

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV,
Klinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Martin Reincke

Die Rolle von A20 in der Immunkomplex- Glomerulonephritis



Dissertation

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

vorgelegt von

John Michael Hoppe

geboren in München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der LMU München

Berichterstatter: Prof. Dr. Volker Vielhauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ludger Klein

Prof. Dr. Gerhild Wildner

Dr. Anneli Peters

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2022

Widmung

Meinen lieben Eltern

Veröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Promotionsarbeit wurden bereits in Abstractform und in einer Publikation veröffentlicht:

1. Hoppe JM, Müller MB, Bideak A, Eltrich N, Vielhauer V. Die Rolle von A20 bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Symposium „Junge Niere“ 2013, Regensburg. Nieren- und Hochdruckkrankheiten. 2013;42:466. (Vortragspreis)
2. Hoppe JM, Vielhauer V. Induction and analysis of nephrotoxic serum nephritis in mice. In: Anders HJ, Migliorini A (eds). Innate DNA and RNA recognition. Methods in Molecular Biology. Springer New York. 2014;1169:159-174.
3. Hoppe JM, Müller MB, Lux M, Bideak A, Eltrich N, Vielhauer V. Einfluss von A20 auf Inflammation und Zelltod bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Fellows' Night 2015, Nephrologisches Forum München. Abstractband 2015;S.13. (Vortragspreis)
4. Hoppe JM, Müller MB, Lux M, Bideak A, Eltrich N, Vielhauer V. The role of A20 in inflammation and cell death driving immune complex glomerulonephritis. 7. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie. 2015, Abstract USB-Stick, ISSN 1863-2262, Poster P204.

Inhaltsverzeichnis

Widmung	I
Veröffentlichungen	II
Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	4
Abstract	6
Abkürzungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
Abbildungsverzeichnis	11
1 Einleitung	14
1.1 Die Chronische Niereninsuffizienz	14
1.2 Die Niere	16
1.2.1 Aufgaben der Niere	16
1.2.2 Makroskopische Anatomie der Niere	16
1.2.3 Das Nephron, die Funktionseinheit der Niere	18
1.2.4 Die glomeruläre Filtrationsbarriere	20
1.3 Glomerulonephritis	21
1.4 Nephrotoxische Serumnephritis	25
1.5 A20 und Inflammation	29
1.5.1 Entdeckung, Struktur, Funktion und Relevanz von A20	29
1.5.2 Rolle von A20 in TNF-abhängigen NF-κB-Signalwegen	33
1.5.3 Rolle von A20 in TNF-unabhängigen Signalwegen	36
1.5.4 Rolle von A20 beim regulierten Zelltod	38
1.6 Hypothese der Arbeit	42
2 Material und Methoden	44
2.1 Materialien	44
2.1.1 Materialien für die Genotypisierung	44
2.1.2 Materialien für die NTN-Induktion	45
2.1.3 Materialien für die Zellkultur und Glomeruli-Isolation	45
2.1.4 Materialien für die Splenozytenisolation und -aktivierung	46
2.1.5 Materialien für die Zellkultur der mMCs	46
2.1.6 Materialien für die Durchflusszytometrie	47
2.1.7 Materialien für den ELISA	48
2.1.8 Materialien für den Western Blot	48
2.1.9 Materialien für die Real-Time PCR	50
2.1.10 Materialien für die kolorimetrischen Methoden	51

2.1.11	Materialien für die Histologie	51
2.1.12	Weitere Geräte.....	52
2.1.13	Verbrauchsmaterialien	53
2.1.14	Software.....	54
2.2	Tierexperimentelle Methoden	55
2.2.1	Versuchstiere	55
2.2.2	Tierhaltung	56
2.2.3	Genotypisierung	56
2.2.4	Tiernarkose.....	59
2.2.5	Induktion der Nephrotoxischen Serumnephritis	60
2.3	In vitro-Methoden.....	62
2.3.1	Paramagnetische Glomeruli-Isolation.....	62
2.3.2	Splenozytenisolation und T-Zell-Aktivierung	66
2.3.3	Zellkultur und Zelltodinduktion muriner Mesangialzellen .	68
2.4	Immunologische Methoden	70
2.4.1	Durchflusszytometrie	70
2.4.2	ELISA	75
2.4.3	Western Blot.....	77
2.5	Molekularbiologische Methoden	80
2.5.1	Real-Time PCR	80
2.6	Kolorimetrische Methoden	85
2.6.1	Gesamtproteinbestimmung nach Bradford	85
2.6.2	Kreatinin-Bestimmung mittels Jaffé Methode	86
2.6.3	LDH-Assay.....	86
2.6.4	MTT-Assay.....	87
2.7	Histologische Methoden	88
2.7.1	Histopathologie in der Lichtmikroskopie.....	88
2.7.2	Immunhistochemische Färbungen.....	90
2.7.3	Immunfluoreszenzfärbungen	94
2.8	Statistische Methoden.....	96
3	Ergebnisse.....	97
3.1	Renale Funktionsparameter in WT- und A20-defizienten Mäusen mit NTN	97
3.2	Funktionelle Parameter der glomerulären Schädigung in WT- und A20-defizienten Mäusen mit NTN	98
3.3	Glomerulärer Schaden nach NTN-Induktion	100
3.4	Tubulärer Schaden nach NTN-Induktion	102
3.5	Renale Leukozyteninfiltration im Verlauf der NTN in WT- und A20-defizienten Mäusen	104
3.6	Renale Expression inflammatorischer Mediatoren.....	108
3.7	Glomeruläre Inflammation in vitro	110
3.8	Lokale versus systemische Inflammation	115

3.9	Ausmaß des renalen Zelltodes in vivo.....	121
3.10	Charakteristika des glomerulären Zelltods in vitro	124
4	Diskussion.....	127
4.1	Nierenfunktion und Schaden bei A20-Defizienz.....	127
4.2	Renale Inflammation bei A20-Defizienz	130
4.2.1	CCL2-induzierte renale Leukozyteninfiltration bei A20-Defizienz	130
4.2.2	Expression weiterer Chemokine bei A20-Defizienz	133
4.2.3	Expression weiterer pro- und antiinflammatorischer Mediatoren bei A20-Defizienz	134
4.3	Bedeutung der lokalen und systemischen Inflammation für den verschlechterten Verlauf der NTN bei A20-Defizienz	138
4.4	Regulierter Zelltod bei A20-Defizienz.....	142
4.5	Limitationen der Arbeit, Ausblick und therapeutische Relevanz	146
4.5.1	Limitationen der Arbeit.....	146
4.5.2	Ausblick	147
4.5.3	Therapeutische Relevanz	148
5	Literaturverzeichnis	150
	Danksagung.....	166
	Eidesstattliche Versicherung	167

Zusammenfassung

Zielstellung: Das zytoplasmatische Protein A20 ist ein negativer Regulator von proinflammatorischen NF- κ B Signalwegen, unter anderem durch eine direkte Degradation des TNF-abhängigen RIP1-Komplexes. Nach Dissoziation vom TNF-Rezeptor assoziiert RIP1 mit RIP3 zur Nekroptoseinduktion. Die Induktion von A20 bewirkt somit nicht nur eine Antiinflammation, sondern fördert auch das Zellüberleben. Da über negative Regulatoren der Immunantwort und des regulierten Zelltods bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis wenig bekannt ist, wurde die funktionelle Rolle von A20 im murinen nephrotoxischen Serumnephritis (NTN)- Model untersucht.

Methodik: Die NTN wird durch eine i.v.-Injektion mit anti-glomeruläre Basalmembran-Schafserum in C57BL/6 Wildtyp- und heterozygoten A20-Knockout-Mäusen (A20 +/-) erzeugt. Am Tag 14 nach der Induktion wurden die renalen funktionellen Parameter, renale Histologie, Leukozyten-infiltration und Zytokinproduktion beider Gruppen analysiert. Zudem wurden in vitro-Untersuchungen an stimulierten Glomeruli und tubulointerstitiellen Zellen durchgeführt, die aus Wildtyp- und A20-defizienten Mäusen isoliert wurden. Des Weiteren wurden in vitro Mesangialzellen (mMC) von Wildtyp-Mäusen nach Nekroptose-Induktion untersucht.

Ergebnisse: Das Krankheitsbild der NTN war in A20 +/- Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verschlechtert, was sich durch eine erhöhte Albuminurie und Serumharnstoffwerte zeigte. Dies korrelierte mit vermehrtem Podozytenverlust und verstärkter Glomerulosklerose. Außerdem ist sowohl die renale

Leukozyteninfiltration als auch die mRNA-Expression von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen in A20 +/- Mäusen erhöht, die systemische Immunreaktion wurde nicht beeinflusst. Auch in vitro zeigten isolierte Glomeruli und tubulointerstitielle Zellen von A20-defizienten Mäusen eine erhöhte Chemokinproduktion nach TNF-Stimulation. Trotz reduziertem Nachweis des Apoptosemarkers Cleaved-Caspase-3 war der Zelltod in nephritischen A20 +/- Nieren erhöht. Zudem korrelierte der vermehrte renale Zelltod in A20 +/- Mäusen mit einem reduzierten RIP3-Gehalt im Vergleich zu Wildtyp-Nieren. In ergänzenden in vitro-Untersuchungen zeigte sich ebenfalls der RIP3-Gehalt in murinen Mesangialzellen nach Nekroptoseinduktion vermindert, wobei Inhibition der Nekroptose mit Nekrostatin-1s den RIP3-Verlust verhinderte.

Schlussfolgerung: Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass A20 renale Inflammation, Gewebeschaden und renalen Zelltod im Verlauf der murinen Glomerulonephritis hemmt. Die in vitro-Ergebnisse zeigen, dass RIP3 als essentieller Vermittler der Nekroptose unter verstärkt ablaufender Nekroptose abgebaut wird. Da in A20 +/- Nieren vermehrter Zelltod ebenfalls mit einem RIP3-Verlust korrelierte, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass A20 während der NTN nicht nur die renale Entzündungsreaktion, sondern auch das Ausmaß der renalen Nekroptose begrenzt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz von A20 als endogenen Inhibitor und mögliches Zielmolekül therapeutischer Interventionen bei entzündlichen Nierenerkrankungen, das sowohl renale Inflammation als auch den Zelltod begrenzt.

Abstract

Background: The cytoplasmic protein A20 is a negative regulator of pro-inflammatory NF- κ B pathways, in part through direct degradation of the TNF-dependent RIP1 complex. When dissociated from the TNF receptor, RIP1 associates with RIP3 for necroptosis induction. Therefore, up-regulation of A20 elicits not only antiinflammation, but also cell survival. As negative regulators of inflammation and regulated cell death in immune complex glomerulonephritis remain poorly understood, the role of A20 in the murine nephrotoxic serum nephritis (NTN) model was studied.

Methods: Autologous NTN was induced by iv-injection of sheep anti-GBM serum into C57BL/6 wildtype and heterozygous A20-deficient mice. At day 14 of NTN renal functional parameters, renal histology, and local and systemic immune responses were analyzed. Furthermore, in vitro stimulation of glomeruli and tubulointerstitial cells isolated from wildtype and A20 $-/-$ mice were performed. In addition, we investigated necroptosis pathways in wildtype mouse mesangial cells (mMCs) in vitro.

Results: NTN was aggravated in A20 $+/-$ mice compared to wildtype mice, as indicated by increased albuminuria and serum urea levels. This correlated with increased podocyte loss and glomerulosclerosis in A20 $+/-$ mice. Renal leukocyte infiltration increased and renal mRNA expression of proinflammatory cytokines and chemokines was up-regulated in A20 $+/-$ mice, but systemic immune responses were not altered. In vitro, analysis of isolated glomeruli and tubulointerstitial cells revealed elevated chemokine production in intrinsic renal

cells of A20-deficient mice after TNF stimulation. In addition, more cell death was seen in A20 +/- kidneys, despite reduced protein expression of pro-apoptotic cleaved caspase-3 as a marker of apoptosis. Moreover, increased cell death in A20 +/- NTN kidneys correlated with reduced renal RIP3 protein levels compared to wildtype. Interestingly, RIP3 protein levels similarly decreased after induction of necroptosis in mMCs in vitro, while blocking necroptosis with Necrostatin-1s preserved RIP3 expression.

Conclusion: These data demonstrate that endogenous A20 inhibits renal tissue damage, inflammation and cell death in murine glomerulonephritis. Further, our in vitro results reveal that RIP3 abundance, although required for necroptosis induction, decreases when necroptosis is stimulated. As increased cell death in A20 +/- kidneys correlated with renal RIP3 loss, these data suggest that A20 also limits renal necroptosis during NTN. These findings identify A20 as an important endogenous inhibitor and possible therapeutic target in inflammatory kidney disease, limiting both renal inflammation and renal cell death.

