee, J. C., Cantu, E., Shah, R. J., Lama, V. N., Bhorade, S., Crespo, M., Demissie, E., Sonett, J., Wille, K., Orens, J., Weinacker, A., Weill, D., Arcasoy, S., Shah, P. D., Belperio, J. A., Wilkes, D., Ware, L. B., Palmer, S. M., Christie, J. D. and Lung Transplant Outcomes Group [2012], 'Variation in PTX3 is associated with primary graft dysfunction after lung transplantation.', *American journal of respiratory and critical care medicine* 186(6), 546–52.
- [69] Dias, A. A. M., Goodman, A. R., Dos Santos, J. L., Gomes, R. N., Altmeyer, A., Bozza, P. T., Horta, M. F., Vilcek, J. and Reis, L. F. [2001], 'TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis.', *Journal of leukocyte biology* 69(6), 928–36.
- [70] Diniz, S. N., Nomizo, R., Cisalpino, P. S., Teixeira, M. M., Brown, G. D., Mantovani, a., Gordon, S., Reis, L. F. L. and Dias, a. a. M. [2004], 'PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages.', *Journal of leukocyte biology* 75(4), 649–656.
- [71] Doeing, D. C., Borowicz, J. L. and Crockett, E. T. [2003], 'Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods.', *BMC clinical pathology* 3(1), 3.
- [72] Doni, A., Michela, M., Bottazzi, B., Peri, G., Valentino, S., Polentarutti, N., Garlanda, C. and Mantovani, A. [2006], 'Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma.', *Journal of leukocyte biology* 79(4), 797–802.
- [73] Doni, A., Musso, T., Morone, D., Bastone, A., Zambelli, V., Sironi, M., Castagnoli, C., Cambieri, I., Stravalaci, M., Pasqualini, F., Laface, I., Valentino, S., Tartari, S., Ponzetta, A., Maina, V., Barbieri, S. S., Tremoli, E., Catapano, a. L., Norata, G. D., Bottazzi, B., Garlanda, C. and Mantovani, A. [2015], 'An acidic microenvironment sets the humoral pattern recognition molecule PTX3 in a tissue repair mode', *Journal of Experimental Medicine* .
- [74] El Sebai, A., El Hadidi, E., Al, H. and El Sayed, E. [2016], 'Pentraxin-3 in hemodialysis patients: Relationship to comorbidities', *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* 27(4), 701.
- [75] Erreni, M., Manfredi, A. A., Garlanda, C., Mantovani, A. and Rovere-Querini, P. [2017], 'The long pentraxin PTX3: A prototypical sensor of tissue injury and a regulator of homeostasis.', *Immunological reviews* 280(1), 112–125.
- [76] Etulain, J., Martinod, K., Wong, S. L., Cifuni, S. M., Schattner, M. and Wagner, D. D. [2015], 'P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice', *Blood* 126(2), 242–246.
- [77] Fallaux, F. J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D. J., Hehir, K. M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S. J., van Ormondt, H., van der Eb, A. J., Valerio, D. and Hoeben, R. C. [1998], 'New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses.', *Human gene therapy* 9(13), 1909–17.
- [78] Finger, J. H., Smith, C. M., Hayamizu, T. F., McCright, I. J., Xu, J., Law, M., Shaw, D. R., Baldarelli, R. M., Beal, J. S., Blodgett, O., Campbell, J. W., Corbani, L. E., Lewis, J. R., Forthofer, K. L., Frost, P. J., Giannatto, S. C., Hutchins, L. N., Miers, D. B., Motenko, H., Stone, K. R., Eppig, J. T., Kadin, J. A., Richardson, J. E. and Ringwald, M. [2017], 'The mouse Gene Expression Database (GXD): 2017 update.', *Nucleic acids research* 45(D1), D730–D736.
- [79] Flecknell, P. [2009], *Laboratory Animal Anaesthesia*, 2nd edn, Elsevier, London; San Diego.
- [80] Fong-Ngern, K. and Thongboonkerd, V. [2016], 'Alpha-enolase on apical surface of renal tubular epithelial cells serves as a calcium oxalate crystal receptor.', *Scientific reports* 6(October), 36103.
- [81] Fornai, F., Carrizzo, A., Forte, M., Ambrosio, M., Damato, A., Ferrucci, M., Biagioni, F., Busceti, C., Puca, A. A. and Vecchione, C. [2016], 'The inflammatory protein Pentraxin 3 in cardiovascular disease', *Immunity & Ageing* 13(1), 25.
- [82] Fuller, T. F., Sattler, B., Binder, L., Vetterlein, F., Ringe, B. and Lorf, T. [2001], 'Reduction of severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney grafts by a soluble P-selectin glycoprotein ligand.', *Transplantation* 72(2), 216–22.
- [83] Fülöp, C., Kamath, R. V., Li, Y., Otto, J. M., Salustri, A., Olsen, B. R., Glant, T. T. and Hascall, V. C. [1997], 'Coding sequence, exon-intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding cumulus cell-oocyte complexes', *Gene* 202(1-2), 95–102.

- [84] Gao, B., Yasui, T., Itoh, Y., Li, Z., Okada, A., Tozawa, K., Hayashi, Y. and Kohri, K. [2007], 'Association of osteopontin gene haplotypes with nephrolithiasis.', *Kidney international* 72(5), 592–8.
- [85] Garlanda, C., Bottazzi, B., Bastone, A. and Mantovani, A. [2005], 'Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility.', *Annual review of immunology* 23, 337–66.
- [86] Garlanda, C., Hirsch, E., Bozza, S., Salustri, A., De Acetis, M., Nota, R., Maccagno, A., Riva, F., Bottazzi, B., Peri, G., Doni, A., Vago, L., Botto, M., De Santis, R., Carminati, P., Siracusa, G., Altruda, F., Vecchi, A., Romani, L. and Mantovani, A. [2002], 'Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response.', *Nature* 420(6912), 182–6.
- [87] Garlanda, C., Maina, V., Cotena, A. and Moalli, F. [2009], 'The soluble pattern recognition receptor pentraxin-3 in innate immunity, inflammation and fertility', *Journal of Reproductive Immunology* 83(1-2), 128–133.
- [88] Gewurz, H., Mold, C., Siegel, J. and Fiedel, B. [1982], 'C-reactive protein and the acute phase response.', *Advances in internal medicine* 27, 345–72.
- [89] Gluba, A., Banach, M., Hannam, S., Mikhailidis, D. P., Sakowicz, A. and Rysz, J. [2010], 'The role of Toll-like receptors in renal diseases.', *Nature reviews. Nephrology* 6(4), 224–35.
- [90] Gonçalves, A. D., Alexander, C., Roberts, C. J., Spain, S. G., Uddin, S. and Allen, S. [2016], 'The effect of protein concentration on the viscosity of a recombinant albumin solution formulation', *RSC Advances* 6(18), 15143–15154.
- [91] Goodman, A. R., Levy, D. E., Reis, L. F. and Vilcek, J. [2000], 'Differential regulation of TSG-14 expression in murine fibroblasts and peritoneal macrophages.', *Journal of leukocyte biology* 67(3), 387–95.
- [92] Gordon, S. and Taylor, P. R. [2005], 'Monocyte and macrophage heterogeneity.', *Nature reviews. Immunology* 5(12), 953–64.
- [93] Gottschalk, C. and Kurts, C. [2015], 'The debate about dendritic cells and macrophages in the kidney', *Frontiers in Immunology* 6(SEP), 1–7.
- [94] Grams, M. E. and Rabb, H. [2012], 'The distant organ effects of acute kidney injury', *Kidney International* 81(10), 942–948.
- [95] Günthner, R. and Anders, H.-J. [2013], 'Interferon-regulatory factors determine macrophage phenotype polarization.', *Mediators of inflammation* 2013, 731023.
- [96] Guo, T., Ke, L., Qi, B., Wan, J., Ge, J., Bai, L. and Cheng, B. [2012], 'PTX3 is located at the membrane of late apoptotic macrophages and mediates the phagocytosis of macrophages', *Journal of Clinical Immunology* 32, 330–339.
- [97] Hagemann, J. H., Thomasova, D., Mulay, S. R. and Anders, H.-J. J. [2013], 'Nrf2 signalling promotes ex vivo tubular epithelial cell survival and regeneration via murine double minute (MDM)-2', *Nephrology Dialysis Transplantation* 28(March), 2028–2037.
- [98] Harkness, J. and Wagner, J. [1995], *The biology and medicine of rabbits and rodents.*, 4th edn, Williams and Wilkins.
- [99] Hato, T. and Dagher, P. C. [2015], 'How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble.', *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 10(8), 1459–69.
- [100] Heier, T., Caldwell, J. E., Sessler, D. I. and Miller, R. D. [1991], 'Mild intraoperative hypothermia increases duration of action and spontaneous recovery of vecuronium blockade during nitrous oxide-isoflurane anesthesia in humans.', *Anesthesiology* 74(5), 815–819.
- [101] Hesketh, E. E., Czopek, A., Clay, M., Borthwick, G., Ferenbach, D., Kluth, D. and Hughes, J. [2014], 'Renal ischaemia reperfusion injury: a mouse model of injury and regeneration.', *Journal of visualized experiments : JoVE* (88).
- [102] Hewitson, T. D., Ono, T. and Becker, G. J. [2009], 'Small animal models of kidney disease: a review.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 466, 41–57.