Abkürzungsverzeichnis

Aa	Arteriae
ABIN	A20-binding inhibitor of NF- κ B activation
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serum-Albumin
Bid	BH3 interacting domain death agonist
c(Cr) _{Serum}	Serum-Kreatininkonzentration
cDNA	Komplementäre DNA
clAP	Cellular Inhibitor of Apoptosis
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC	Endothelzelle
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetales bovines Serum
GBM	Gomeruläre Basalmembran
GF	Gesichtsfeld
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor
GN	Glomerulonephritis
HRP	Horseradish peroxidase (deutsch Meerrettichperoxidase)
HUVEC	Humane Umbilikalvenen Endothelzellen
I κ B α	NF- κ B Inhibitor alpha
IKK- γ	Inhibitor of NF- κ B kinase gamma
IL	Interleukin
K	Lysin
KG	Körpergewicht

LPS	Lipopolysaccharide
LSAB	Labelled-(Strept-)Avidin-Biotin-Methode
mMC	murine Mesangialzelle
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NALP3 ($\triangleq$ NLRP3)	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
Nec-1s	Necrostatin-1s
NF- κ B	Nuclear factor 'k-light-chain-enhancer' of activated B-cells
n.s.	Nicht signifikant
NTN	Nephrotoxische Serumnephritis
OD	Optische Dichte
OTU	Ovarian Tumor
PAS-Reaktion	Periodic acid-Schiff-Reaktion
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RA	Rheumatoide Arthritis
RHIM	RIP homotypic interaction motif
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation assay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPF	spezifisch pathogenfrei
TI	Tubulointerstitielles Gewebe
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)
TNFAIP3	Tumor necrosis factor alpha induced protein 3
TNFR1	TNF-Rezeptor 1
TRAF2	TNF receptor associated factor-2
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
Ubc13	Ubiquitin-Conjugating-Enzyme-13
Vv	Venae
WT	Wildtyp
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis
ZnF	Zink-Finger-Protein

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der Glomerulonephritiden mit Schadensmuster...	24
Tabelle 2:	Primer-Sequenzen.....	57
Tabelle 3:	PCR-Mix.	57
Tabelle 4:	PCR-Ablauf.	58
Tabelle 5:	Dosierung der Injektionsnarkose nach Gewicht.	60
Tabelle 6:	Antikörperansatz zur T-Zell-Detektion.....	72
Tabelle 7:	Antikörperansatz zur Detektion von Makrophagen und dendritischen Zellen.	72
Tabelle 8:	Gelvorbereitung.....	79
Tabelle 9:	Master-Mix für die mRNA/cDNA-Umschreibung.....	83
Tabelle 10:	Mastermix für RT-PCR.	84
Tabelle 11:	RT-PCR-Ablauf.	85
Tabelle 12:	Glomerulosklerose-Score nach El Nahas.	89
Tabelle 13:	Auswertung der immunhistochemischen Leukozytenfärbungen.	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Einteilung der CNI-Schweregrade nach KDIGO.	15
Abbildung 2:	Anatomie der Niere mit Gefäßversorgung und Harnableitung.....	17
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Nephrons.	18
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des Glomerulus.	19
Abbildung 5:	Glomerulus in der PAS-Färbung.....	19
Abbildung 6:	Elektronenmikroskopische Aufnahme der Basalmembran, Kapillarendothel und Podozytenfußfortsätzen.	21
Abbildung 7:	Anti-GBM Glomerulonephritis in der PAS-Färbung mit Halbmondbildung und mit charakteristischer, linearer IgG-Anfärbung.....	24
Abbildung 8:	Mechanismen der NTN, heterologe und autologe Phase. .	28
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der strukturellen Domänen des humanen A20-Proteins.....	30
Abbildung 10:	Schematische Darstellung der TNF-Rezeptor-abhängigen NF- κ B-Aktivierung und inhibitorische Effekte von A20.	36
Abbildung 11:	Übersicht der Funktion von A20 bei der Apoptose.....	41
Abbildung 12:	Übersicht der Funktion von A20 bei der Nekroptose.....	42
Abbildung 13:	Genotypisierung der A20-Mäuse.	59
Abbildung 14:	Ablauf der paramagnetischen Glomeruli-Isolation.	64
Abbildung 15:	Paramagnetische Glomeruli-Isolation aus einer C57BL/6J-Maus.	65
Abbildung 16:	Gatingstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung renaler Leukozytenpopulationen.	75

Abbildung 17: Nierenfunktionsparameter nach NTN-Induktion.....	97
Abbildung 18: Funktionelle Parameter der glomerulären Schädigung nach NTN-Induktion.	99
Abbildung 19: Glomerulärer Schaden in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 14 der NTN.....	101
Abbildung 20: Tubulärer Schaden im Verlauf der NTN in WT- und A20 +/- Mäusen.....	103
Abbildung 21: Renale Leukozyteninfiltration in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 14 der NTN (Durchflusszytometrie).	106
Abbildung 22: Renale Leukozyteninfiltration in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 14 der NTN (Immunhistochemie).	107
Abbildung 23: Renale Chemokin- und Zytokin-mRNA-Expression in WT und A20 +/- Mäusen am Tag 14 nach NTN-Induktion.	109
Abbildung 24: Glomeruläre und tubulointerstitielle Proteinexpression der Chemokine CCL2, CCL5 und CXCL10 und Zelltod- quantifizierung mittels LDH-Assay in WT und A20 -/- nach TNF-Stimulation in vitro.	113
Abbildung 25: Glomeruläre und tubulointerstitielle mRNA-Expression der Chemokine CCL2, CCL5 und CXCL10 in WT und A20 -/- nach TNF-Stimulation in vitro.	114
Abbildung 26: Funktioneller und struktureller glomerulärer Schaden in WT- und A20 +/- Mäusen im Verlauf der heterologen NTN.....	118
Abbildung 27: Renale Leukozyteninfiltration in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 5 der heterologen NTN (Durchfluss- zytometrie).....	119
Abbildung 28: Systemische Inflammation nach NTN-Induktion in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 14.....	120
Abbildung 29: Ausmaß des regulierten Zelltods in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 14 nach NTN-Induktion (Immunfluoreszenzfärbung).....	123

Abbildung 30: Ausmaß des regulierten Zelltods im Nierengewebe in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 14 nach NTN- Induktion (Western Blot).	124
Abbildung 31: Zelltodinduktion in mMCs in vitro.	126

1 Einleitung

1.1 Die Chronische Niereninsuffizienz

„The Kidney Disease: Improving Global Outcomes“ (KDIGO) Arbeitsgruppe der „International Society of Nephrology“ (ISN) aus dem Jahr 2012 definierte Nierenerkrankungen als eine strukturelle Veränderung der Nieren oder ein Funktionsverlust mit Auswirkungen für die Gesundheit eines Individuums, ein Vorgang der akut eintreten, sich spontan zurückbilden oder chronisch werden kann. Im Speziellen wird die chronische Niereninsuffizienz (CNI) als ein länger als 3 Monate anhaltender Funktionsverlust oder Schaden der Niere, welcher Auswirkungen auf die Gesundheit haben kann, definiert [1]. Die CNI wird charakterisiert durch die verursachende Nierenerkrankung und ihrem Schweregrad, abhängig von der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der Albuminurie (Abbildung 1). Die geschätzte globale Prävalenz aller Stadien der CNI liegt zwischen 11 und 13 %, wobei die Prävalenz in Regionen wie den USA und Europa höher ist als in Regionen wie dem subsaharischen Afrika oder Indien [2]. Vor allem in Regionen mit hohem oder mittlerem Einkommen sind der Diabetes mellitus und der Hypertonus als Grunderkrankung die häufigste Ursache für die Entwicklung einer CNI [3]. Hingegen sind in ökonomisch weniger entwickelten Regionen chronische Formen unterschiedlicher Glomerulonephritiden (GNs) und unklare Ursachen am häufigsten für die CNI verantwortlich, aber auch in ökonomisch starken Regionen haben chronische GNs einen relevanten Anteil an der Prävalenz der CNI [3]. Der Anteil der CNI an der weltweiten, krankheitsbedingten Mortalität ist in den letzten 25 Jahren angestiegen, vom 25. Platz 1990 auf den 18. Platz 2010 und auf den 17. Platz

2015 [4, 5]. Folglich ist die frühzeitige Erkennung und adäquate Therapie der CNl wichtiger denn je, jedoch blieben die Therapiemöglichkeiten bisher überschaubar. Vor allem werden ACE-Inhibitoren oder Angiotensin-1-Rezeptor-Antagonisten zur Nephroprotektion bei proteinurischen Nierenerkrankungen als Basistherapie eingesetzt [1]. Aktuelle Studiendaten weisen auch auf progressionsverlangsamende Effekte von SGLT-2-Hemmern bei GNs hin [6, 7]. Ferner können grundsätzlich neben der adäquaten Behandlung von arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus kausale Therapieansätze der zugrundeliegenden Nierenerkrankung angestrebt werden. Im Falle einer autoimmun-vermittelten GN können verschiedene Immunsuppressiva (Cortison, Calcineurininhibitoren, Cyclophosphamid, Biologika, etc.) eingesetzt werden. Jedoch bleibt häufig der gewünschte Therapieerfolg beim Patienten aus und die Progression der Nierenerkrankung führt zur terminalen Niereninsuffizienz und Dialysepflichtigkeit.

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/ 1.73 m ²) Description and range	G1	Normal or high	≥90	Green	Yellow	Orange
	G2	Mildly decreased	60-89	Green	Yellow	Orange
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59	Yellow	Orange	Red
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44	Orange	Red	Red
	G4	Severely decreased	15-29	Red	Red	Red
	G5	Kidney failure	<15	Red	Red	Red

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red, very high risk.

Abbildung 1: Einteilung der CNl-Schweregrade nach KDIGO [1].

1.2 Die Niere

1.2.1 Aufgaben der Niere

Die Niere ist das Organ, welches maßgeblich die Homöostase aufrechterhält. Hierzu gehören die Entgiftung des Körpers von harnpflichtigen und körperfremden Substanzen, die Erhaltung des physiologischen pHs und die Regulation des Volumenstatus. Ferner ist die Niere durch die Sekretion von Erythropoetin für die hormonelle Regulation der Erythropoese zuständig. Zudem hat die Niere einen Einfluss auf den Kalzium- und Phosphathaushalt. In den proximalen Tubuluszellen, stimuliert durch Parathormon, wird Vitamin-D hydroxyliert und in seine aktive Form, 1,25-Dihydroxy Vitamin D, überführt. Auch die Regulation des systemischen Blutdruckes wird durch die Ausschüttung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen gesteuert. Dieses Enzym konvertiert Angiotensinogen zu Angiotensin I, welches wiederum durch Angiotensin converting enzyme zu Angiotensin II umgewandelt wird. Angiotensin II ist ein starker Vasokonstriktor, stimuliert die Aldosteronausschüttung und führt zur Natriumretention in der Niere. Diese Aktivierung der sogenannten RAAS-Kaskade (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) führt zum Anstieg des systemischen Blutdruckes [8].

1.2.2 Makroskopische Anatomie der Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes, retroperitoneal gelegenes Organ, jede Niere ist ca. 150 g schwer. Dabei ist jede Niere von der Capsula fibrosa renis umschlossen. Anatomisch ist die Niere in Rinde, Mark und Nierenbecken

aufgeteilt, wobei in der Rinde und Mark die funktionelle Einheit der Nieren, die Nephronen, zu finden sind [8]. Die Durchblutung der Nieren erfolgt über die von der Aorta abdominalis abgehenden Aa. renalis sinister und dexter, welche sich aufspalten in die Aa. segmenti und interlobularis um die einzelnen Nierenpyramiden zu versorgen (Abbildung 2). Anatomische Varianten der renalen Gefäßversorgung kommen in 25-40 % aller Patienten vor [8]. Das Blut wird dann über die Vas afferens in das Kapillarkonvolut der Glomeruli geleitet und unter Produktion des Primärharns gefiltert. Über die Vas efferens gelangt das Blut in die Vasa peritubularis bzw. Vasa recta und nimmt Teil an dem Sekretions- und Rückresorptionsprozess des Tubulusapparates. Das peritubuläre Gefäßnetz sind Kapillaren, welche die Tubuli des Nierencortexes umgreifen [9]. Von hier gelangt das Blut letztlich zurück ins venöse System und über die Vv. renalis in den Körperkreislauf. Somit sind in der Niere 2 Kapillarnetze in Reihe geschaltet, das glomeruläre und das nachgestellte peritubuläre Kapillarnetz.

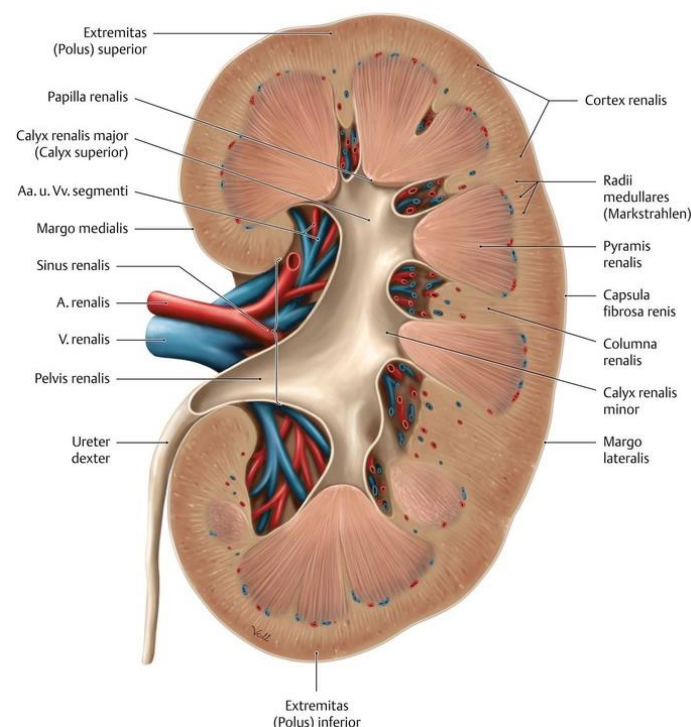


Abbildung 2: Anatomie der Niere mit Gefäßversorgung und Harnableitung [10].

1.2.3 Das Nephron, die Funktionseinheit der Niere

Das Nephron ist die kleinste Funktionseinheit der Niere. Jede Niere ist aus ca. 1 Millionen Nephrone aufgebaut [8]. Somit wird ein nierengesunder Mensch durchschnittlich mit 2 Millionen Nephrone geboren. Diese Gesamtzahl an Nephronen bestimmt die Gesamtfiltrationsleistung der Niere, was der glomerulären Filtrationsrate (GFR) entspricht, die ca. 120 ml/min beträgt [11]. Die GFR gibt das Plasmavolumen an, dass durch beide Nieren je Minute filtriert wird. Um diese Filtrationsleistung aufrechtzuerhalten bedarf es einer starken Durchblutung der Nieren, ca. 20 % des gesamten Herzzeitvolumens. Das Nephron ist aufgebaut (von proximal nach distal) aus dem Glomerulus, der Bowman-Kapsel, dem proximalen Tubulus, der Henle'schen Schleife, dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr (Abbildung 3). Im Glomerulus, der eigentlichen Filtrationseinheit, wird der Primärharn hergestellt (Abbildung 4 und Abbildung 5). Die Menge des abfiltrierten Primärharns hängt von der GFR ab, die anhand der Serum-Kreatininkonzentration ($c(\text{Cr})_{\text{Serum}}$) abgeschätzt werden kann (eGFR). Hierbei entspricht eine steigende $c(\text{Cr})_{\text{Serum}}$ einer fallenden eGFR [12].