- [103] Hoppe, B. [2012], 'An update on primary hyperoxaluria.', *Nature reviews. Nephrology* 8(8), 467–75.
- [104] Hossain, M. A., Russell, J. C., O'Brien, R. and Lattera, J. [2004], 'Neuronal pentraxin 1: a novel mediator of hypoxic-ischemic injury in neonatal brain.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(17), 4187–96.
- [105] Hsu, Y. C. and Perin, M. S. [1995], 'Human neuronal pentraxin II (NPTX2): conservation, genomic structure, and chromosomal localization.', *Genomics* 28(2), 220–7.
- [106] Huen, S. C. and Cantley, L. G. [2017], 'Macrophages in Renal Injury and Repair'.
- [107] Hung, T.-W., Tsai, J.-P., Lin, S.-H., Lee, C.-H., Hsieh, Y.-H. and Chang, H.-R. [2016], 'Pentraxin 3 Activates JNK Signaling and Regulates the Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Renal Fibrosis.', *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 40(5), 1029–1038.
- [108] Huo, Y. and Xia, L. [2009a], 'P-selectin glycoprotein ligand-1 plays a crucial role in the selective recruitment of leukocytes into the atherosclerotic arterial wall.', *Trends in cardiovascular medicine* 19(4), 140–5.
- [109] Huo, Y. and Xia, L. [2009b], 'P-selectin Glycoprotein Ligand-1 Plays a Crucial Role in the Selective Recruitment of Leukocytes Into the Atherosclerotic Arterial Wall', *Trends in Cardiovascular Medicine* 19(4), 140–145.
- [110] Inforzato, A., Baldock, C., Jowitt, T. A., Holmes, D. F., Lindstedt, R., Marcellini, M., Riviaccio, V., Briggs, D. C., Kadler, K. E., Verdoliva, A., Bottazzi, B., Mantovani, A., Salvatori, G. and Day, A. J. [2010], 'The angiogenic inhibitor long pentraxin PTX3 forms an asymmetric octamer with two binding sites for FGF2', *Journal of Biological Chemistry* 285(23), 17681–17692.
- [111] Inforzato, A., Peri, G., Doni, A., Garlanda, C., Mantovani, A., Bastone, A., Carpentieri, A., Amoresano, A., Pucci, P., Roos, A., Daha, M. R., Vincenti, S., Gallo, G., Carminati, P., De Santis, R. and Salvatori, G. [2006], 'Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: Fine-tuning of the Interaction with C1q and Complement Activation', *Biochemistry* 45(38), 11540–11551.
- [112] Inforzato, A., Reading, P. C., Barbati, E., Bottazzi, B., Garlanda, C. and Mantovani, A. [2012], 'The β weet β ide of a long pentraxin: How glycosylation affects PTX3 functions in innate immunity and inflammation', *Frontiers in Immunology* 3(JAN), 1–12.
- [113] Inforzato, A., Riviaccio, V., Morreale, A. P., Bastone, A., Salustri, A., Scarchilli, L., Verdoliva, A., Vincenti, S., Gallo, G., Chiapparino, C., Pacello, L., Nucera, E., Serlupi-Crescenzi, O., Day, A. J., Bottazzi, B., Mantovani, A., De Santis, R. and Salvatori, G. [2008], 'Structural characterization of PTX3 disulfide bond network and its multimeric status in cumulus matrix organization.', *The Journal of biological chemistry* 283(15), 10147–61.
- [114] Inoue, K., Sugiyama, A., Reid, P. C., Ito, Y., Miyauchi, K., Mukai, S., Sagara, M., Miyamoto, K., Satoh, H., Kohno, I., Kurata, T., Ota, H., Mantovani, A., Hamakubo, T., Daida, H. and Kodama, T. [2007], 'Establishment of a high sensitivity plasma assay for human pentraxin3 as a marker for unstable angina pectoris.', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27(1), 161–7.
- [115] Introna, M., Alles, V. V., Castellano, M., Picardi, G., De Gioia, L., Bottazzai, B., Peri, G., Breviario, F., Salmona, M., De Gregorio, L., Dragani, T. a., Srinivasan, N., Blundell, T. L., Hamilton, T. a., Mantovani, A., Gioia, L. D., Bottazzai, B., Peri, G., Breviario, F., Gregorio, L. D., Srinivasan, N. and Mantovani, A. [1996], 'Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites.', *Blood* 87(5), 1862–72.
- [116] Introna, M., Alles, V. V., Castellano, M., Picardi, G., De Gioia, L., Bottazzai, B., Peri, G., Breviario, F., Salmona, M., De Gregorio, L., Dragani, T. a., Srinivasan, N., Blundell, T. L., Hamilton, T. a., Mantovani, A., Gioia, L. D., Bottazzai, B., Peri, G., Breviario, F., Gregorio, L. D., Srinivasan, N., Mantovani, A., Alles, V. V., Castellano, M., Picardi, G., De Gioia, L., Bottazzai, B., Peri, G., Breviario, F., Salmona, M., De Gregorio, L., Dragani, T. a., Srinivasan, N., Blundell, T. L., Hamilton, T. a., Mantovani, A., Gioia, L. D., Bottazzai, B., Peri, G., Breviario, F., Gregorio, L. D., Srinivasan, N. and Mantovani, A. [1996], 'Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites.', *Blood* 87(5), 1862–1872.

- [117] Italiani, P. and Boraschi, D. [2014], 'From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation', *Frontiers in Immunology* 5.
- [118] Jaillon, S., Jeannin, P., Hamon, Y., Frémaux, I., Doni, A., Bottazzi, B., Blanchard, S., Subra, J.-F., Chevailler, A., Mantovani, A. and Delneste, Y. [2009], 'Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages', *Cell Death and Differentiation* 16173(10), 465–474.
- [119] Jaillon, S., Moalli, F., Ragnarsdottir, B., Bonavita, E., Puthia, M., Riva, F., Barbati, E., Nebuloni, M., CvetkoKrajinovic, L., Markotic, A., Valentino, S., Doni, A., Tartari, S., Graziani, G., Montanelli, A., Delneste, Y., Svanborg, C., Garlanda, C. and Mantovani, A. [2014], 'The humoral pattern recognition molecule PTX3 is a key component of innate immunity against urinary tract infection', *Immunity* 40(4), 621–632.
- [120] Jaillon, S., Peri, G., Delneste, Y., Frémaux, I., Doni, A., Moalli, F., Garlanda, C., Romani, L., Gascan, H., Bellocchio, S., Bozza, S., Cassatella, M. a., Jeannin, P. and Mantovani, A. [2007], 'The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps.', *The Journal of experimental medicine* 204(4), 793–804.
- [121] Jaillon, S., Ponzetta, A., Magrini, E., Barajon, I., Barbagallo, M., Garlanda, C. and Mantovani, A. [2016], 'Fluid phase recognition molecules in neutrophil-dependent immune responses', *Seminars in Immunology* 5, 1–10.
- [122] Janeway, C. a. and Medzhitov, R. [2002], 'Innate immune recognition.', *Annual review of immunology* 20(2), 197–216.
- [123] Jansen, M. P., Emal, D., Teske, G. J., Dessing, M. C., Florquin, S. and Roelofs, J. J. [2017], 'Release of extracellular DNA influences renal ischemia reperfusion injury by platelet activation and formation of neutrophil extracellular traps', *Kidney International* 91(2), 352–364.
- [124] Janssen, U., Thomas, G., Glant, T. and Phillips, A. [2001], 'Expression of inter-alpha-trypsin inhibitor and tumor necrosis factor-stimulated gene 6 in renal proximal tubular epithelial cells.', *Kidney international* 60(1), 126–36.
- [125] Jaques, L. W., Brown, E. B., Barrett, J. M. and Brey WS Jr Weltner, W. [1977], 'Sialic acid. A calcium-binding carbohydrate.', *The Journal of biological chemistry* 252(13), 4533–8.
- [126] Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Cook, P. C., Jones, L. H., Finkelman, F. D., van Rooijen, N., MacDonald, A. S. and Allen, J. E. [2011], 'Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation.', *Science (New York, N.Y.)* 332(6035), 1284–8.
- [127] Jennette, J., D'Agati, V., Olson, J. and Silva, F. [2014], *Heptinstall's Pathology of the Kidney*, 7th edn, Lippincott Williams&Wilki.
- [128] Jennette, J., Olson, J., Silva, F. and D'Agati, V. [2015], *Heptinstall's Pathology of the Kidney*, 7th editio edn, Lippincott Williams & Wilkins.
- [129] Jo, S. K., Rosner, M. H. and Okusa, M. D. [2007], 'Pharmacologic treatment of acute kidney injury: why drugs haven't worked and what is on the horizon.', *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2(2), 356–65.
- [130] Jung, T., Sheng, X., Choi, C. K., Kim, W.-S., Wesson, J. A. and Ward, M. D. [2004], 'Probing crystallization of calcium oxalate monohydrate and the role of macromolecule additives with in situ atomic force microscopy.', *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 20(20), 8587–96.
- [131] Just, B., Delva, E., Camus, Y. and Lienhart, a. [1992], 'Oxygen uptake during recovery following naloxone. Relationship with intraoperative heat loss.', *Anesthesiology* 76(1), 60–64.
- [132] Kanda, R., Hamada, C., Kaneko, K., Nakano, T., Wakabayashi, K., Io, H., Horikoshi, S. and Tomino, Y. [2013], 'Pentraxin 3 as a new biomarker of peritoneal injury in peritoneal dialysis patients.', *Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs* 16(1), 66–73.
- [133] Kim, H. J., Moradi, H., Yuan, J., Norris, K. and Vaziri, N. D. [2009], 'Renal mass reduction results in accumulation of lipids and dysregulation of lipid regulatory proteins in the remnant kidney.', *American journal of physiology. Renal physiology* 296(6), F1297–306.

- [134] Kim, M. G., Su Boo, C., Sook Ko, Y., Young Lee, H., Yong Cho, W., Kyu Kim, H. and Jo, S. K. [2010], 'Depletion of kidney CD11c+ F4/80+ cells impairs the recovery process in ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury', *Nephrology Dialysis Transplantation* 25(9), 2908–2921.
- [135] Kinsey, G. R., Li, L. and Okusa, M. D. [2008], 'Inflammation in Acute Kidney Injury', *Nephron Experimental Nephrology* 109(4), e102–e107.
- [136] Kinsey, G. R., Sharma, R. and Okusa, M. D. [2013], 'Regulatory T cells in AKI.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 24(11), 1720–6.
- [137] Knauf, F., Asplin, J. R., Granja, I., Schmidt, I. M., Moeckel, G. W., David, R. J., Flavell, R. a. and Aronson, P. S. [2013], 'NALP3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy.', *Kidney international* pp. 1–7.
- [138] Köhl, J. [2006], 'The role of complement in danger sensing and transmission.', *Immunologic research* 34(2), 157–76.
- [139] Kotooka, N., Inoue, T., Aoki, S., Anan, M., Komoda, H. and Node, K. [2008], 'Prognostic value of pentraxin 3 in patients with chronic heart failure.', *International journal of cardiology* 130(1), 19–22.
- [140] Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. [2011], 'Pathogen recognition by the innate immune system.', *International reviews of immunology* 30(1), 16–34.
- [141] Kumar, V., Farrell, G., Deganello, S. and Lieske, J. C. [2003], 'Annexin II is present on renal epithelial cells and binds calcium oxalate monohydrate crystals.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14(2), 289–97.
- [142] Kumar, V., Yu, S., Farrell, G., Toback, F. G. and Lieske, J. C. [2004], 'Renal epithelial cells constitutively produce a protein that blocks adhesion of crystals to their surface.', *American journal of physiology. Renal physiology* 287(3), F373–83.
- [143] Kundert, F., Platen, L., Iwakura, T., Zhao, Z., Marschner, J. A. and Anders, H.-J. [2018], 'Immune mechanisms in the different phases of acute tubular necrosis.', *Kidney research and clinical practice* 37(3), 185–196.
- [144] Kurts, C., Panzer, U., Anders, H.-J. and Rees, A. J. [2013], 'The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications.', *Nature reviews. Immunology* 13(10), 738–53.
- [145] Laemmli, U. K. [1970], 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.', *Nature* 227(5259), 680–5.
- [146] Lassen, S., Lech, M., Rommelle, C., Mittrüecker, H.-W., Mak, T. W. and Anders, H.-J. [2010], 'Ischemia Reperfusion Induces IFN Regulatory Factor 4 in Renal Dendritic Cells, which Suppresses Postischemic Inflammation and Prevents Acute Renal Failure', *The Journal of Immunology* 185(3), 1976–1983.
- [147] Latini, R., Maggioni, A. P., Peri, G., Gonzini, L., Lucci, D., Mocarelli, P., Vago, L., Pasqualini, F., Signorini, S., Soldateschi, D., Tarli, L., Schweiger, C., Fresco, C., Cecere, R., Tognoni, G., Mantovani, A. and Lipid Assessment Trial Italian Network (LATIN) Investigators [2004], 'Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction.', *Circulation* 110(16), 2349–54.
- [148] Lazzeri, E., Angelotti, M. L., Peired, A., Conte, C., Marschner, J. A., Maggi, L., Mazzinghi, B., Lombardi, D., Melica, M. E., Nardi, S., Ronconi, E., Sisti, A., Antonelli, G., Becherucci, F., De Chiara, L., Guevara, R. R., Burger, A., Schaefer, B., Annunziato, F., Anders, H.-J., Lasagni, L. and Romagnani, P. [2018], 'Endocycle-related tubular cell hypertrophy and progenitor proliferation recover renal function after acute kidney injury.', *Nature communications* 9(1), 1344.
- [149] Lech, M. and Anders, H.-J. [2013], 'Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair.', *Biochimica et biophysica acta* 1832(7), 989–97.
- [150] Lech, M., Gröbmayer, R., Ryu, M., Lorenz, G., Hartter, I., Mulay, S. R., Susanti, H. E., Kobayashi, K. S., Flavell, R. a. and Anders, H.-J. [2013], 'Macrophage Phenotype Controls Long-Term AKI Outcomes–Kidney Regeneration versus Atrophy.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* pp. 1–13.