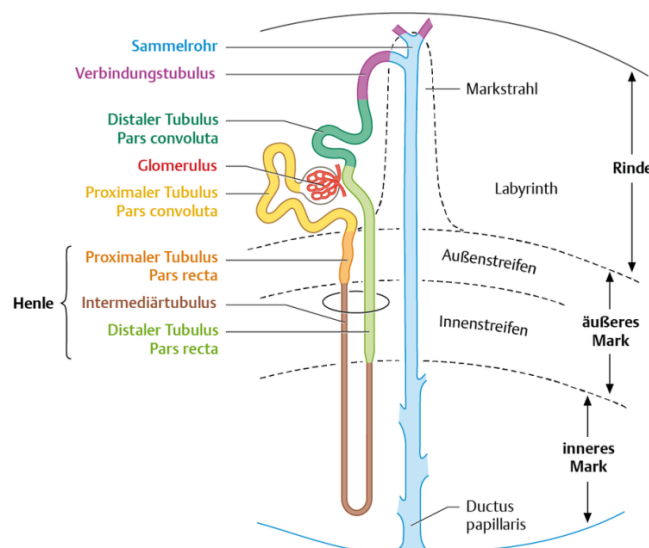


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Nephrons [13].

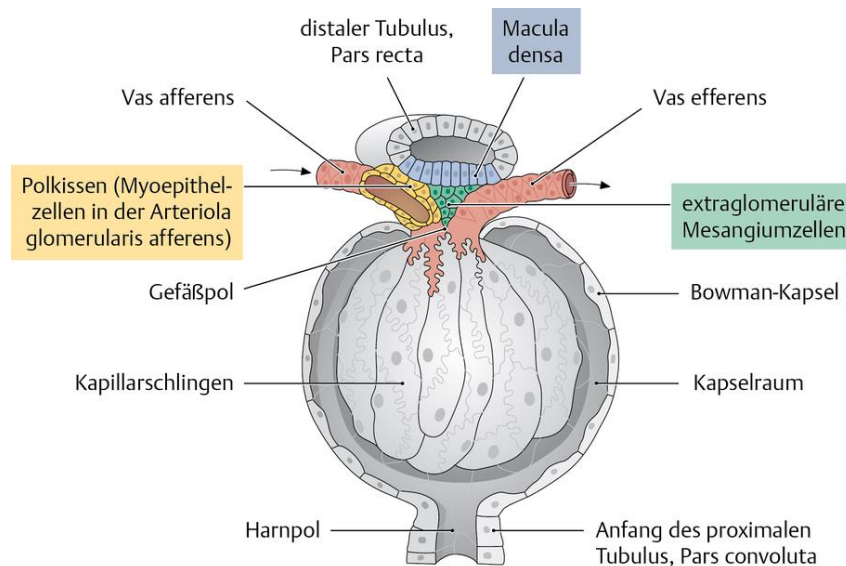


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Glomerulus [14].

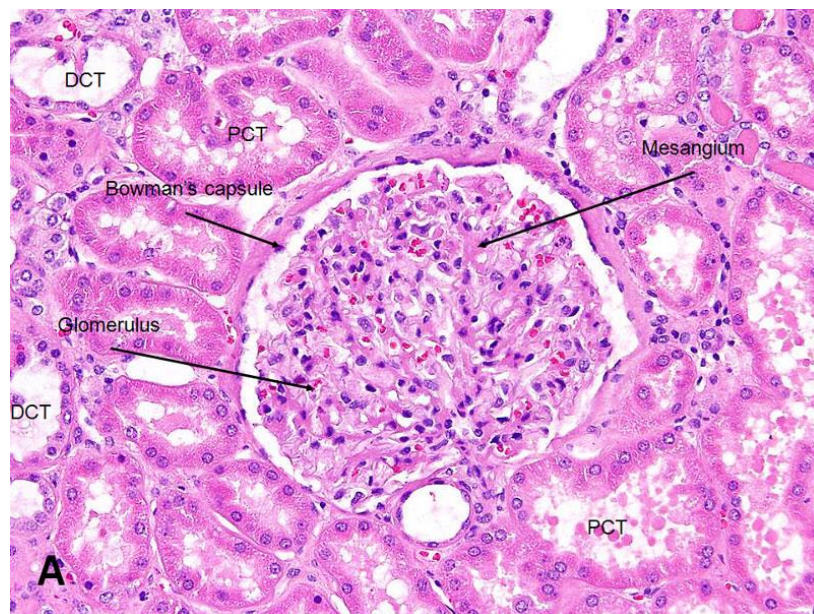


Abbildung 5: Glomerulus in der PAS-Färbung [15].

Die Aufgabe des Tubulusapparates besteht darin, den Primärharn so aufzubereiten, dass der Endharn eine möglichst hohe Konzentration an harnpflichtigen Substanzen und eine möglichst geringe Konzentration an physiologisch wichtigen Substanzen enthält. Im gesamten Tubulusapparat,

einschließlich Sammelrohr, wird Natriumchlorid (NaCl) und Wasser rückresorbiert, wobei bereits im proximalen Tubulus 2/3 des filtrierten NaCl und Wasser zurückgehalten werden. Überdies ist der proximale Tubulus für die Rückresorption von primär gefilterter Glucose, Aminosäuren, Peptiden und Proteinen verantwortlich. Die Henle'sche Schleife führt den Harn im Gegenstromprinzip durch das hyperosmolare Nierenmark, wobei die Wasserresorption im dünnen absteigenden Teil fortgesetzt wird und im dicken, wasserundurchlässigen, aufsteigenden Teil vor allem NaCl und Harnstoff im Nierenmark aufkonzentriert werden. Die Macula densa, der am Vas afferens des Glomerulus anliegende Abschnitt des distalen Tubulus, fungiert als Chemorezeptor zur Bestimmung der NaCl-Konzentration im Urin des Tubuluslumens (Abbildung 4). Abhängig von dieser Konzentration wird die GFR reguliert, auch bekannt als tubuloglomerulärer Feedback, und die Reninfreisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen gesteuert [9]. Der distale Tubulus trägt neben der NaCl- und Wasserrückresorption zur Calciumresorption bei. Im Sammelrohr erfolgt die Feineinstellung der Harnzusammensetzung, insbesondere die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes, die Kalium/Natrium-Regulation mittels Aldosteron und die Aufkonzentration des Harns durch antidiuretisches Hormon, das das Ausmaß der abschließenden Wasserrückresorption reguliert.

1.2.4 Die glomeruläre Filtrationsbarriere

Die Filtrationseinheit des Glomerulus, welche die Blut-Harn-Schranke aufbaut, besteht aus fenestriertem Endothel (innen), Podozyten mit interdigitierenden Fußfortsätzen (außen) und der dazwischenliegenden glomerulären

Basalmembran (GBM) (Abbildung 6). Diese Barriere verhindert den Übertritt von Zellen und hochmolekularen Substanzen (> 50 kDa, Durchmesser > 4 nm) in den Primärharn. Zudem werden negativ geladene Teilchen von dem negativ geladenen Filter abgestoßen. Kleine Moleküle, zum Beispiel Natrium, Kalium, Bicarbonat, Glucose, Harnstoff, Aminosäuren und Kreatinin, werden frei filtriert [9]. Entzündungsprozesse in den Glomeruli können die Blut-Harn-Schranke vorübergehend beeinträchtigen oder dauerhaft beschädigen. Kennzeichnend für eine glomeruläre Schrankenstörung ist eine glomeruläre Proteinurie, die durch einen hohen Anteil an Albumin charakterisiert ist, das aus dem Plasma in den Primärharn übertritt.

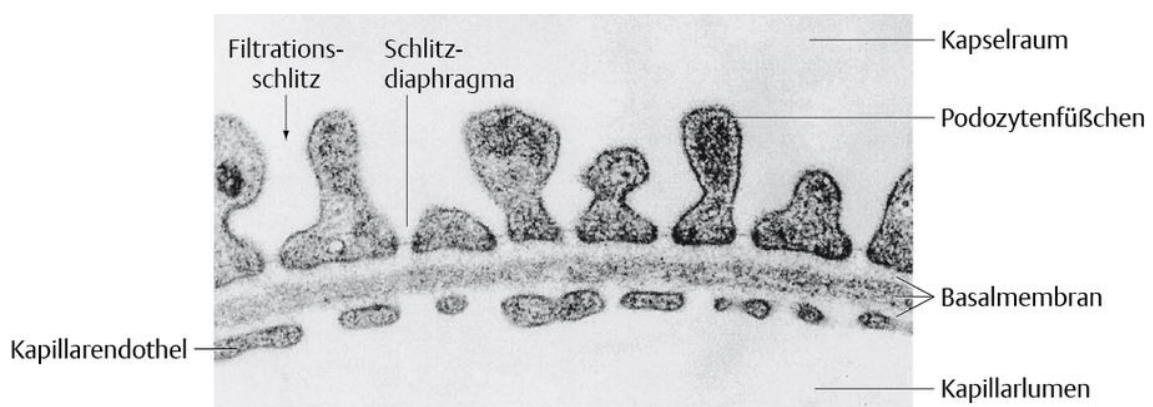


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Basalmembran, Kapillarendothel und Podozytenfußfortsätzen [14].

1.3 Glomerulonephritis

Die Glomerulonephritis (GN) stellt eine entzündliche Erkrankung in den Glomeruli der Nieren dar. Unterschiedliche glomeruläre Strukturen können von dem Entzündungsprozess betroffen sein, insbesondere das Mesangium, die

glomerulären Kapillaren, die glomeruläre Basalmembran (GBM) oder die Podozyten, was letztlich zu einer großen Bandbreite an glomerulären Schadensmustern und klinischen Verlaufsformen führt. Ursächlich ist häufig eine Autoimmunerkrankung, dessen Pathomechanismus auf die Bildung von Immunkomplexen oder spezifischen Autoantikörpern gegen glomeruläre Strukturen beruht. In einigen Fällen besteht auch eine glomeruläre Inflammation ohne Immunkomplexablagerungen. Zudem ist bei proliferativen GNs eine Infiltration des Nierengewebes mit Makrophagen und Lymphozyten typisch [16]. Eine GN führt grundsätzlich zur Schädigung des glomerulären Filters, was zu charakteristischen glomerulären Syndromen führt. Typisch für die GN ist das nephritische Syndrom. Die betroffenen Patienten präsentieren sich mit Hämaturie, Hypertonie und Ödemen. Bei schweren Verläufen mit hoher entzündlicher Aktivität kann es zu einer rapid-progressiven Glomerulonephritis (RPGN) kommen, gekennzeichnet durch einen Nierenfunktionsverlust von mindestens 50% innerhalb von 3 Monaten bis hin zum kompletten Nierenversagen [17]. Pathognomisch für eine GN ist das Vorkommen von Akanthozyten oder Erythrozytenzylinder im Urinsediment, die auf eine glomeruläre Hämaturie hinweisen [18]. Bei der chronischen GN kommt es aufgrund der anhaltenden glomerulären Schädigung zur Vernarbung (Glomerulosklerose) mit einhergehender Proteinurie im nephrotischen Bereich, sowie zur sekundären interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie [17].

GNs lassen sich in primäre und sekundäre Formen unterteilen. Primäre GNs beruhen auf einer isolierten renalen Erkrankung. Im Vergleich dazu beruhen sekundäre GNs meist auf einer immunologischen Systemerkrankung, welche sich unter anderem in den Glomeruli manifestieren. In der Regel sind serologische Nachweismethoden und eine Nierenbiopsie zur pathogenetischen Abklärung

der GN notwendig [17]. Die schwerste Form der GN ist die Halbmond-bildende proliferative GN. Klinisch manifestieren sie sich daher meist als RPGN mit raschem Nierenfunktionsverlust. Halbmonde sind Zellproliferationen in der Bowman-Kapsel, bestehend aus Leukozyten und Bowman-Kapselepithelzellen. Halbmonde entwickeln sich als Folge von kapillären Rupturen und sind immer Zeichen des schweren Schadens bei hoher entzündlicher Aktivität der GN [17]. Eine Übersicht unterschiedlicher GN-Typen mit Schadensmustern ist aus Tabelle 1 zu entnehmen. Insbesondere die Anti-GBM GN, die durch Ablagerung von Autoantikörpern gegen GBM-Antigene (Kollagen Typ IV) ausgelöst wird, ist häufig mit einem schweren RPGN-Verlauf mit Halbmondbildung verbunden (Abbildung 7). Jedoch können alle GN-Formen zum schweren, oftmals irreversiblen Nierenschaden führen, nicht selten bis zur notwendigen Einleitung eines Nierenersatzverfahrens bei Verlust der Organfunktion durch zunehmende Vernarbung. Die medikamentöse Basistherapie einer Nierenerkrankung beruht auf das Entgegenwirken der glomerulären Hyperperfusion und Hyperfiltration und infolgedessen Senkung der Proteinurie mittels Blockade des Renin-Angiotensin-Systems. Hierfür kommen in der Regel ACE-Inhibitoren und Angiotensin-1-Rezeptor-Antagonisten zur Anwendung. Bei schweren Verläufen schließt die Therapie zusätzlich eine systemische Immunsuppression mit Glukokortikoiden und anderen Immunsuppressiva (Calcineuininhibitoren, Mycophenolat), zytotoxischen Medikamenten (Cyclophosphamid) und Biologika (Rituximab), zum Teil auch Plasmaaustauschverfahren ein [19]. Leider bleibt der gewünschte Therapieerfolg häufig aus, vor allem aufgrund später Krankheitserkennung und Mangel an effektiveren therapeutischen Interventionen. Daher ist ein besseres pathophysiologisches Verständnis

dieser heterogenen Gruppe an Erkrankungen zur Identifizierung weiterer medikamentöser Angriffspunkte von hoher medizinischer Wichtigkeit.

Glomerulonephritis Pathogenic Type	Specific Disease Entity Examples	Pattern of Injury: Focal or Diffuse
Immune-complex glomerulonephritis	IgA nephropathy, IgA vasculitis, lupus nephritis, infection-related GN, fibrillary GN with polyclonal Ig deposits	Mesangial, endocapillary, exudative, membranoproliferative, necrotizing, crescentic, sclerosing, or multiple
Pauci-immune glomerulonephritis	MPO-ANCA GN, PR3-ANCA GN, ANCA-negative GN	Necrotizing, crescentic, sclerosing, or mixed
Anti-GBM glomerulonephritis	Anti-GBM GN	Necrotizing, crescentic, sclerosing, or mixed
Monoclonal immunoglobulin (Ig) glomerulonephritis	Monoclonal Ig deposition disease, proliferative GN with monoclonal Ig deposits, immunotactoid glomerulopathy, fibrillary GN with monoclonal Ig deposits	Mesangial, endocapillary, exudative, membranoproliferative, necrotizing, crescentic, sclerosing, or multiple
C3 glomerulopathy	C3 GN, dense deposit disease	Mesangial, endocapillary, exudative, membranoproliferative, necrotizing, crescentic, sclerosing, or multiple

Tabelle 1: Übersicht der Glomerulonephritiden mit Schadensmuster [17].

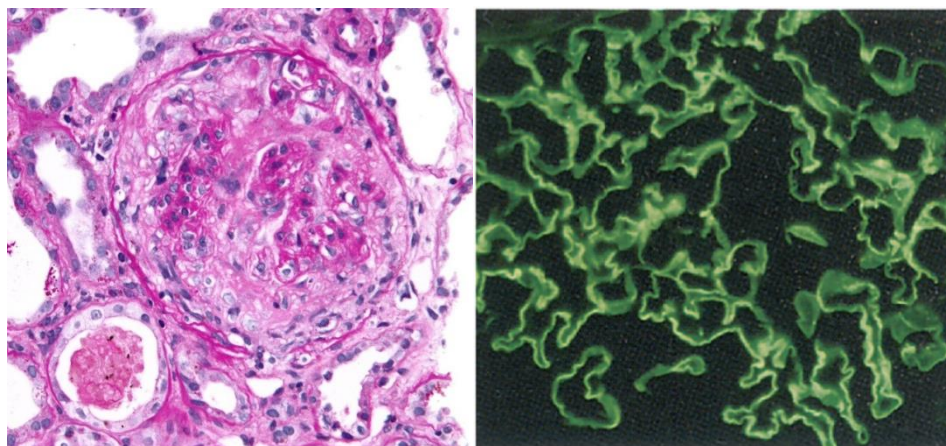


Abbildung 7: Anti-GBM Glomerulonephritis in der PAS-Färbung (links) mit Halbmondbildung und rechts mit charakteristischer, linearer IgG-Anfärbung [17, 20].

1.4 Nephrotoxische Serumnephritis

Die nephrotoxische Serumnephritis (NTN) ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung von Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritiden in Mäusen oder Ratten. Bereits im Jahre 1900 berichtete der russische Wissenschaftler Lindeman von der Möglichkeit, eine GN mittels anti-Nieren Antikörpern zu induzieren. Jedoch erst 1934 etablierte der japanische Pathologe Masugi das erste NTN-Modell; nach ihm ist das NTN-Synonym Masugi-Nephritis benannt [21, 22]. In 1936 beschrieb die Arbeitsgruppe um Smadel die Pathophysiologie der akuten und chronischen Stadien der NTN [23]. In den frühen 1940er Jahren war es Kay, der zeigen konnte, dass die Symptome des renalen Schadens mit der Antikörperantwort korrelieren [24].

Anders als im typischen Krankheitsverlauf einer GN ist im NTN-Modell die Formation pathogener Autoantikörper nicht durch einen autoimmunologischen Auslöser bedingt. Stattdessen wird dem Versuchstier (Ratte oder Maus) ein nephrotoxisches Serum gespritzt. Zur Gewinnung des nephrotoxischen Serums wird eine andere Tierspezies (meist Kaninchen oder Schaf) mit aufbereiteten Glomeruli der Versuchstierspezies immunisiert. Somit beinhaltet das nephrotoxische Serum polyklonale Antikörper gegen die glomerulären Basalmembran (GBM) und weitere, glomeruläre Strukturen. Dies hat zu der teilweise irreführenden, alternativen Bezeichnung der NTN als anti-GBM-Nephritis geführt. Allerdings finden sich im nephrotoxischen Serum nicht nur Antikörper gegen Bestandteile der GBM wie Kollagen Typ 4, sondern auch Antikörper gegen andere Strukturen der Glomeruli. Beispielsweise konnte Reaktivität des nephrotoxischen Serums mit Oberflächenantigenen auf Podozyten nachgewiesen werden [25, 26].

Der Pathomechanismus der NTN kann in 2 Phasen unterteilt werden:

Die akute (heterologe) Inflammationsphase wird innerhalb weniger Minuten durch die Deposition heterologer Antikörper in den Glomeruli ausgelöst, die im nephrotoxischen Serum enthalten sind (Abbildung 8). Diese polyklonalen Antikörper triggern eine lokale, angeborene Immunantwort mit der Sekretion von proinflammatorischen Chemo- und Zytokinen, indem sie an Antigene des glomerulären Endothels, der GBM und an Podozyten binden und damit zur glomerulären Immunkomplexablagerung führen. Des Weiteren können Antikörperdepositionen mit Integrinen interferieren, was zu direkten Podozytenschaden und Fußfortsatzverlust führen kann [27]. In der heterologen Phase ist der glomeruläre Schaden hauptsächlich auf die Aktivierung des Komplementsystems durch die gebildeten Immunkomplexe und Infiltration neutrophiler Granulozyten zurückzuführen [28-31]. Es ist davon auszugehen, dass Akute-Phase Komplementproteine an die konstanten Fc-Regionen der glomerulär abgelagerten heterologen Antikörper binden. Das bei der nachfolgenden Komplementaktivierung entstehende Komplementprotein C5a spielt eine entscheidende Rolle in der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten, welche in die betroffenen Glomeruli einwandern [32, 33]. Allerdings bleibt offen, wie groß der Anteil des Komplementsystems an der Entwicklung der NTN ist, da einige Studien Komplement- und Neutrophilenunabhängigen Schaden in der heterologen Phase nachgewiesen haben [31, 34]. Ferner trägt die Stimulation von Toll-like-Rezeptoren (TLR), sowohl in infiltrierenden Leukozyten als auch in Nierenparenchymzellen zur renalen Produktion von Chemokinen und Zytokinen und letztlich der Ausprägung der NTN bei [35, 36]. Abhängig von der Dosis und Toxizität des nephrotoxischen Serums ist der glomeruläre Schaden entweder

selbstlimitierend oder kann über die Entstehung von Mikrothromben bis zur Verödung von Kapillaren führen oder durch die Bildung von Halbmonden und glomerulären Vernarbungen Glomerulosklerose induzieren [26].

Bei ausreichend hoher Dosis des nephrotoxischen Serums entwickelt sich nach ca. 1 Woche die chronische, autologe Inflamationsphase der NTN (Abbildung 8). Sie ist charakterisiert durch eine systemische, adaptive Immunantwort gegen die in den Glomeruli abgelagerten heterologen Antikörper des nephrotoxischen Serums. Die autologe Phase der NTN entspricht daher eher der durch glomeruläre Ablagerung von Autoantikörpern verursachten humanen GN. Die Bedeutung von verschiedenen T-Helferzellen, einschließlich Th1- und Th17-Zellen für die Makrophagenstimulation und renale Schädigung, entsprechend einer allergischen Typ IV Spätreaktion, wurde für die NTN ausführlich beschrieben [37, 38]. Renale dendritische Zellen (DCs) konnten als wichtige Unterstützer der nephritogenen T-Zell-Immunantwort identifiziert werden [39]. Es wird angenommen, dass T-Zell-abhängige B-Zellaktivierung zur Formation von autologen Antikörper führt, die gegen die in den Glomeruli abgelagerten heterologen Antikörper gerichtet sind. Die dadurch in den Glomeruli entstehenden Immunkomplexe aus heterologen und autologen Antikörpern mit nachfolgender Komplementaktivierung führt zur Verstärkung der Immunantwort. Die autologe Immunphase kann durch Sensibilisierung der Versuchstiere gegen die heterologe Antikörperspezies, noch vor der Injektion des nephrotoxischen Serums, amplifiziert werden (Präimmunisierung). Dies ermöglicht den Einsatz kleiner (subnephritischer) Dosen des nephrotoxischen Serums, um den akuten nephrotoxischen Effekt der vorangehenden heterologen Immunphase möglichst gering zu halten [26].

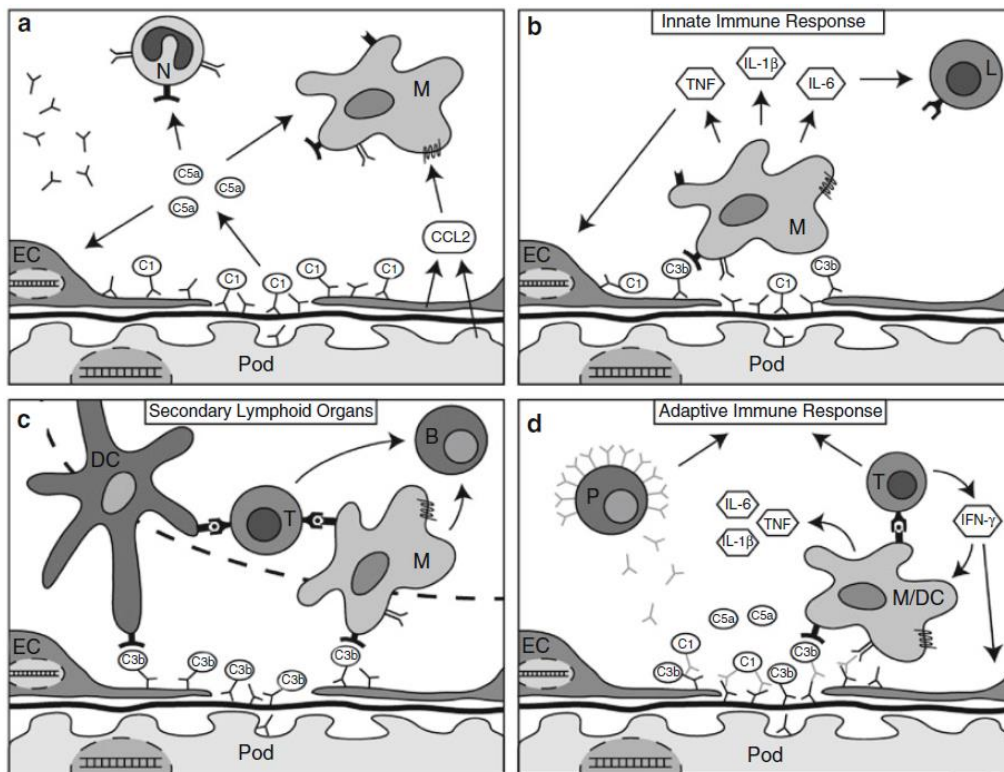


Abbildung 8: Mechanismen der NTN, heterologe und autologe Phase [26].

(a) Initial binden heterologe Antikörper des nephrotoxischen Serums (schwarz) an Antigene der GBM, Endothelzellen (EC) und Podozyten (Pod). Immunkomplexformation aktiviert Komponenten des Komplementsystems (C1, C3b, C5a), welche die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (N) und Monozyten (M) induziert. Intrinsische glomeruläre Zellen, aktiviert durch Komplementfaktoren, sezernieren proinflammatorische Chemokine, wie CCL2 und Zytokine, welche die glomeruläre Leukozyten-infiltration stimulieren. (b) Heterologe Antikörper werden mittels Endozytose von aktivierten mononukleären Phagozyten (M) aufgenommen. Diese sezernieren weitere inflammatorische Zytokine, wie IL-1 β , IL-6 und TNF, was zur Stimulation intrinsischer glomerulärer Zellen, erhöhter Endothelpermeabilität, Lymphozyten-Aktivierung (L) und im Zusammenspiel mit zunehmender Leukozyteninfiltration zu exsudativem und proliferativem glomerulären Schaden führt. (c) Lokal und in sekundären lymphatischen Organen präsentieren dendritische Zellen (DC) und Makrophagen (M) Epitope heterologer Antikörper gegenüber T-Lymphozyten (T) und induzieren eine anschließende Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen induzieren B-Zell-Reifung (B) im lymphatischen Gewebe. (d) In die Niere einwandernde CD4⁺ T-Zellen sezernieren Th1-Effektorzytokine wie IFN- γ , um glomeruläre Makrophagen (M) zu stimulieren. Reife Plasmazellen (P) produzieren autologe Antikörper (hellgrau), gerichtet gegen die glomerulär abgelagerten heterologen Antikörper. Autologe und heterologe Antikörper mit aktivierten Komplementproteinen formen sich zu großen Immunkomplexen, was zur weiteren Verstärkung der Immunreaktion führt [26].

In beiden Immunphasen der NTN zeigen sich Symptome der glomerulären Schädigung und des Nierenversagens, einschließlich glomerulärer Proteinurie, Hypoproteinämie, Hyperlipidämie und Verlust der Nierenfunktion, nachweisbar als Anstieg von Serumkreatinin und Harnstoff. Zudem sind beide Phasen durch eine Leukozyteninfiltration gekennzeichnet, wobei in der heterologen Phase vor allem die neutrophilen Granulozyten dominieren, hingegen in der autologen Phase vorwiegend mononukleäre Phagozyten und T-Zellen das periglomeruläre und tubulointerstitielle Gewebe infiltrieren, einer chronischen Immunkomplex-induzierten GN des Menschen entsprechend [28, 31, 37]. Die Versuchsdauer von heterologen NTN-Modellen sollte 7 Tage oder kürzer sein (Injektionstag bis Endpunkt), da ca. 7-10 Tagen nach Gabe des nephrotoxischen Serums eine signifikante Bildung autologer Antikörper und damit der Übergang in die autologe Phase zu erwarten ist [26].

1.5 A20 und Inflammation

1.5.1 Entdeckung, Struktur, Funktion und Relevanz von A20

1990 wurde das zytoplasmatische Protein A20, auch als TNF- α -induced protein 3 (TNFAIP3) bezeichnet, mittels differentieller Hybridisierung und cDNA-Bibliothek-Screening als Produkt eines durch TNF- α (TNF) induzierbaren primären Responsegens in Endothelzellen humaner Umbilikalvenen (HUVEC) identifiziert [40]. Bereits im gleichen Jahr erfolgte die Isolation und Analyse der vollen A20 cDNA, welche zeigen konnte, dass humane A20 mRNA 4 kb lang ist und für ein 790-Aminosäuren langes Zink-Finger-Protein (ZnF) mit einem

Molekulargewicht von 90 kDa kodiert [41]. Die genaue Funktion dieses Proteins war zu diesem Zeitpunkt noch unklar. Später konnte gezeigt werden, dass das Protein A20 eine duale Ubiquitin-modulierende Funktion besitzt, wobei die N-terminale OTU-Domäne Lysin (K)-63 verlinkte Ubiquitinketten deubiquitiniert und die C-terminale ZnF4-Domäne als Ubiquitinligase von K48 verlinkten Ubiquitinketten fungiert (Abbildung 9) [42]. Mittlerweile ist bekannt, dass A20 eine weitere ubiquitinierende Funktion besitzt, denn die ZnF7-Domäne verkettet lineare Ubiquitinketten [43, 44].