- [151] Lech, M., Römmele, C., Gröbmayer, R., Eka Susanti, H., Kulkarni, O. P., Wang, S., Gröne, H.-J., Uhl, B., Reichel, C., Krombach, F., Garlanda, C., Mantovani, A. and Anders, H.-J. [2013], 'Endogenous and exogenous pentraxin-3 limits postischemic acute and chronic kidney injury.', *Kidney international* 83(4), 647–61.
- [152] Lech, M., Römmele, C., Kulkarni, O. P., Susanti, H. E., Migliorini, A., Garlanda, C., Mantovani, A. and Anders, H.-J. [2011], 'Lack of the long pentraxin PTX3 promotes autoimmune lung disease but not glomerulonephritis in murine systemic lupus erythematosus.', *PLoS one* 6(5), e20118.
- [153] Lee, S.-J., Wei, M., Zhang, C., Maxeiner, S., Pak, C., Calado Botelho, S., Trotter, J., Sterky, F. H. and Südhof, T. C. [2017], 'Presynaptic Neuronal Pentraxin Receptor Organizes Excitatory and Inhibitory Synapses.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37(5), 1062–1080.
- [154] Lee, T. H., Lee, G. W., Ziff, E. B. and Vilcek, J. [1990], 'Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts.', *Molecular and cellular biology* 10(5), 1982–8.
- [155] Lee, T. H., Wisniewski, H. G. and Vilcek, J. [1992], 'A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44', *Journal of Cell Biology* 116(2), 545–557.
- [156] Lei, K. J., Liu, T., Zon, G., Soravia, E., Liu, T. Y. and Goldman, N. D. [1985], 'Genomic DNA sequence for human C-reactive protein.', *The Journal of biological chemistry* 260(24), 13377–83.
- [157] Lieske, J. C., Swift, H., Martin, T., Patterson, B. and Toback, F. G. [1994], 'Renal epithelial cells rapidly bind and internalize calcium oxalate monohydrate crystals.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(15), 6987–91.
- [158] Linder, A., Fjell, C., Levin, A., Walley, K. R., Russell, J. A. and Boyd, J. H. [2014], 'Small acute increases in serum creatinine are associated with decreased long-term survival in the critically ill.', *American journal of respiratory and critical care medicine* 189(9), 1075–81.
- [159] Linfert, D., Chowdhry, T. and Rabb, H. [2009], 'Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury.', *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)* 23(1), 1–10.
- [160] Linkermann, A., Bräsen, J. H., Darding, M., Jin, M. K., Sanz, A. B., Heller, J.-O., De Zen, F., Weinlich, R., Ortiz, A., Walczak, H., Weinberg, J. M., Green, D. R., Kunzendorf, U. and Krautwald, S. [2013], 'Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(29), 12024–9.
- [161] Linkermann, A. and Green, D. R. [2014], 'Necroptosis.', *The New England journal of medicine* 370, 455–465.
- [162] Linkermann, A., Stockwell, B. R., Krautwald, S. and Anders, H.-j. [2014], 'Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure.', *Nature reviews. Immunology* 14(11), 759–67.
- [163] Liu, J., Jiang, H. and Liu, X.-Y. [2006], 'How does bovine serum albumin prevent the formation of kidney stone? A kinetics study.', *The journal of physical chemistry. B* 110(18), 9085–9.
- [164] Liu, Q., Wang, X.-Y., Qin, Y.-Y., Yan, X.-L., Chen, H.-M., Huang, Q.-D., Chen, J.-K. and Zheng, J.-M. [2018], 'SPOCD1 promotes the proliferation and metastasis of glioma cells by up-regulating PTX3.', *American journal of cancer research* 8(4), 624–635.
- [165] Lorenz, J. N. and Gruenstein, E. [1999], 'A simple, nonradioactive method for evaluating single-nephron filtration rate using FITC-inulin.', *The American journal of physiology* 276(1 Pt 2), F172–7.
- [166] Mähler, M., Berar, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., Pritchett-Corning, K. and Raspa, M. [2014], 'FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units', *Laboratory Animals* 48(3), 178–192.
- [167] Makris, K. and Spanou, L. [2016], 'Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes.', *The Clinical biochemist. Reviews* 37(2), 85–98.

- [168] Marschner, J. A., Mulay, S. R., Steiger, S., Anguiano, L., Zhao, Z., Boor, P., Rahimi, K., Inforzato, A., Garlanda, C., Mantovani, A. and Anders, H.-J. [2018], 'The Long Pentraxin PTX3 Is an Endogenous Inhibitor of Hyperoxaluria-Related Nephrocalcinosis and Chronic Kidney Disease', *Frontiers in Immunology* 9(September), 1–14.
- [169] Marschner, J. A., Schäfer, H., Holderied, A. and Anders, H.-J. [2016], 'Optimizing Mouse Surgery with Online Rectal Temperature Monitoring and Preoperative Heat Supply. Effects on Post-Ischemic Acute Kidney Injury.', *PLoS one* 11(2), e0149489.
- [170] Martin, P. and Leibovich, S. J. [2005], 'Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly.', *Trends in cell biology* 15(11), 599–607.
- [171] Martinez de la Torre, Y., Fabbri, M., Jaillon, S., Bastone, A., Nebuloni, M., Vecchi, A., Mantovani, A. and Garlanda, C. [2010], 'Evolution of the Pentraxin Family: The New Entry PTX4', *The Journal of Immunology* 184(9), 5055–5064.
- [172] Martinez, F. O. and Gordon, S. [2014], 'The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.', *F1000prime reports* 6, 13.
- [173] Matzinger, P. [1994], 'Tolerance, danger, and the extended family.', *Annual review of immunology* 12, 991–1045.
- [174] Matzinger, P. [2002], 'The danger model: a renewed sense of self.', *Science (New York, N.Y.)* 296(5566), 301–5.
- [175] Maugeri, N., Rovere-Querini, P., Slavich, M., Coppi, G., Doni, A., Bottazzi, B., Garlanda, C., Cianflone, D., Maseri, A., Mantovani, A. and Manfredi, A. A. [2011], 'Early and Transient Release of Leukocyte Pentraxin 3 during Acute Myocardial Infarction', *The Journal of Immunology* 187(2), 970–979.
- [176] Maunsbach, A. B. [1966], 'Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney. Comparison of results from phase contrast, fluorescence and electron microscopy.', *Journal of ultrastructure research* 16(3), 239–58.
- [177] Mestas, J. and Hughes, C. C. W. [2004], 'Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology', *The Journal of Immunology* 172(5), 2731–2738.
- [178] Moalli, F., Paroni, M., Véliz Rodriguez, T., Riva, F., Polentarutti, N., Bottazzi, B., Valentino, S., Mantero, S., Nebuloni, M., Mantovani, A., Bragonzi, A. and Garlanda, C. [2011], 'The therapeutic potential of the humoral pattern recognition molecule PTX3 in chronic lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186(9), 5425–34.
- [179] Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M. R., Brown, D. G., Brown, S. D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R. D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A. T., Church, D. M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F. S., Cook, L. L., Copley, R. R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K. D., Deri, J., Dermitzakis, E. T., Dewey, C., Dickens, N. J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D. M., Eddy, S. R., Elnitski, L., Emes, R. D., Eswara, P., Eyas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G. A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W. N., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Furey, T. S., Gage, D., Gibbs, R. A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T. A., Green, E. D., Gregory, S., Guigó, R., Guyer, M., Hardison, R. C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L. W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D. B., Johnson, L. S., Jones, M., Jones, T. A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E. K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W. J., Kirby, A., Kolbe, D. L., Korf, I., Kucherlapati, R. S., Kulbokas, E. J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J. P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D. R., Mardis, E. R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J. H., McCarthy, M., McCombie, W. R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J. D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J. P., Miller, W., Miner, T. L., Mongin, E., Montgomery, K. T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J. C., Muzny, D. M., Nash, W. E., Nelson, J. O., Nhan, M. N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M. J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K. H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C. S., Poliakov, A., Ponce, T. C., Ponting, C. P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B. A., Roskin, K. M., Rubin, E. M., Rust, A. G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M. S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J. B., Slater, G., Smit, A., Smith, D. R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann,