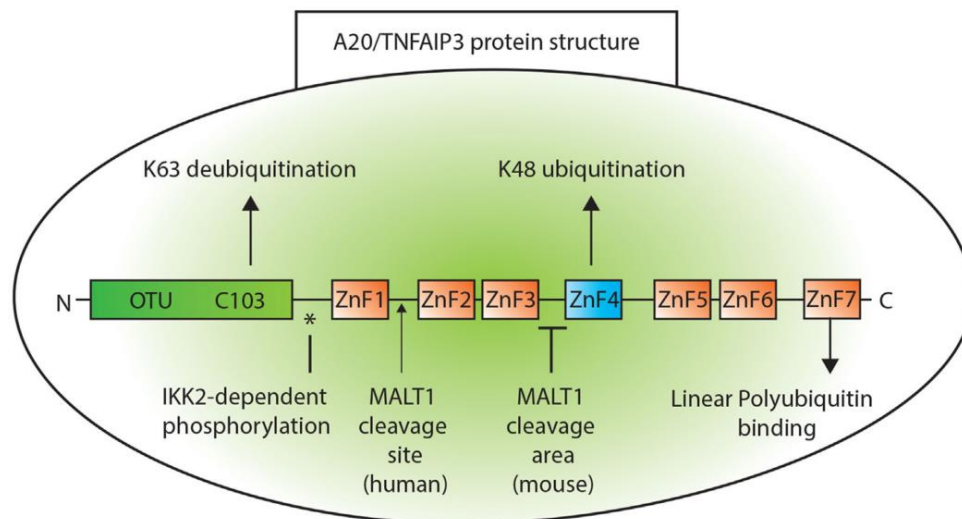


Abbildung 9: Schematische Darstellung der strukturellen Domänen des humanen A20-Proteins [45].

Im Laufe der Jahre wurden neben TNF unterschiedliche Stimuli für die Aktivierung von A20 identifiziert. Beispielsweise induzieren Lipopolysaccharid (LPS) und IL-1, sowie der Phorbol-ester PMA, der aktivierte B-Zell Oberflächenrezeptor CD40, die Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine, wie auch die Überexpression von humanem T-Zell-Leukämie-Virus-1 Tax-Protein und das

Epstein-Barr-Virus-Latent-Membrane-Protein-1 Genprodukt, die Expression von A20 [40, 46-49]. Hingegen supprimiert A20 seine eigene Expression [50]. Nach inflammatorischer Stimulation wurde in vielen Zellenarten eine Induktion der A20-Expression beobachtet [51]. Unter basalen Bedingungen wird A20 jedoch von den meisten Zellen, außer Thymozyten und peripheren T-Zellen, nicht exprimiert [52].

Homozygote A20-Knockout-Mäuse (A20 $-/-$) fallen mit spontaner Multiorganinflammation, Kachexie, und perinatalen Tod auf [53]. Im Speziellen haben histologische Untersuchungen an 3-6 Wochen alten A20 $-/-$ Mäusen schwere Inflammation und Gewebsschäden in multiplen Organen, einschließlich Leber, Niere, Gelenke und Knochenmark, gezeigt. Zudem zeigten durchflusszytometrische Analysen der Milzen und Lebern eine erhöhte Anzahl an aktivierten Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen [53]. A20 $-/-$ Mäuse starben 2 Stunden nach LPS-Applikation, wobei A20 $+/+$ und A20 $+/-$ Tiere ohne signifikante Morbidität überlebten [53]. In A20-Knockout-Mäusen konnte A20 zudem als ein negativer Regulator von proinflammatorischen NF- κ B-Signalwegen identifiziert werden [53]. NF- κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der zur proinflammatorischen Zellaktivierung mit Expression zahlreicher Entzündungsmediatoren wie Chemokine und Zytokinen führt [54]. Auch chimäre Mäuse mit A20-defizienten hämatopoetischen Stammzellen zeigten spontane Kachexie, welche jedoch durch die Depletion kommensaler intestinaler Bakterien mittels Antibiotika gelindert werden konnte [55].

Aufgrund seiner ubiquitär induzierbaren Expression und potenten antiinflammatorischen Wirkung wurde das A20-kodierende TNFAIP3-Gen auf Assoziationen mit unterschiedlichen Erkrankungen untersucht. Polymorphismen

im TNFAIP3-Gen konnten in Genom-weiten Assoziationsstudien mit mehreren Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden, einschließlich systemischen Lupus erythematodes (SLE), rheumatoider Arthritis (RA), Sjögren-Syndrom, Morbus Crohn, Psoriasis und Typ 1 Diabetes mellitus [56-60]. Genetische Variationen des TNFAIP3-Gens tragen zum Entwicklungsrisiko einer SLE-Erkrankung bei [56]. Anhaltende NF- κ B-Aktivierung durch A20-Inaktivierung als Folge von aberrantem Splicing kann ein Faktor für die Progression der RA sein [61]. Analog hierzu wurden Polymorphismen im TNFAIP3-Gen für RA beschrieben [60]. Ein Knochenmarkzellen-spezifischer Knockout für A20 in der Maus zeigte einen Phänotyp mit erosiver Polyarthrititis, ähnlich einer RA [62]. Letztlich wurde ein Mangel an A20 mit vielen Autoimmunerkrankungen assoziiert. In zytokinstimulierten β -Zellen der Ratte konnte gezeigt werden, dass A20 eine duale antiapoptotische and antiinflammatorische Funktion hat und somit im Rahmen des Typ 1 Diabetes mellitus vermutlich inselzellprotektiv wirkt [63]. Zwischenzeitlich wurden sechs nichtverwandte Familien mit einer heterozygoten Keimbahnmutation von A20 berichtet, die durch ein früheinsetzendes systemisches Inflammationssyndrom charakterisiert sind, ähnlich dem Morbus Behçet. In diesen Patienten zeigte sich eine vermehrte Translokation der NF- κ B-Untereinheit p65 in den Zellkern, vermehrter Abbau von I κ B α , einem weiteren NF- κ B-Inhibitor, und verstärkte Expression von proinflammatorischen Zytokinen [64]. Darüber hinaus konnten Krebserkrankungen mit A20-Defizienz assoziiert werden, einschließlich HIV-assoziierte Lymphome und B-Zell Lymphome [65]. Somit ist A20 auch eine tumorsuppressive Funktion zuzuschreiben.

Auch in unterschiedlichen Gewebekompartimenten der Niere konnte eine entzündungsbegrenzende und gewebeschützende Funktion von A20 nachgewiesen werden. Beispielsweise wirkt A20 anhand seiner NF- κ B-blockierenden Funktion zytoprotektiv auf renale proximale Tubulusepithelzellen [66]. Sowohl in vitro als auch in vivo konnte in HUVEC und in Rattennieren A20-vermittelter Schutz vor Inflammation und Schaden unter Ischämie/Reperfusions-ähnlichen Bedingungen gezeigt werden [67]. Außerdem konnte unter den gleichen Bedingungen nach Vorbehandlung mit humanen A20-transfizierten Adenoviren die Entstehung von akuter tubulärer Nekrose vermindert werden [67].

1.5.2 Rolle von A20 in TNF-abhängigen NF- κ B-Signalwegen

A20 spielt eine herausragende Rolle in der Inhibition von TNF-abhängigen proinflammatorischen NF- κ B-Signalwegen. TNF ist ein Zytokin, welches unter anderem von aktivierten Makrophagen produziert wird und eine wichtige Rolle in Inflamationsprozessen besitzt [68].

Es konnte gezeigt werden, dass TNF die Expression von A20 in unterschiedlichen Zellen induziert, im Speziellen wird die A20-Expression durch TNF-induzierte κ B-Elemente stimuliert [50, 69]. Beispielsweise wird A20 mRNA in kurzer Zeit (15 min) nach TNF-Gabe induziert [41]. Auch Zellen wie embryonale Maus-Fibroblasten, die in Ruhe vernachlässigbare Mengen an A20 mRNA exprimieren, zeigen nach TNF-Behandlung einen deutlichen Anstieg der A20 mRNA-Expression [53]. Umgekehrt zeigen verschiedene Zelltypen, beispielsweise die Brustkrebs-Zelllinie MCF7, die embryonalen

Maus-Fibroblasten NIH 3T3 oder die Fibrosarkom-Zelllinie WEHI 164 verbesserte Resistenz gegenüber TNF-vermittelter Zytotoxizität, wenn die A20-Expression auf Transkriptions- oder Proteinebene erhöht ist [69]. Hieraus wird deutlich, dass A20 als Gegenspieler von TNF wirkt.

Der TNF-abhängige NF- κ B-Signalweg wird nach Bildung des TNF-Rezeptor (TNFR)-Komplexes aktiviert. Dabei bindet TNF an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und aktiviert die Receptor-Interacting-Protein-Kinase-1 (RIP1), den TNFR-Associated-Factor-2 (TRAF2) und den TNFR-Associated-Factor-5 (TRAF5), was zur Bildung des TNFR-Komplexes führt (Abbildung 10) [70]. RIP1 wird durch das Ubiquitin-Conjugating-Enzyme-13 (Ubc13) und das Cellular-Inhibitor-of-Apoptosis-Protein-1/2 (cIAP1/2) K63-polyubiquitiniert, um die Inhibitor-of-NF- κ B-Kinase- γ (IKK- γ) und die Transforming-Growth-Factor- β -activated-Kinase 1 (TAK1)-TAB2/3-Komplex zu rekrutieren [71]. Durch anschließende lineare Polyubiquitinierung von IKK- γ mittels des Linear-Ubiquitin-Chain-Assembly-Complex (LUBAC) wird der I κ B-Kinase (IKK)-IKK- γ -Komplex stabilisiert und NF- κ B aktiviert [72, 73], so dass NF- κ B nach Translokation in den Zellkern als proinflammatorischer Transkriptionsfaktor wirkt.

A20 wiederum inhibiert die Funktion von Schlüsselproteinen des TNF-abhängigen NF- κ B-Signalweges und führt somit zur Terminierung der NF- κ B-Aktivierung. Dabei reguliert A20 NF- κ B-Signalwege mittels vielfältiger Proteinubiquitination [42]. Ubiquitination ist reversibel und wird durch einen Mechanismus aus Ubiquitinligasen und Deubiquitinasen, welche als Gegenspieler fungieren, kontrolliert [74]. A20 besitzt, wie bereits im Kapitel 1.5.1 beschrieben, eine Ubiquitin-modulierende Funktion.

Unter anderem interagiert A20 mit TRAF2, IKK- γ , der TNFR1-associated-DEATH-Domain (TRADD) und dem A20-Binding-Inhibitor-of-NF- κ B-Activation (ABIN) [75-77]. Beispielsweise bindet die N-terminale Domäne von A20 an die C-terminale Domäne von TRAF2 [75]. Die Aktivität des IKK-Signalweges im TNFR1-Komplexes wird durch die Bindung von RIP1 und A20 an IKK- γ reguliert [76]. Indem A20 Lysin (K)-63-verkettete, RIP1- und IKK- γ -gebundene Ubiquitinpolymere löst wird der Komplex destabilisiert und die weitere Signaltransduktion blockiert. Indem RIP1 direkt durch A20-vermittelte K48-Ubiquitinierung zur Proteindegradation markiert wird, wird die NF- κ B-Aktivierung ebenfalls gehemmt (Abbildung 10) [42, 45]. Die direkte TNF-induzierte Translokation in den Zellkern und DNA-Bindung von NF- κ B wird durch A20 jedoch nicht inhibiert [77]. Interessanterweise kann das systemische Inflammationssyndrom der A20-defizienten Mäuse in transgenen Tieren mit zusätzlicher Expression von inaktivem RIP1 ohne Kinaseaktivität verhindert werden [78]. Diese Daten weisen auf die Bedeutung der RIP1-Hemmung für die entzündungsbegrenzende Funktion von A20 hin.

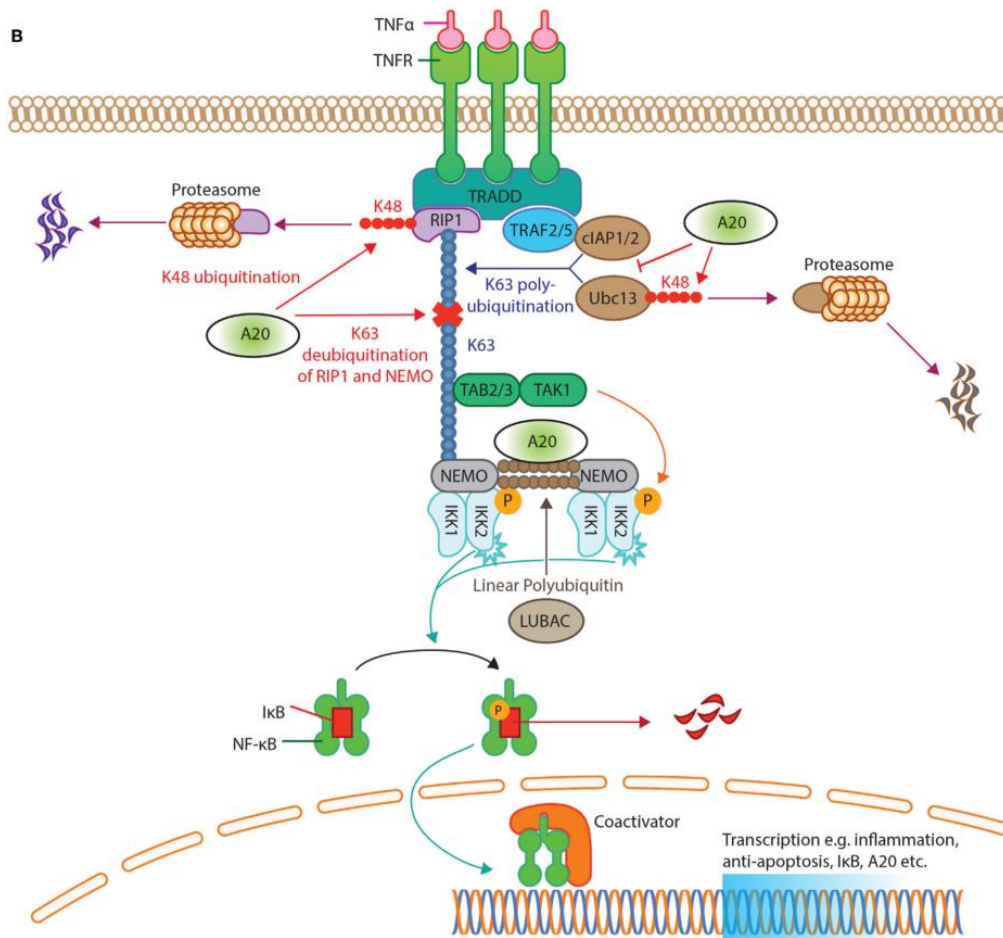


Abbildung 10: Schematische Darstellung der TNF-Rezeptor-abhängigen NF-κB-Aktivierung und inhibitorische Effekte von A20 [45].