- N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J. P., Von Niederhausern, A. C., Wade, C. M., Wall, M., Weber, R. J., Weiss, R. B., Wendl, M. C., West, A. P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R. K., Winter, E., Worley, K. C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S.-P., Zdobnov, E. M., Zody, M. C. and Lander, E. S. [2002], 'Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome.', *Nature* 420(6915), 520–62.
- [180] Mulay, S. R. and Anders, H.-J. [2016], 'Crystallopathies', *New England Journal of Medicine* 374(25), 2465–2476.
- [181] Mulay, S. R., Eberhard, J. N., Pfann, V., Marschner, J. A., Darisipudi, M. N., Daniel, C., Romoli, S., Desai, J., Grigorescu, M., Kumar, S. V., Rathkolb, B., Wolf, E., Hrabě de Angelis, M., Bäuerle, T., Dietel, B., Wagner, C. A., Amann, K., Eckardt, K.-U., Aronson, P. S., Anders, H. J. and Knauf, F. [2016], 'Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice', *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 310(8), F785–F795.
- [182] Mulay, S. R., Kulkarni, O. P., Rupanagudi, K. V., Migliorini, A., Darisipudi, M. N., Vilaysane, A., Muruve, D., Shi, Y., Munro, F., Liapis, H. and Anders, H.-J. [2013], 'Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1 β secretion.', *The Journal of clinical investigation* 123(1), 236–46.
- [183] Mulay, S. R., Linkermann, A. and Anders, H.-J. [2016], 'Necroinflammation in Kidney Disease', *Journal of the American Society of Nephrology* 27(1), 27–39.
- [184] Murray, J. E., Merrill, J. P., Harrison, J. H., Wilson, R. E. and Dammin, G. J. [1963], 'Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy.', *The New England journal of medicine* 268, 1315–23.
- [185] Mushi, L., Marschall, P. and FleBa, S. [2015], 'The cost of dialysis in low and middle-income countries: a systematic review.', *BMC health services research* 15, 506.
- [186] Nakagawa, Y., Abram, V. and Coe, F. [1984], 'Isolation of calcium oxalate crystal growth inhibitor from rat kidney and urine', *American Journal of . . .* 247(5), 765–772.
- [187] Nakagawa, Y., Kaiser, E. and Coe, F. [1978], 'Isolation and characterization of calcium oxalate crystal growth inhibitors from human urine', *Biochemical and Biophysical Research Communications* 84(4), 1038–1044.
- [188] Nakagawa, Y. and Margolis, H. [1981], 'Purification and Characterization of a Calcium Oxalate Monohydrate Crystal Growth Inhibitor from Human Kidney Tissue Culture Medium', *Journal of Biological Chemistry* 256(8), 3936–3944.
- [189] Nakazawa, D., Kumar, S. V., Marschner, J., Desai, J., Holderied, A., Rath, L., Kraft, F., Lei, Y., Fukasawa, Y., Moeckel, G. W., Angelotti, M. L., Liapis, H. and Anders, H.-J. [2017], 'Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 28(6), 1753–1768.
- [190] Nakazawa, D., Marschner, J. A., Platen, L. and Anders, H.-j. [2018], 'Extracellular traps in kidney disease', *Kidney International* 94(6), 1087–1098.
- [191] Nancollas, G. and Gardner, G. [1974], 'Kinetics of crystal growth of calcium oxalate monohydrate', *Journal of Crystal Growth* 21(2), 267–276.
- [192] Nauta, A. J., Bottazzi, B., Mantovani, A., Salvatori, G., Kishore, U., Schwaeble, W. J., Gingras, A. R., Tzima, S., Vivanco, F., Egido, J., Tijsma, O., Hack, E. C., Daha, M. R. and Roos, A. [2003], 'Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q.', *European journal of immunology* 33(2), 465–73.
- [193] Nauta, A. J., de Haij, S., Bottazzi, B., Mantovani, A., Borrias, M. C., Aten, J., Rastaldi, M. P., Daha, M. R., van Kooten, C. and Roos, A. [2005], 'Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3.', *Kidney international* 67(2), 543–53.
- [194] Nelson, P. J., Rees, A. J., Griffin, M. D., Hughes, J., Kurts, C. and Duffield, J. [2012], 'The renal mononuclear phagocytic system.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23(2), 194–203.
- [195] Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A. and Thiery, J. P. [2016], 'EMT: 2016.', *Cell* 166(1), 21–45.

- [196] Nowak-Sliwinska, P., Segura, T. and Iruela-Arispe, M. L. [2014], 'The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering.', *Angiogenesis* 17(4), 779–804.
- [197] Okada, A., Nomura, S., Saeki, Y., Higashibata, Y., Hamamoto, S., Hirose, M., Itoh, Y., Yasui, T., Tozawa, K. and Kohri, K. [2008], 'Morphological conversion of calcium oxalate crystals into stones is regulated by osteopontin in mouse kidney.', *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 23(10), 1629–37.
- [198] Olesen, R., Wejse, C., Velez, D. R., Bisseye, C., Sodemann, M., Aaby, P., Rabna, P., Worwui, A., Chapman, H., Diatta, M., Adegbola, R. A., Hill, P. C., Østergaard, L., Williams, S. M. and Sirugo, G. [2007], 'DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans.', *Genes and immunity* 8(6), 456–67.
- [199] Omeis, I. A., Hsu, Y. C. and Perin, M. S. [1996], 'Mouse and human neuronal pentraxin 1 (NPTX1): conservation, genomic structure, and chromosomal localization.', *Genomics* 36(3), 543–5.
- [200] Pau, M., Ophorst, C., Koldijk, M., Schouten, G., Mehtali, M. and Uytdehaag, F. [2001], 'The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines', *Vaccine* 19(17-19), 2716–2721.
- [201] Pearson, T. A., Mensah, G. A., Alexander, R. W., Anderson, J. L., Cannon, R. O., Criqui, M., Fadl, Y. Y., Fortmann, S. P., Hong, Y., Myers, G. L., Rifai, N., Smith, S. C., Taubert, K., Tracy, R. P., Vinicor, F., Centers for Disease Control and Prevention and American Heart Association [2003], 'Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association.', *Circulation* 107(3), 499–511.
- [202] Perlman, R. L. [2016], 'Mouse Models of Human Disease: An Evolutionary Perspective', *Evolution, Medicine, and Public Health* p. eow014.
- [203] Pietsch, A. P., Lindenblatt, N. and Klar, E. [2007], '[Perioperative hypothermia. Impact on wound healing].', *Der Anaesthetist* 56(9), 936–9.
- [204] Pill, J., Issaeva, O., Woderer, S., Sadick, M., Kränzlin, B., Fiedler, F., Klötzer, H.-M., Krämer, U. and Gretz, N. [2006], 'Pharmacological profile and toxicity of fluorescein-labelled sinistrin, a novel marker for GFR measurements.', *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 373(3), 204–11.
- [205] Pippin, J. J. [2012], 'Animal research in medical sciences: seeking a convergence of science, medicine, and animal law', *S. Tex. L. Rev.* 54, 469.
- [206] Pizzolato, P. [1971], 'Mercurous nitrate as a histochemical reagent for calcium phosphate in bone and pathological calcification and for calcium oxalate.', *The Histochemical journal* 3(6), 463–9.
- [207] Polentarutti, N., Picardi, G., Basile, A., Cenzuales, S., Rivolta, A., Matteucci, C., Peri, G., Mantovani, A. and In-trona, M. [1998], 'Interferon-gamma inhibits expression of the long pentraxin PTX3 in human monocytes.', *1. Polentarutti N, Picardi G, Basile A, Cenzuales S, Rivolta A, Matteucci C, et al. Interferon-gamma inhibits expression of the long pentraxin PTX3 in human monocytes. Eur J Immunol. 1998;28: 496–501. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<496::AID-IMMU 28(2), 496–501.*
- [208] Presta, M., Camozzi, M., Salvatori, G. and Rusnati, M. [2007], 'Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology', *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11(4), 723–738.
- [209] Pribiag, H. and Stellwagen, D. [2014], 'Neuroimmune regulation of homeostatic synaptic plasticity.', *Neuropharmacology* 78, 13–22.
- [210] Qiu, L., Xu, R., Wang, S., Li, S., Sheng, H., Wu, J. and Qu, Y. [2015], 'Honokiol ameliorates endothelial dysfunction through suppression of PTX3 expression, a key mediator of IKK/I κ B/NF- κ B, in atherosclerotic cell model.', *Experimental & molecular medicine* 47, e171.
- [211] Rabb, H., Griffin, M. D., McKay, D. B., Swaminathan, S., Pickkers, P., Rosner, M. H., Kellum, J. A. and Ronco, C. [2016], 'Inflammation in AKI: Current Understanding, Key Questions, and Knowledge Gaps', *Journal of the American Society of Nephrology* 27(2), 371–379.