1.5.3 Rolle von A20 in TNF-unabhängigen Signalwegen

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass A20 nicht nur eine anti-inflammatorische Rolle in TNF-abhängigen Signalwegen spielt, sondern auch in anderen inflammatorischen Prozessen. Doppel-Knockout-Mäuse sowohl für A20 und TNF als auch für A20 und TNFR1 fielen mit spontaner Inflammation, vergleichbar mit der von A20 ^{-/-} Mäusen, auf [79]. Daraus konnte geschlossen werden, dass TNF alleine nicht entscheidend für die Entwicklung des A20 ^{-/-} Phänotyps ist.

Beispielsweise konnte eine inhibitorische Rolle von A20 auch in Toll-like-Rezeptor (TLR)-induzierten Signalwegen gezeigt werden. Doppel-Knockout-Mäuse mit A20-Defizienz, denen zusätzlich das TLR-Adaptorprotein MyD88 fehlt, zeigen im Vergleich zu einfachen A20-Knockout-Mäusen weniger Inflammation und Kachexie [55]. Nicht nur in vivo sondern auch in vitro konnte gezeigt werden, dass A20 eine wichtige Rolle in der negativen Regulation der TLR-Antwort besitzt [79]. A20 hemmt TLR-Signale durch die Deubiquitinierung von TRAF6, einem Schlüsselmolekül für die intrazelluläre Signaltransduktion nach TLR-Aktivierung [55, 79]. LPS-Stimulation führt in Knochenmarksmakrophagen zu einer TRAF6-Ubiquitinierung, die A20-abhängig nach 40 Minuten wieder reduziert wird. In A20 ^{-/-} Zellen hingegen ist die TRAF6-Ubiquitinierung nach 40 und 60 min verstärkt, sodass die LPS-induzierte Aktivierung der TLR-Antwort nicht begrenzt wird [55]. In intestinalen Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass A20 ein früher negativer Regulator des TLR5-Signalweges ist [80]. Da A20 in den meisten Zellen in Ruhe nicht exprimiert wird muss nach Zellstimulation Induktion der A20-Expression erfolgen, um TLR-vermittelte Inflammation zu inhibieren. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die A20-Expression nach TLR-Aktivierung in Makrophagen induziert wird [79].

Neben TNF- und TLR-induzierten Signalwegen werden auch andere inflammatorische Zellantworten durch A20 inhibiert. Nachdem ursprünglich vermutet wurde, dass A20 die NF- κ B-Aktivierung durch IL-1 β in embryonalen Mausfibroblasten nicht hemmt [53], konnte A20 im Verlauf als Inhibitor von pro-IL-1 β und RIP3-abhängiger NLRP3-Inflammasom-Aktivität in Makrophagen identifiziert werden [81]. Zudem wurde A20 als negativer Regulator von NLRP3-

Inflammasom und IL-1 β -abhängigen Signalwegen im Mausmodell der rheumatoiden Arthritis charakterisiert [62].

Auch eine Rolle von A20 in der Funktion von Tight-Junctions wurde beschrieben. Dabei deubiquitiniert A20 das polyubiquitinierte Occludin und verhindert dessen Abbau. Hierzu konnte in vivo gezeigt werden, dass LPS-behandelten Villin-TNFAIP3-transgene Mäusen mit A20-Überexpression eine reduzierte intestinale Permeabilität im Vergleich zu Wildtyp aufweisen. A20 $-/-$ Mäuse zeigten hingegen eine verstärkte Permeabilität [82].

A20 beeinflusst auch die Immunantwort auf virale Stimuli. Beispielsweise reagierten A20-defiziente Makrophagen nach Stimulation mit Influenza-A-Viren oder Doppelstrang-RNA mit verstärkter NF- κ B- und Interferon-Regulatory-Factor-3 (IRF3)-Aktivierung sowie vermehrter Zytokin-, Chemokin- und Typ I-Interferon-Expression [83]. Des Weiteren inhibiert A20 die Entwicklung von DCs, die Produktion inflammatorischer Zytokine und die immunstimulierende Potenz in DCs und schwächt somit die Antigen-Präsentation ab [84].

1.5.4 Rolle von A20 beim regulierten Zelltod

Neben seiner antiinflammatorischen Funktion konnte eine funktionelle Rolle von A20 auch bei Formen des regulierten Zelltods aufgezeigt werden. Zunehmend kommen regulierte Zelltodformen in den Fokus der Forschung. Die lange geglaubte Dichotomie des Zelltodes, die akzidentielle Nekrose gegenüberstehend zur regulierten Apoptose, scheint überholt. Vielmehr scheinen Apoptose und Nekrose Extreme eines breiten Zelltod-Spektrums zu sein. Teil dieses Spektrums sind Prozesse, welche den Charakter eines

nekrotischen Zelltodes aufweisen, jedoch über molekulare Mechanismen zellulär reguliert ablaufen. Erkenntnisse basierend auf genetischen Daten und die Entdeckung intrazellulär wirkender chemischer Nekrose-Inhibitoren haben dazu beigetragen, eine Vielzahl an Signalwegen für die regulierte Nekrose zu identifizieren [85-87]. Ein wichtiger Vertreter der regulierten Nekrose und im Fokus der vorliegenden Studie ist die Nekroptose, welche als eine RIP1- und RIP3-abhängige Form der regulierten Nekrose definiert ist [88-92]. Im Gegensatz zu RIP1 ist RIP3 kein essentieller Bestandteil von NF- κ B-Signalwegen [93]. Nekroptose scheint eine Rolle in der Abwehr von intrazellulären Infektionen zu spielen [94, 95]. Zudem konnte Nekroptose mit der Entstehung von einer Reihe unterschiedlicher Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden, einschließlich Myokardinfarkte, Schlaganfällen, Atherosklerose, Ischämie-Reperfusionsschaden, Pankreatitis und chronisch entzündliche Darmerkrankungen [96-102]. Ferner wurde für die Nekroptose eine Rolle in der Kontrastmittel-induzierten Nephropathie, dem Cisplatin-induzierten akuten Nierenversagen, der Folat-Nephropathie und dem renalen Ischämie-und Reperfusionsschaden identifiziert [98, 103-105].

Bereits 1999 wurde bekannt, dass A20 Zytokin-induzierte Apoptose und NF- κ B-abhängige Genaktivierung in Inselzellen inhibiert [63]. Wenig später konnte gezeigt werden, dass A20 Thymozyten vor TNF-abhängigen regulierten Zelltod, unabhängig von der Proteinsynthese oder anderen bekannten Überlebensfaktoren, schützt [53]. Entsprechend sind A20-defiziente intestinale Epithelzellen hypersensitiv gegenüber TNF-abhängiger Apoptose [106]. A20 schützt Endothelzellen vor Komplement-abhängiger Nekrose und inhibiert sowohl TNF als auch Fas-abhängige Apoptose, was vermuten lässt, dass A20 an einem gemeinsamen Punkt unterschiedlicher Signalwege eingreift [107].

A20 greift in den TNF-abhängigen Apoptose-Signalweg ein, indem die apikalen Caspasen 8 und 2 blockiert und somit die anschließenden Effektormoleküle, die Caspasen 3 und 6 und den BH3 Interacting Domain Death Agonist (Bid), inhibiert werden, was zu einer verminderten Freisetzung von Cytochrom C aus der inneren Mitochondrienmembran führt (Abbildung 11) [107]. Zudem schützt A20 durch die Inhibierung von Caspase 8 vor Natürlichen Killer (NK)-Zell-abhängiger Apoptose in Endothelzellen [107]. Im Gegensatz dazu scheint A20 in einigen Zelltypen programmierten Zelltod zu vermitteln. Denn A20-defiziente B-Zellen sind resistent gegenüber Fas-vermitteltem Zelltod, wahrscheinlich aufgrund von erhöhter Expression NF- κ B-abhängiger antiapoptotischer Proteine wie Bcl-x [108, 109].

Der Einfluss von A20 auf programmierten Zelltod wurde nicht nur für Apoptose, sondern auch für die Nekroptose beschrieben. Beispielsweise inhibiert A20 Nekroptose in T Zellen und Fibroblasten [110]. Zudem konnte in vivo gezeigt werden, dass Defizienz von RIP3, einem Schlüsselmolekül im Nekroptose-Signalweg, das frühere Absterben von A20-defizienten Mäusen verhinderte. Tatsächlich entfernt A20 mittels Deubiquitinierung K63-Polyubiquitinketten von RIP3, was die Ausbildung von RIP1-RIP3-Komplexen inhibiert (Abbildung 12), die zur Auslösung der Nekroptose erforderlich sind [110, 111].

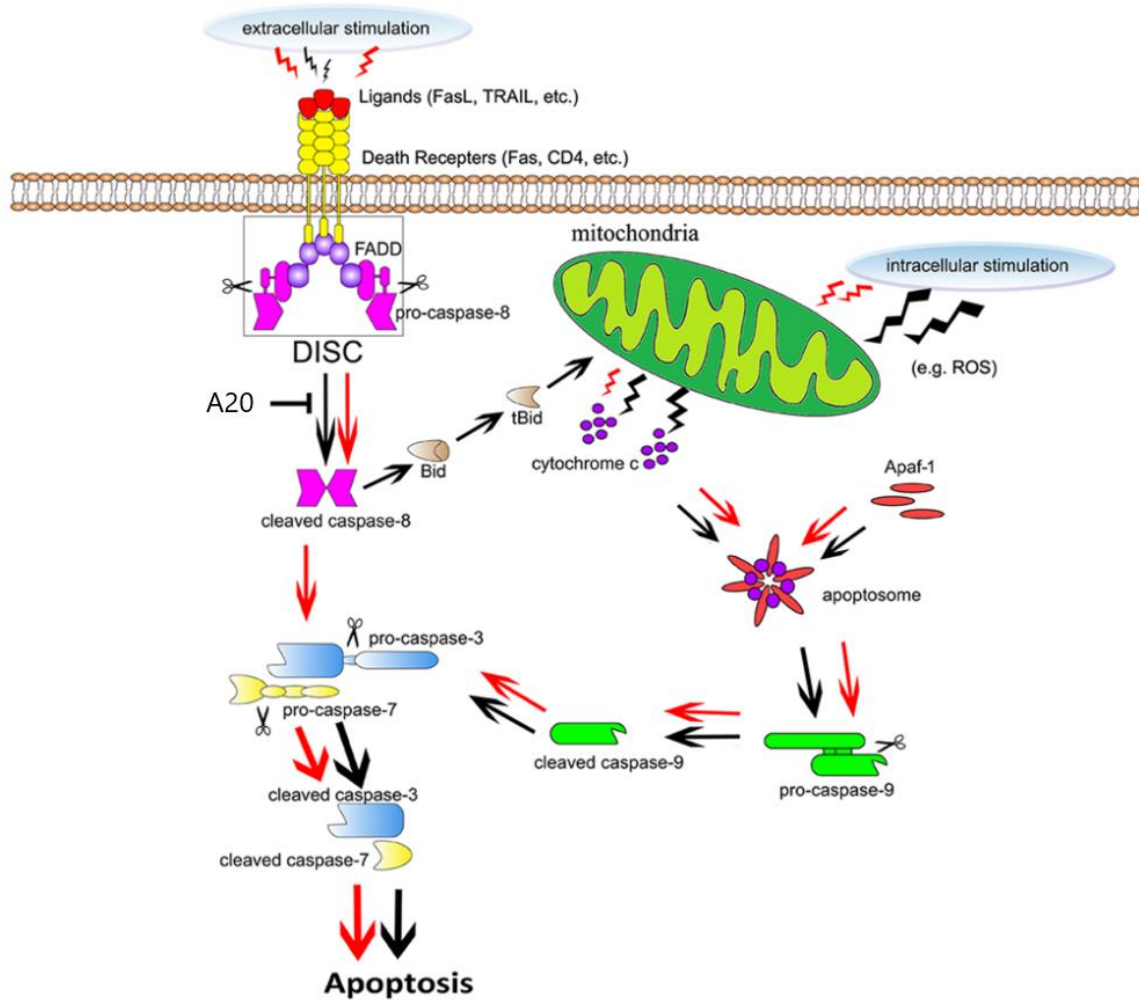


Abbildung 11: Übersicht der Funktion von A20 bei der Apoptose
(Abbildung wurde modifiziert nach S. Daniel et al. 2014) [107, 112]

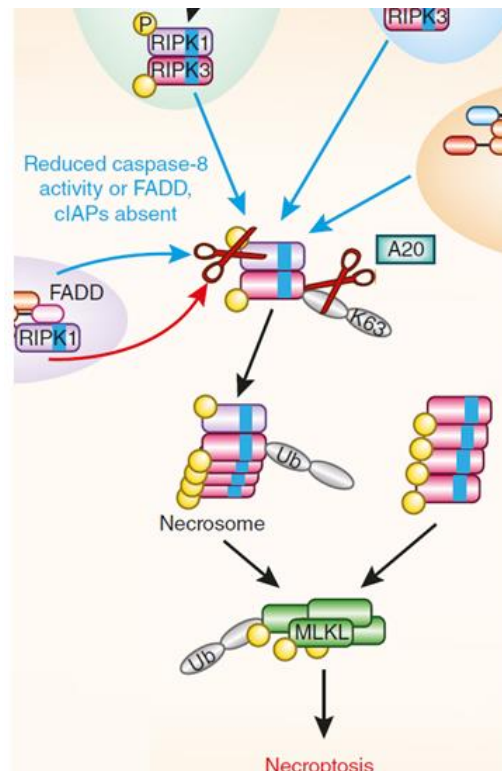


Abbildung 12: Übersicht der Funktion von A20 bei der Nekroptose (Abbildung wurde modifiziert) [111].