- [212] Rabb, H., Griffin, M. D., McKay, D. B., Swaminathan, S., Pickkers, P., Rosner, M. H., Kellum, J. A., Ronco, C. and Acute Dialysis Quality Initiative Consensus XIII Work Group [2016], 'Inflammation in AKI: Current Understanding, Key Questions, and Knowledge Gaps.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 27(2), 371–9.
- [213] Ratliff, B. B., Rabadi, M. M., Vasko, R., Yasuda, K. and Goligorsky, M. S. [2013], 'Messengers without Borders: Mediators of Systemic Inflammatory Response in AKI', *Journal of the American Society of Nephrology* 24(4), 529–536.
- [214] Reindl-Schwaighofer, R., Kainz, A., Kammer, M., Dumfarth, A. and Oberbauer, R. [2017], 'Survival analysis of conservative vs. dialysis treatment of elderly patients with CKD stage 5.', *PloS one* 12(7), e0181345.
- [215] Robert, F., Hoyt, J., Hawkins, J., Clair, M. and Kennett, M. [2007], Mouse physiology, in J. Fox, S. Barthold, M. Davisson, C. Newcomer, F. Quimby and A. Smith, eds, 'The mouse in biomedical research: normative biology, husbandry, and models.', 2nd edn, Elsevier, London, chapter 2, pp. 23–90.
- [216] Rock, K. L., Latz, E., Ontiveros, F. and Kono, H. [2010], 'The sterile inflammatory response.', *Annual review of immunology* 28, 321–42.
- [217] Rogers, N. M., Ferenbach, D. a., Isenberg, J. S., Thomson, A. W., Hughes, J., Nephrology, N. R., Rogers, N. M., Ferenbach, D. a., Isenberg, J. S., Thomson, A. W., Hughes, J. and Hospital, W. [2014], 'Dendritic cells and macrophages in the kidney: an axis of good and evil', *Nature reviews. Nephrology* .
- [218] Ronca, R., Di Salle, E., Giacomini, A., Leali, D., Alessi, P., Coltrini, D., Ravelli, C., Matarazzo, S., Ribatti, D., Vermi, W. and Presta, M. [2013], 'Long pentraxin-3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells.', *Molecular cancer therapeutics* 12(12), 2760–71.
- [219] Roop-ngam, P., Chaiyarit, S., Pongsakul, N. and Thongboonkerd, V. [2012], 'Isolation and characterizations of oxalate-binding proteins in the kidney', *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424(3), 629–634.
- [220] Rovere, P., Peri, G., Fazzini, F., Bottazzi, B., Doni, A., Bondanza, A., Zimmermann, V. S., Garlanda, C., Fascio, U., Sabbadini, M. G., Rugarli, C., Mantovani, A. and Manfredi, A. A. [2000], 'The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells.', *Blood* 96(13), 4300–6.
- [221] Rovere, P., Peri, G., Fazzini, F., Bottazzi, B., Doni, A., Bondanza, A., Zimmermann, V. S., Garlanda, C., Fascio, U., Sabbadini, M. G., Rugarli, C., Mantovani, A., Manfredi, A. a., Zimmermann, V. S., Garlanda, C., Fascio, U., Sabbadini, M. G., Rugarli, C., Mantovani, A. and Manfredi, A. a. [2000], 'The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells.', *Blood* 96(13), 4300–6.
- [222] Rungroj, N., Nettuwakul, C., Sudtachat, N., Praditsap, O., Sawasdee, N., Sritippayawan, S., Chuawattana, D. and Yenchitsomanus, P.-T. [2014], 'A whole genome SNP genotyping by DNA microarray and candidate gene association study for kidney stone disease.', *BMC medical genetics* 15, 50.
- [223] Ryall, R. L., Chauvet, M. C. and Grover, P. K. [2005], 'Intracrystalline proteins and urolithiasis: a comparison of the protein content and ultrastructure of urinary calcium oxalate monohydrate and dihydrate crystals.', *BJU international* 96(4), 654–63.
- [224] Sabbahy, M. E. and Vaidya, V. S. [2011], 'Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair', *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 3(5), 606–618.
- [225] Salazar, J., Martínez, M. S., Chávez-Castillo, M., Núñez, V., Añez, R., Torres, Y., Toledo, A., Chacín, M., Silva, C., Pacheco, E., Rojas, J. and Bermúdez, V. [2014], 'C-Reactive Protein: An In-Depth Look into Structure, Function, and Regulation', *International Scholarly Research Notices* 2014, 1–11.
- [226] Salio, M., Chimenti, S., Angelis, N. D., Molla, F., Maina, V., Nebuloni, M., Pasqualini, F., Latini, R., Garlanda, C., Mantovani, A., De Angelis, N., Molla, F., Maina, V., Nebuloni, M., Pasqualini, F., Latini, R., Garlanda, C. and Mantovani, A. [2008], 'Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction.', *Circulation* 117(8), 1055–64.

- [227] Salustri, A., Garlanda, C., Hirsch, E., De Acetis, M., Maccagno, A., Bottazzi, B., Doni, A., Bastone, A., Mantovani, G., Beck Peccoz, P., Salvatori, G., Mahoney, D. J., Day, A. J., Siracusa, G., Romani, L. and Mantovani, A. [2004], 'PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization.', *Development (Cambridge, England)* 131(7), 1577–86.
- [228] Samsouandar, J., Moore, R. W. and Kellen, J. A. [1983], 'Enzymatic determination of oxalates.', *Enzyme* 30(4), 273–6.
- [229] Sanchez-Alavez, M., Alboni, S. and Conti, B. [2011], 'Sex- and age-specific differences in core body temperature of C57Bl/6 mice', *Age* 33(1), 89–99.
- [230] Schlimgen, A. K., Helms, J. A., Vogel, H. and Perin, M. S. [1995], 'Neuronal pentraxin, a secreted protein with homology to acute phase proteins of the immune system.', *Neuron* 14(3), 519–26.
- [231] Schock-Kusch, D., Geraci, S., Ermeling, E., Shulhevich, Y., Sticht, C., Hesser, J., Stsepankou, D., Neudecker, S., Pill, J., Schmitt, R. and Melk, A. [2013], 'Reliability of Transcutaneous Measurement of Renal Function in Various Strains of Conscious Mice', *PLoS ONE* 8(8), e71519.
- [232] Schock-Kusch, D., Sadick, M., Henninger, N., Kraenzlin, B., Claus, G., Kloetzer, H.-M. M., Weiss, C., Pill, J., Gretz, N., Weiß, C., Pill, J. and Gretz, N. [2009], 'Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats', *Nephrology Dialysis Transplantation* 24(May), 2997–3001.
- [233] Schock-Kusch, D., Xie, Q., Shulhevich, Y., Hesser, J., Stsepankou, D., Sadick, M., Koenig, S., Hoecklin, F., Pill, J. and Gretz, N. [2011], 'Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-sinistrin disappearance curves.', *Kidney international* 79(11), 1254–1258.
- [234] Schreiber, A., Shulhevich, Y., Geraci, S., Hesser, J., Stsepankou, D., Neudecker, S., Koenig, S., Heinrich, R., Hoecklin, F., Pill, J., Friedemann, J., Schweda, F., Gretz, N. and Schock-Kusch, D. [2012], 'Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice.', *American journal of physiology. Renal physiology* 303(5), F783–8.
- [235] Seong, S.-Y. and Matzinger, P. [2004], 'Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses.', *Nature reviews. Immunology* 4(6), 469–78.
- [236] Shanks, N., Greek, R. and Greek, J. [2009], 'Are animal models predictive for humans?', *Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine* 4(1), 1–20.
- [237] Shen, H., Kreisel, D. and Goldstein, D. R. [2013], 'Processes of Sterile Inflammation', *The Journal of Immunology* 191(6), 2857–2863.
- [238] Sheng, X., Ward, M. D. and Wesson, J. A. [2005], 'Crystal surface adhesion explains the pathological activity of calcium oxalate hydrates in kidney stone formation.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16(7), 1904–8.
- [239] Silk, E., Zhao, H., Weng, H. and Ma, D. [2017], 'The role of extracellular histone in organ injury', *Cell death & disease* 8(5), e2812.
- [240] Singh, R. K., Liang, D., Gajjalaiahvari, U. R., Kabbaj, M.-H. M., Paik, J. and Gunjan, A. [2010], 'Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms', *Cell Cycle* 9(20), 4236–4244.
- [241] Smith, C. L., Blake, J. A., Kadin, J. A., Richardson, J. E., Bult, C. J. and Mouse Genome Database Group [2018], 'Mouse Genome Database (MGD)-2018: knowledgebase for the laboratory mouse.', *Nucleic acids research* 46(D1), D836–D842.
- [242] Soares, A. C., Souza, D. G., Pinho, V., Vieira, A. T., Nicoli, J. R., Cunha, F. Q., Mantovani, A., Reis, L. F. L., Dias, A. A. M. and Teixeira, M. M. [2006], 'Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice.', *Microbes and infection* 8(5), 1321–9.
- [243] Souza, D. G., Amaral, F. a., Fagundes, C. T., Coelho, F. M., Arantes, R. M. E., Sousa, L. P., Matzuk, M. M., Garlanda, C., Mantovani, A., Dias, A. a. and Teixeira, M. M. [2009], 'The long pentraxin PTX3 is crucial for tissue inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in mice.', *The American journal of pathology* 174(4), 1309–1318.