1.6 Hypothese der Arbeit

A20 ist ein negativer Regulator von NF- κ B-Signalwegen und begrenzt damit als endogener Inhibitor Entzündungsreaktionen und programmierten Zelltod. Wie bereits in Kapitel 1.5.1 beschrieben konnten Polymorphismen im TNFAIP3-Gen mit mehreren Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden. Obwohl A20 in vielen experimentellen Studien untersucht wurde, ist über die Rolle von A20 bei inflammatorischen Nierenerkrankungen bisher wenig bekannt. Die häufigste Autoimmunerkrankung in der Niere ist die GN. Bei der Immunkomplex-vermittelten GN wird die Entzündung der Glomeruli durch die glomeruläre Ablagerung Antigen-gebundener Immunglobuline,

der nachfolgenden Aktivierung des Komplementsystems und von infiltrierenden Leukozyten verursacht. A20 mit seiner entzündungsbegrenzenden, NF- κ B-inhibierenden Funktion sollte auch ein wichtiger endogener Inhibitor dieses glomerulären Entzündungsprozesses sein. Die Rolle von A20 in der Immunkomplex-GN wurde bisher jedoch nicht untersucht.

Um die funktionelle Rolle von A20 im Verlauf einer Immunkomplex-GN zu charakterisieren, sollte daher das Modell der NTN als murine Form einer Immunkomplex-GN in Wildtyp- und A20-defizienten Mäusen untersucht werden. Insbesondere die autologe Phase der NTN (siehe Kapitel 1.4) entspricht hierbei aufgrund der Ablagerung autologer Immunkomplexe und der adaptiven Immunantwort dem Verlauf der humanen Erkrankung. Entsprechend der bisher bekannten Funktionen von A20 ist davon auszugehen, dass A20-Defizienz zur Verschlechterung der Immunkomplex-GN führt. Sollte sich diese Hypothese im Modell der murinen NTN bestätigen würden diese Ergebnisse A20 als wichtigen endogenen Regulator identifizieren, der auch glomeruläre Entzündungsreaktionen begrenzt. Diese könnten dann die Basis für das Erforschen neuer Therapieansätze am Menschen sein, die A20 als therapeutische Zielstruktur nutzen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Materialien für die Genotypisierung

PCR Direkt	Peqlab, Erlangen	Proteinase K	Merck, Darmstadt
TRIS	Roth, Karlsruhe	Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt	Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
Borsäure	Sigma, Deisenhofen	Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt	Tween 20	Sigma Aldrich, Deisenhofen
DNA-Leiter, 25-700 bp	Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, USA	10x PCR-Puffer	Minerva BioLabs, Berlin
dNTP	GE Healthcare, München	A20-Primer	Metabion, Planegg/Steinkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen	Mastercycler pro S	Eppendorf, Hamburg
Glycerin	Sigma, Deisenhofen		

6x Glycerinladepuffer:

25 ml 50% Glycerin
0,125 g 0,25% Bromphenolblau
0,125 g 0,25% Xylencyanol
10 ml 100 mM EDTA
15 ml ddH₂O

10x TBE-Puffer:

108 g TRIS
55 g Borsäure
5,84 g EDTA
auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen

2.1.2 Materialien für die NTN-Induktion

ChromPure Sheep IgG	Jackson, West Grove, USA	Sonifier B12	Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Adjuvans	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Anti-GBM Serum (PTX-001S)	Probetex, San Antonio, USA

2.1.3 Materialien für die Zellkultur und Glomeruli-Isolation

EBM Basal Medium 500ml	Lonza Group Ltd, Basel, CH	RPMI 1640- Medium	Invitrogen, Karlsruhe
EGM-MV BulletKit	Lonza Group Ltd, Basel, CH	Sodium pyruvate	Irvine Scientific, Santa Ana, USA
DMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe	Sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Merck, Darmstadt	FBS	Biochrom, Berlin
DPBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	Glucose 5%	B. Braun AG, Melsungen
Advanced Glycation Endproduct	Calbiochem (Merck), Darmstadt	Rekomb. Maus TNF- α	Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, USA
HEPES, 1M buffer solution	Invitrogen, Karlsruhe	Insulin from Bovine Pancreas	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FBS (steril gefiltert)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kollagenase A	Roche, Mannheim	Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	Cell Separation Magnet	BD, Heidelberg

2.1.4 Materialien für die Splenozytenisolation und -aktivierung

Zellsieb 70 µm	BD, Heidelberg	Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
DMEM-(1X) + GlutaMAX™-I Medium	Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, USA	FBS (steril gefiltert)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS	Pan Biotech, Aidenbach	ChromPure Sheep IgG	Jackson, West Grove, USA

Tris-Puffer:

20,6 g Tris in 1000 ml ddH₂O
mit HCl auf pH 7,65 einstellen

MACS-Puffer:

5 g BSA in 1000 ml PBS
4 ml 0,5 M EDTA

Tris-Ammoniumchlorid Puffer (TAC):

50 ml Tris-Puffer
450 ml 0,83% Ammoniumchlorid
pH auf 7,2 einstellen

2.1.5 Materialien für die Zellkultur der mMCs

DMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe	Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PBS	Pan Biotech, Aidenbach	Rekomb. Maus TNF-α	Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, USA
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	Z-VAD-FMK	InvivoGen, San Diego, USA
FBS	Summit Biotechnology, Fort Collins, USA	Necrostatin-1s (Nec-1s)	BioVision, Milpitas, CA, USA

2.1.6 Materialien für die Durchflusszytometrie

FACS Rinse	BD, Heidelberg	FACS Flow	BD, Heidelberg
FACS Clean	BD, Heidelberg	EDTA	Merck, Darmstadt
PBS	Pan Biotech, Aidenbach	Normal Mouse Serum	Jackson, West Grove, USA
DNase Typ IV	Sigma, Deisenhofen	Normal Rat Se- rum	Jackson, West Grove, USA
Kollagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen	FACSCalibur	BD, San Jose, CA, USA
Falconröhrchen Rundboden 12 ml	TPP, Trasadingen, CH		

10x-HBSS (Hank's Balanced Salt Solution):

4 g KCl
 0,6 g KH_2PO_4
 80 g NaCl
 0,621 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 3,5 g NaHCO_3
 1,4 g CaCl_2
 1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 10 g D-Glukose
 auf 1000 ml mit H_2O auffüllen

Kollagenase/DNase:

10 mg Kollagenase Typ I
 1 mg DNase Typ IV
 in 10 ml HBSS (ohne Ca, Mg)

Paris Puffer:

20 mM Tris-HCl
 125 mM NaCl
 10 mM KCl
 10 mM Na-Azetat
 5 mM D-Glukose
 auf 1000 ml mit H_2O auffüllen

2 mM EDTA/HBSS-Lösung:

100 μl 0,2 EDTA-Stammlösung
 10 ml HBSS (ohne Ca, Mg)

10x-HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} :

4 g KCl
 0,6 g KH_2PO_4
 80 g NaCl
 0,621g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 auf 1000 ml mit dd H_2O auffüllen

FACS-Puffer:

500 ml 1x PBS

0,2 % BSA

0,1 % Na-Azid

Antikörper:

Anti-CD3e-FITC Alexa 488	BD, Heidelberg	Isotyp anti-F4/80- APC	Serotec, Düsseldorf
Anti-CD4-APC Alexa 647	BD, Heidelberg	Isotyp anti-CD3 Alexa 488	BD, Heidelberg
Anti-CD45-PE	BD, Heidelberg	Isotyp anti-CD8a Cy5-PE	BD, Heidelberg
Anti-CD8a-Cy5- PE	BD, Heidelberg	Isotyp anti-CD11c FITC	BD, Heidelberg
Anti-F4/80-APC	Serotec, Düsseldorf	Isotyp anti-CD45 PE	BD, Heidelberg
Anti-CD11c-FITC	BD, Heidelberg		

2.1.7 Materialien für den ELISA

ELISA-Reader Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim	ELISA Micoplate Strip Washer ELx50	BioTek, Bad Friedrichshall
Maus MCP-1 ELISA Set	BD, Heidelberg	Maus KIM-1 ELISA Set	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.8 Materialien für den Western Blot

Tris	Roth, Karlsruhe	Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Bromphenolblau	Merck, Darmstadt

Complete Protease Inhibitor	Roche, Mannheim	TEMED	BioRad, München
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma, Deisenhofen	Restore Plus Stripping Buffer	Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, USA
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	BioRad, München	Methanol	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen	miniVE Vertical Electrophoresis System	GE, Freiburg
Trans-Blot® SD semi-dry transfer	BioRad, München	ECL Prime	Amersham, GE, Freiburg
Immobilon PVDF Transfermembran	Millipore, Schwalbach	Ultra-Turrax® T25 basic	IKA-Werke, Staufen
Rotiphorese®Gel 30 % Acrylamid	Roth, Karlsruhe	Roto-Torque Model 7637	Cole Parmer, Illinois, USA
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München		

Tris Buffered Saline (TBS):

50mM Tris

150 mM NaCl

mit HCl auf pH 7,6 eingestellt

Laufpuffer, pH 8,3:

3g Tris

14,4g Glycine

0,5g SDS

mit ddH₂O auf 1000ml auffüllenTrennpuffer, pH 8,8:

18,2g Tris (1,5mM)

0,4g SDS

auf 100ml mit ddH₂O auffüllenTBS-Tween-20 (TBS-T):

0,1% Tween-20 in TBS

10 x Ladepuffer (nach Lämmli):

1ml Glycerol

2 g SDS

1mg Bromphenolblau

2,5 ml β -Mercaptoethanol

5 ml 1M Tris HCl (pH 6,8)

1,5 ml ddH₂OTransferpuffer:

1,5g Tris

Glycine 7,2g

mit ddH₂O auf 500ml auffüllen

Sammelpuffer, pH 6,8:

6,05g Tris (0,5mM)

0,4g SDS

auf 100ml mit ddH₂O auffüllenAntikörper:

Anti-Rabbit IgG, HRP-linked, #7074S	Cell Signaling, Cambridge, UK	Anti-RIP3, ab152130	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Mouse IgG, HRP-linked, #7076S	Cell Signaling, Cambridge, UK	Cleaved Caspase 3, #9661S	Cell Signaling, Cambridge, UK
Anti-RIP1, ab72139	Abcam, Cambridge, UK	β-Actin, #4967S	Cell Signaling, Cambridge, UK

2.1.9 Materialien für die Real-Time PCR

Ethanol	Merck, Darmstadt	MgCl ₂ (25mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
PureLink RNA Mini Kit	Ambion, Darmstadt	10x Taq Puffer without detergent	Fermentas, St. Leon-Rot
RNasin (40 U/μl)	Promega, Mannheim	SYBR Green Dye detection	Applied Biosystems, Norwalk, USA
β-Mercapto- ethanol	Roth, Karlsruhe	BioStab PCR Optimizer	Bitop, Witten
RNase free Spray	Gene Choice, Frederick, USA	Taq DNA Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe	Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe
Linear Acrylamid	Ambion, Darmstadt	Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
DTT (0,1M)	Invitrogen, Karlsruhe	RNA loading buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

dNTPs (25nM)	GE Healthcare, München	System Light- Cycler® 480	Roche, Basel, CH
Hexanucleotide	Roche, Mannheim	LightCycler® 480 Multiwell-Plate 96	Roche, Basel, CH
5x First strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe	Nano drop	PEQLAB Biotechnology, Erlangen

2.1.10 Materialien für die kolorimetrischen Methoden

Bio-Rad Protein Assay	BioRad, München	CellTiter 96® Assay (MTT)	Promega Corp, Madison, WI, USA
Creatinine FS	DiaSys, Holzheim	Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Mannheim

2.1.11 Materialien für die Histologie

Magermilchpulver	Merck, Darmstadt	Ethanol	Merck, Darmstadt
Formalin	Merck, Darmstadt	Xylol	Merck, Darmstadt
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Torrance, CA, USA	VectaMount	Vector Laborato- ries, Burlingame, CA, USA
Antigen Unmasking Solution	Vector Laborato- ries, Burlingame, CA, USA	Avidin/Biotin Blocking Kit V	Vector Laborato- ries, Burlingame, CA, USA
Vectastain Elite ABC	Vector Laborato- ries, Burlingame, CA, USA		

Antikörper:

Biotinylierter AK, Kaninchen, anti-Ratte IgG	Vector Laborato- ries, Burlingame, CA, USA	Ratte, anti- Mensch CD3 (bindet an Maus)	AbD Serotec, Oxford, UK
--	--	--	----------------------------

Biotinylierter AK, Ratte, anti-Ziege IgG	Vector Laborato- ries, Burlingame, CA, USA	Biotinylierter AK, Ziege, anti- Kaninchen IgG	Vector Laborato- ries, Burlingame, CA, USA
Hamster, anti-Nephrin	Acris Antibodies, Herford	Ratte, anti-WT-1	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Ratte, anti-Maus F4/80	AbD Serotec, Oxford, UK	TUNEL Kit	Roche, Mannheim
Ratte, anti-Mac2	Cederlane, Ontario, Kanada	Anti-Maus IgG	Caltag, Burlingame, USA

2.1.12 Weitere Geräte

Mikroskopie:

Lichtmikroskop Leica DM RBE	Leica Micro- systeme, Wetzlar	Lichtmikroskop Zeiss Axioplan 2	Carl-Zeiss AG, Oberkochen
Lichtmikroskop Leica DM IL	Leica Micro- systeme, Wetzlar	Axiocam HR	Carl-Zeiss AG, Oberkochen
Leica DC 300F	Leica Micro- systems, Wetzlar		

Pipetten:

Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	BD, Heidelberg	Pipettierhilfe Pipetus-classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten Pipetman	Gilson, Middleton, WI, USA	Pipettenspitzen 1 bis 1000 µl	Peske, Aindling- Arnhofen
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg	Pipettenspitzen epT.I.P.S.	Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen:

Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg	Heraeus Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepa- tech, Osterode
Centrifuge 5418C	Eppendorf, Hamburg	Heraeus Minifuge T	Heraeus Sepa- tech, Osterode