- [244] Souza, D. G., Soares, A. C., Pinho, V., Torloni, H., Reis, L. F. L., Teixeira, M. M., Dias, A. A. M., Martins, M. T. and Dias, A. A. M. [2002], 'Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury.', *The American journal of pathology* 160(5), 1755–1765.
- [245] Stamp, L. K., Chapman, P. T. and Palmer, S. C. [2016], 'Allopurinol and kidney function: An update.', *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 83(1), 19–24.
- [246] Star, R. A. [1998], 'Treatment of acute renal failure', *Kidney International* 54(6), 1817–1831.
- [247] Steiger, S., Kumar, S. V., Honarpisheh, M., Lorenz, G., Günthner, R., Romoli, S., Gröbmayer, R., Susanti, H.-E., Potempa, J., Koziel, J. and Lech, M. [2017], 'Immunomodulatory Molecule IRAK-M Balances Macrophage Polarization and Determines Macrophage Responses during Renal Fibrosis', *The Journal of Immunology* p. j1601982.
- [248] Suliman, M. E., Yilmaz, M. I., Carrero, J. J., Qureshi, A. R., Saglam, M., Ipcioglu, O. M., Yenicesu, M., Tong, M., Heimbürger, O., Barany, P., Alvestrand, A., Lindholm, B. and Stenvinkel, P. [2008], 'Novel Links between the Long Pentraxin 3, Endothelial Dysfunction, and Albuminuria in Early and Advanced Chronic Kidney Disease', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3(4), 976–985.
- [249] Susantitaphong, P., Cruz, D. N., Cerda, J., Abulfaraj, M., Alqahtani, F., Koulouridis, I., Jaber, B. L. and Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of Nephrology [2013], 'World incidence of AKI: a meta-analysis.', *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 8(9), 1482–93.
- [250] Sutton, T. A., Kelly, K. J., Mang, H. E., Plotkin, Z., Sandoval, R. M. and Dagher, P. C. [2005], 'Minocycline reduces renal microvascular leakage in a rat model of ischemic renal injury.', *American journal of physiology. Renal physiology* 288(1), F91–7.
- [251] Swanson, A., Wolf, T., Sitzmann, A. and Willette, A. A. [2018], 'Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Pleiotropic roles for cytokines and neuronal pentraxins.', *Behavioural brain research* 347, 49–56.
- [252] Takada, M., Nadeau, K. C., Shaw, G. D., Marquette, K. A. and Tilney, N. L. [1997], 'The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand.', *The Journal of clinical investigation* 99(11), 2682–90.
- [253] Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. [2003], 'Toll-like receptors.', *Annual review of immunology* 21, 335–76.
- [254] Takeuchi, O. and Akira, S. [2010a], 'Pattern recognition receptors and inflammation.', *Cell* 140(6), 805–820.
- [255] Takeuchi, O. and Akira, S. [2010b], 'Pattern recognition receptors and inflammation.', *Cell* 140(6), 805–20.
- [256] Taylor, D. K. [2007], 'Study of two devices used to maintain normothermia in rats and mice during general anesthesia.', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 46(5), 37–41.
- [257] Tecklenborg, J., Clayton, D., Siebert, S. and Coley, S. M. [2018a], 'The role of the immune system in kidney disease.', *Clinical and experimental immunology* 192(2), 142–150.
- [258] Tecklenborg, J., Clayton, D., Siebert, S. and Coley, S. M. [2018b], 'The role of the immune system in kidney disease.', *Clinical and experimental immunology* 192(2), 142–150.
- [259] Terryn, S., Jouret, F., Vandenabeele, F., Smolders, I., Moreels, M., Devuyt, O., Steels, P. and Kerkhove, E. V. [2007], 'A primary culture of mouse proximal tubular cells, established on collagen-coated membranes', *AJP: Renal Physiology* 293(2), F476–F485.
- [260] Thadhani, R., Pascual, M. and Bonventre, J. V. [1996], 'Acute renal failure.', *The New England journal of medicine* 334(22), 1448–60.
- [261] Thongboonkerd, V., Semangoen, T. and Chutipongtanate, S. [2006], 'Factors determining types and morphologies of calcium oxalate crystals: Molar concentrations, buffering, pH, stirring and temperature', *Clinica Chimica Acta* 367(1-2), 120–131.

- [262] Thongboonkerd, V., Semangoen, T., Sinchaikul, S. and Chen, S.-t. [2008], 'Proteomic analysis of calcium oxalate monohydrate crystal-induced cytotoxicity in distal renal tubular cells.', *Journal of proteome research* 7(11), 4689–700.
- [263] Tonelli, M. [2006], 'Chronic Kidney Disease and Mortality Risk: A Systematic Review', *Journal of the American Society of Nephrology* 17(7), 2034–2047.
- [264] Umekawa, T., Iguchi, M., Uemura, H. and Khan, S. R. [2006], 'Oxalate ions and calcium oxalate crystal-induced up-regulation of osteopontin and monocyte chemoattractant protein-1 in renal fibroblasts', *BJU International* 98(3), 656–660.
- [265] Uzun, S., Ozari, M., Gursu, M., Karadag, S., Behlul, A., Sari, S., Koldas, M., Demir, S., Karaali, Z. and Ozturk, S. [2016], 'Changes in the inflammatory markers with advancing stages of diabetic nephropathy and the role of pentraxin-3', *Renal Failure* 38(8), 1193–1198.
- [266] Valeri, C. R., Feingold, H., Cassidy, G., Ragno, G., Khuri, S. and Altschule, M. D. [1987], 'Hypothermia-induced reversible platelet dysfunction.', *Annals of surgery* 205(2), 175–181.
- [267] van Rossum, A. P., Fazzini, F., Limburg, P. C., Manfredi, A. A., Rovere-Querini, P., Mantovani, A. and Kallenberg, C. G. M. [2004], 'The prototypic tissue pentraxin PTX3, in contrast to the short pentraxin serum amyloid P, inhibits phagocytosis of late apoptotic neutrophils by macrophages.', *Arthritis and rheumatism* 50(8), 2667–74.
- [268] Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. and Vandenabeele, P. [2014], 'Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways.', *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(February), 135–47.
- [269] Varani, S., Elvin, J. A., Yan, C., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Horton, H. F., Byrne, M. C. and Matzuk, M. M. [2002], 'Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility.', *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 16(6), 1154–67.
- [270] Vasudevan, V., Samson, P., Smith, A. D. and Okeke, Z. [2017], 'The genetic framework for development of nephrolithiasis.', *Asian journal of urology* 4(1), 18–26.
- [271] Venkatachalam, M. A., Griffin, K. A., Lan, R., Geng, H., Saikumar, P. and Bidani, A. K. [2010], 'Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease.', *American journal of physiology. Renal physiology* 298(5), F1078—94.
- [272] Verhulst, A., Asselman, M., Persy, V. P., Schepers, M. S. J., Helbert, M. F., Verkoelen, C. F. and De Broe, M. E. [2003], 'Crystal retention capacity of cells in the human nephron: involvement of CD44 and its ligands hyaluronic acid and osteopontin in the transition of a crystal binding- into a nonadherent epithelium.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14(1), 107–15.
- [273] Verkoelen, C. F., van der Boom, B. G., Kok, D. J. and Romijn, J. C. [2000], 'Sialic acid and crystal binding', *Kidney International* 57(3), 1072–1082.
- [274] Verma, S. K. and Molitoris, B. A. [2015], 'Renal endothelial injury and microvascular dysfunction in acute kidney injury.', *Seminars in nephrology* 35(1), 96–107.
- [275] Viswanathan, P., Rimer, J. D., Kolbach, A. M., Ward, M. D., Kleinman, J. G. and Wesson, J. A. [2011], 'Calcium oxalate monohydrate aggregation induced by aggregation of desialylated Tamm-Horsfall protein.', *Urological research* 39(4), 269–82.
- [276] von Herrath, M. G. and Nepom, G. T. [2005], 'Lost in translation: barriers to implementing clinical immunotherapeutics for autoimmunity.', *The Journal of experimental medicine* 202(9), 1159–62.
- [277] Wallach, D., Kang, T.-B. and Kovalenko, A. [2014], 'Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective.', *Nature reviews. Immunology* 14(1), 51–9.
- [278] Wang, N., Liang, H. and Zen, K. [2014], 'Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance.', *Frontiers in immunology* 5, 614.

- [279] Weller, S., Varrier, M. and Ostermann, M. [2017], 'Lymphocyte Function in Human Acute Kidney Injury.', *Nephron* 137(4), 287–293.
- [280] Willyard, C. [2018], 'Squeaky clean mice could be ruining research', *Nature* 556(7699), 16–18.
- [281] Wiseman, A. C. [2016], 'Immunosuppressive Medications.', *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 11(2), 332–43.
- [282] Wolf, M. T. F., Zalewski, I., Martin, F. C., Ruf, R., Müller, D., Hennies, H. C., Schwarz, S., Panther, F., Attanasio, M., Acosta, H. G., Imm, A., Lucke, B., Utsch, B., Otto, E., Nurnberg, P., Nieto, V. G. and Hildebrandt, F. [2005], 'Mapping a new suggestive gene locus for autosomal dominant nephrolithiasis to chromosome 9q33.2-q34.2 by total genome search for linkage.', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 20(5), 909–14.
- [283] Worcester, E. M. and Coe, F. L. [2010], 'Clinical practice. Calcium kidney stones.', *The New England journal of medicine* 363(10), 954–63.
- [284] Wu, P., Li, X., Zhou, T., Zhang, M.-J., Chen, J.-L., Wang, W.-M., Chen, N. and Dong, D.-C. [2000], 'Role of P-selectin and anti-P-selectin monoclonal antibody in apoptosis during hepatic/renal ischemia reperfusion injury.', *World journal of gastroenterology* 6(2), 244–247.
- [285] Wynn, T. A. [2008], 'Cellular and molecular mechanisms of fibrosis.', *The Journal of pathology* 214(2), 199–210.
- [286] Xu, D., Hopf, C., Reddy, R., Cho, R. W., Guo, L., Lanahan, A., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., O'Brien, R. J. and Worley, P. [2003], 'Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity.', *Neuron* 39(3), 513–28.
- [287] Xu, T., Zhang, L., Geng, Z. H., Wang, H.-B., Wang, J.-T., Chen, M. and Geng, J.-G. [2007], 'P-selectin cross-links PSGL-1 and enhances neutrophil adhesion to fibrinogen and ICAM-1 in a Src kinase-dependent, but GPCR-independent mechanism.', *Cell adhesion & migration* 1(3), 115–23.
- [288] Xu, Y., Ding, X., Zou, J., Liu, Z., Jiang, S., Xu, S., Shen, B., Chen, Y., Shan, Y. and Cao, X. [2011], 'Plasma Pentraxin 3 is Associated with Cardiovascular Disease in Hemodialysis Patients', *Renal Failure* 33(10), 998–1004.
- [289] Yamaguchi, S., Wiessner, J. H., Hasegawa, A. T., Hung, L. Y., Mandel, G. S. and Mandel, N. S. [2005], 'Study of a rat model for calcium oxalate crystal formation without severe renal damage in selected conditions.', *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 12(3), 290–8.
- [290] Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F. and Wang, H. [2014], 'Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases.', *Biomarker research* 2(1), 1.
- [291] Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T. L. [2012], 'Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.', *BMC bioinformatics* 13, 134.
- [292] Ying, T.-H., Lee, C.-H., Chiou, H.-L., Yang, S.-F., Lin, C.-L., Hung, C.-H., Tsai, J.-P. and Hsieh, Y.-H. [2016], 'Knock-down of Pentraxin 3 suppresses tumorigenicity and metastasis of human cervical cancer cells.', *Scientific reports* 6, 29385.
- [293] Yu, W., Sandoval, R. M. and Molitoris, B. A. [2007], 'Rapid determination of renal filtration function using an optical ratiometric imaging approach.', *American journal of physiology. Renal physiology* 292(6), F1873–80.
- [294] Yuan, M., Tan, Y., Pang, Y., Li, Y.-z., Song, Y., Yu, F. and Zhao, M.-h. [2017], 'Anti-pentraxin 3 auto-antibodies might be protective in lupus nephritis: a large cohort study', *Renal Failure* 39(1), 465–473.
- [295] Zager, R. a., Gmur, D. J., Bredl, C. R. and Eng, M. J. [1989], 'Degree and time sequence of hypothermic protection against experimental ischemic acute renal failure.', *Circulation research* 65(5), 1263–1269.
- [296] Zhang, C.-Y., Han, H.-D., Wang, S.-Y., Huang, S.-R. and Deng, B.-Q. [2018], 'Pentraxin-3 in Thrombolytic Therapy for Acute Ischemic Stroke: No Relation with Curative Effect and Prognosis.', *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 24, 4427–4432.

- [297] Zhang, J., Wang, T.-Y. and Niu, X.-C. [2016], 'Increased Plasma Levels of Pentraxin 3 Are Associated with Poor Prognosis of Colorectal Carcinoma Patients.', *The Tohoku journal of experimental medicine* 240(1), 39–46.
- [298] Zhuo, J. L. and Li, X. C. [2013], 'Proximal nephron.', *Comprehensive Physiology* 3(3), 1079–123.

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Anders für die Chance, die er mir gegeben hat, mich als Wissenschaftler zu beweisen, sowie für seine Führung und Bereitschaft zur ständigen sachlichen Diskussion auf Augenhöhe.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Shrikant Mulay, Herrn Dr. Santosh Kumar, Herrn Dr. Marc Weidenbusch, Frau Dr. Stefanie Steiger und Frau Dr. Lidia Anguiano-Gomez für die Vermittlung von Inhalten und Methodik sowie ihrem menschlichen Einsatz als Kollegen und Freunde.

Für die methodische Unterstützung in der Erstellung der vorliegenden Arbeit gilt mein Dank Frau Janina Mandelbaum (Genotypisierung und Histologie), Herrn Dan Draganovici (Histologie) sowie den Kooperationspartnern des Projekts Herrn Prof. Dr. Alberto Mantovani, Frau Prof. Dr. Cacilia Garlanda, Herrn Dr. Antonio Inforzato und Herrn Fabio Pasqualini (Herstellung und Bereitstellung von rhPTX3 und immunhistochemische Färbung von murinem PTX3).

Für ihre ausdauernde Unterstützung, die kritisch Betrachtung der Sachverhalte auch nach Feierabend und die wirksame Motivierung, wo sie nötig war, danke ich Frau Anja Wilkening von ganzem Herzen. Ohne Dich wäre ich jetzt noch nicht fertig.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

”DIE ROLLE VON PENTRAXIN 3 BEI ENTZÜNDLICHEN NIERENERKRANKUNGEN”

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 18. Juli 2019

Julian Aurelio Marschner

Übereinstimmungserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel

„DIE ROLLE VON PENTRAXIN 3 BEI ENTZÜNDLICHEN NIERENERKRANKUNGEN“

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 18. Juli 2019

Julian Aurelio Marschner