Waagen:

BP 110 S	Sartorius, Göttingen	Mettler PJ 3000	Mettler-Toledo, Greifensee, CH
----------	-------------------------	-----------------	-----------------------------------

Sonstige Geräte:

Autoklav 23	Melag Medizin- technik, Berlin	Sicherheitswerkbank Microflow	Nunc GmbH, Wiesbaden
Mikrotom HM340E	Microm, Heidelberg	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Mikrotom RM2125	Leica Micro- systems, Wetzlar	Ultracut	Leica Micro- systems, Wetzlar
Perfusionsgerät	Werner Vielhauer, München	UV-Licht	Bachofer Labor- geräte, Reutlingen
pH-Meter WTW	WTW, Weilheim	Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad HI 1210	Leica Micro- systems, Wetzlar	Type B5060 EC- CO2	Heraeus Sepatech, München
Steril Card Hood Class II Typ A/B3	Baker Company, Sanford, ME, USA	Neubauer- Zählkammer	Roth, Karlsruhe

2.1.13 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Platten	Nunc, Wiesbaden	Super Frost Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
96-Well-Platten	Nunc, Wiesbaden	Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml und 2 ml	TPP, Trasadingen, CH
Primaria 100 mm Cell Culture Dish	Corning B.V., Amsterdam, NL	Falconröhrchen 15ml und 50ml	TPP, Trasadingen, CH
Skalpelle No. 11 und 20	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan	Zellschaber 24 cm	TPP, Trasadingen, CH
Pasteurpipette	Roth, Karlsruhe	Zellsieb 70 µm und 100 µm	BD, Heidelberg

Kryovials	A Laboratories, Eastleigh, UK	Albumstix Teststreifen	Bayer, Leverkusen
CoolCell Einfrierboxen	Biocision, Larkspur, USA	30%-H ₂ O ₂	Merck, Darm- stadt
Dynabeads M-450 Epoxy	Invitrogen, Karlsruhe	Aceton	Merck, Darm- stadt
Gewebekassetten Histosette-II	NeoLab, Heidelberg	Diaminobenzidin	Sigma, Deisenhofen
Petrischalen Ø 60 und 96 mm	TPP, Trasadingen, CH	HCl	Merck, Darm- stadt
Spritzen 2 ml, 5 ml und 10 ml	BD, Heidelberg	Isopropanol	Merck, Darm- stadt
Kanülen 19 G, 26 G und 30 G	BD, Heidelberg	Methylgrün	Sigma, Deisenhofen
Zellkulturschale 96 x 21 mm	TPP, Trasadingen, CH	NaCl	B. Braun, Melsungen

Die Chemikalien zur Herstellung der Puffer wurden, falls nicht anders beschrieben, von Merck bezogen.

2.1.14 Software

LightCycler® 480, v1.2.9.11	Roche, Mannheim	Office 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
CellQuest	BD Pharmingen, Heidelberg	QWin	Leica Micro- systems, Wetzlar
Endnote X7	Thomson Reuters, New York, NY, USA	Image J	Wayne Rasband, Open Source, USA
Prism	GraphPad Soft- ware, San Diego, CA, USA	Windows 7 und 10	Microsoft, Redmond, WA, USA

2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurde das murine NTN-Modell in einer A20-Knockout-Maus im C57BL/6-Hintergrund induziert. In A20-defizienten Mäusen ersetzt eine PGK-neo-Kassette in reverser Transkriptionsorientierung die Exons 1-4. Hier enthalten sind das ATG-Startkodon und die Aminosäuren 1-246. Diese Mäuse wurden in C57BL/6 Mäusen über mindestens 6 Generationen rückgekreuzt [53]. A20-heterozygot-defiziente Mäuse (A20 +/-) entsprechen in ihrer Spontanentwicklung phänotypisch C57BL/6 Wildtyp-Mäusen. A20-homozygot-defiziente Mäuse (A20 -/-) hingegen entwickeln ein spontanes Inflammationssyndrom. Hier zeigen sich Gewebeentzündungen in der Niere, Leber, Intestinaltrakt, Gelenke und Knochenmark [53]. Die A20 -/- Tiere bleiben nach Geburt auffällig klein und sterben meist innerhalb weniger Wochen nach der Geburt. Jedoch werden A20 -/- Mäuse nach Mendelschen Regeln geboren, somit scheint A20 nicht für das Überleben von Embryos nötig zu sein.

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden A20 +/- Mäuse verwendet. Als Wildtyp-Kontrollen wurden Wurfgeschwister verwendet. Aus tierschutzethischen Gründen wurden A20 -/- Tiere nach Absetzung und Genotypisierung euthanasiert.

2.2.2 Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden in der Versuchstierhaltung des Nephrologischen Zentrums des LMU Klinikums, Campus Innenstadt, Schillerstraße 42 untergebracht. Die Tierhaltung erfolgte unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen und artgerecht. Maximal 5 Versuchstiere wurden in autoklavierten Macrolone Typ II L Käfige mit Filterdeckel gehalten. Es bestand ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden, uneingeschränkter Zugang zu autoklaviertem Trinkwasser, Futtermittel (ssniff®) und Nestbaumaterial. Die Raumtemperatur wurde auf 22-23°C und die Luftfeuchtigkeit auf 50-60% konstant gehalten. Am 21. Tag wurden die Jungtiere von den Elterntieren abgesetzt und nach Geschlecht aufgetrennt. Tiere wurden durch Lochmarkierungen an den Ohren gekennzeichnet. Alle aufgeführten tierexperimentellen Methoden wurden nach Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die durchgeführten Tierversuche waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt worden.

2.2.3 Genotypisierung

Alle Versuchstiere wurden im Alter von 3 Wochen genotypisiert. Hierfür wurde die Schwanzspitze der Mäuse entfernt (ca. 2 mm). Das Gewebe wurde in 200 µl 1x PCR-Direct® mit 1,5 µl Proteinase K (Konzentration 20 mg/ml) bei 56 °C im Thermomixer für 4 Stunden unter ständigem Rütteln (750 U/min) lysiert. Inaktivierung der Proteinase K erfolgte durch Erhitzen auf 85°C für 45 Minuten.

Zur Genotypisierung wurde die aus den Schwanzspitzen extrahierte DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die PCR erlaubt die

Detektion und Produktion großer Mengen DNA [113]. Hierfür wurden die Proben mit den A20-Primern (Tabelle 2), Taq-DNA-Polymerase und dNTPs versetzt und vorbereitet (Tabelle 3). Für eine PCR müssen 3 Schritte ablaufen:

1. Die Denaturierung (Auftrennung der DNA-Stränge) der Probe erfolgt durch Erhitzung des Gemisches.
2. Die Primerhybridisierung, bei der die Primer nach Abkühlung des Probengemisches an die gesuchten DNA-Abschnitte bindet.
3. Die Phase der Elongation. Erneutes Erwärmen des Probengemisches erlaubt der DNA-Polymerase einen zur Proben-DNA komplementären DNA-Strang mit dem Primer als Ausgangspunkt anzubauen und somit die Vervielfachung des gesuchten DNA-Abschnittes zu ermöglichen [113]. Für ein optimales Genotypisierungsergebnis der A20-Tiere wurden 34 PCR-Zyklen in einem Thermocycler durchgeführt (Tabelle 4).

Primer	Sequenz
A20 5'	5'- GAA CTG TCT CAG CAT TGA C -3'
A20 NEO	5'- CTC GTG CTT TAC GGT ATC -3'
A20 3a'	5'- CCA CCA CCA TTC AAT CCT -3'

Tabelle 2: Primer-Sequenzen.

Bestandteile	Menge in µl
H ₂ O	14,3
10x PE Puffer	2,5
1,25 mM dNTPs	4
A20 5' (1:10)	0,5
A20 Neo (1:10)	0,5
A20 3a' (1:10)	0,5
Optimizer	2
Taq-Polymerase	0,2
Probe (DNA)	0,5

Tabelle 3: PCR-Mix.

PCR-Phase	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Denaturierung	94	5 min	
Denaturierung	94	1 min	1
Primerhybridisierung	52	1 min	34x
Elongation	72	2 min	1
Elongation	72	5 min	
Ende	4	∞	

Tabelle 4: PCR-Ablauf.

Die amplifizierte DNA wurde mittels Elektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde ein 1,5%iges Agarosegel (1,5 g) in 100 ml 1x-TBE-Puffer hergestellt. Dazu wurden 12 µl Ethidiumbromid (Konzentration 10 mg/ml) hinzugegeben. Das Gel wurde anschließend in eine Form gegossen. Die Proben (je 25 µl) wurden mit 5 µl 6x-Glycerinladepuffer versetzt. In die 1. Tasche wurden 4 µl eines Größenstandards pipettiert. In die nächsten Taschen wurden jeweils 12 µl einer Probe pipettiert. Negativkontrolle war eine DNA-freie Probe, versetzt mit der äquivalenten Menge an H₂O. Die Elektrophorese lief bei 150 V für 1 Stunde. Ausgewertet wurde das Gel in einer Dunkelkammer mittels UV-Licht (Abbildung 13). Das amplifizierte WT-A20-Gen in Mäusen zeigte eine Bande mit der Länge von 664 Basenpaaren (bp), welche von der A20-Knockout-Bande mit einer Länge von 590 bp zu unterscheiden war. Heterozygote A20-Knockout-Mäuse wiesen beide Banden auf.

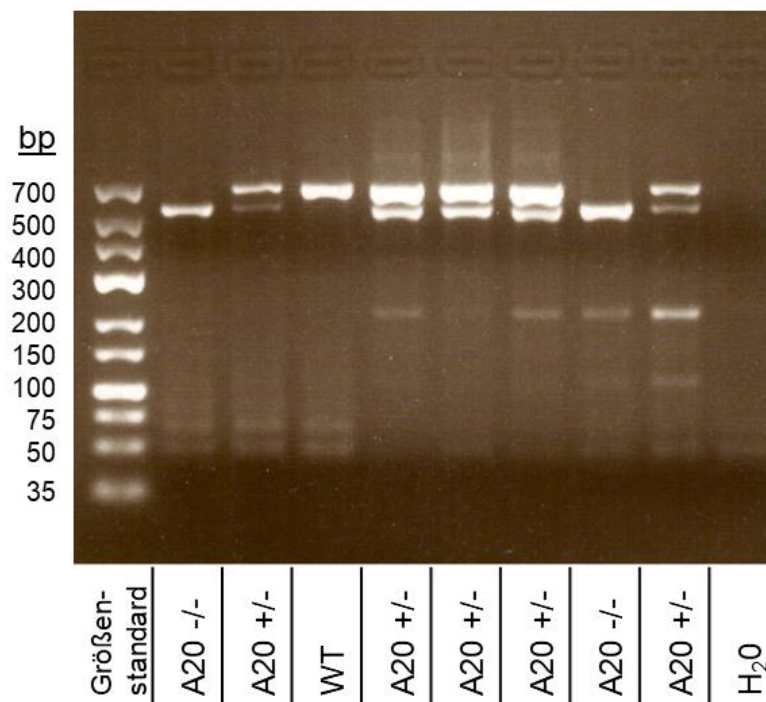


Abbildung 13: Genotypisierung der A20-Mäuse.

2.2.4 Tiernarkose

Alle Versuchstiere wurden am Versuchsende vor der Tötung narkotisiert. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurde der Zwischenzehreflex provoziert. Ein negativer Reflex wurde als adäquate Narkosetiefe interpretiert. Ein Narkosemix aus Fentanyl 0,05 mg/ml, Midazolam 5 mg/ml und Dormitor 1 mg/ml, zur i.p.-Injektion der Mäuse, wurde wie in Tabelle 5 dargestellt verwandt:

Narkosemixdosierung: Fentanyl 0,05 mg/kg KG

Midazolam 5 mg/kg KG

Dormitor 0,5 mg/kg KG

Gewicht (g)	Narkosemix (µl)
20	130
21	137
22	143
23	150
24	156
25	163
26	169
27	176
28	182
29	189
30	195

Tabelle 5: Dosierung der Injektionsnarkose nach Gewicht.

2.2.5 Induktion der Nephrotoxischen Serumnephritis

Die NTN-Induktion erfolgte in 8 Wochen alten heterozygoten (A20 +/-) und Wildtyp- (WT) Wurfgeschwistern aus eigener Zucht.

Heterologes Modell:

Im heterologen Modell wurde den Versuchstieren am Tag 0 (Versuchsbeginn) 100 µl des nephrotoxischen Serums, Sheep anti-Rat glomeruli serum; Probetex INC PTX-001S, intravenös in eine Schwanzvene injiziert. Spontan-Urinproben wurden am Tag 0, 2 und 5 entnommen. Am 5. Tag (Endpunkt des Experiments) erfolgten unter Narkose die Tötung der Tiere und die Nierenentnahme.

Autologes Modell:

Im autologen Modell wurden die Versuchstiere 3 Tage vor Versuchsbeginn mit Schafs-Antikörpern präimmunisiert. Hierfür wurde ein Gemisch aus Schaf-IgG und Adjuvans hergestellt und mittels Sonication emulgiert. Die Emulsion wurde subkutan in die Leiste beidseits gespritzt. Am Tag 0 (Versuchsbeginn) wurden 100 µl des NTS intravenös in eine Schwanzvene injiziert. Spontan-Urinproben wurden am Tag 0, 7 und 14 gewonnen. Am 14. Tag (Endpunkt des Experiments) erfolgte unter Narkose die Tötung der Tiere zur Nierenentnahme.

Am Versuchsende wurde in beiden Modellen folgendermaßen vorgegangen. Nach Einleitung der Tiernarkose und Prüfung auf einen negativen Zehenreflex wurde Blut bei dem tiefnarkotisierten Tier aus dem retroorbitalen Venenplexus mittels einer Glaskapillare entnommen. Das in einem Mikroreaktionsgefäß aufgefangene Blut wurde zur Gewinnung von Serum für eine halbe Stunde zum Ablaufen der Gerinnung stehen gelassen. Das geronnene Blut wurde bei 15.000 G für 5 Minuten zentrifugiert und der Serumüberstand bei -20°C gelagert. Anschließend erfolgte Entnahme der Nieren nach Perfusion mit 40 ml Phosphate-buffered Saline (PBS)-Lösung über die Punktion des linken Herzventrikels. Die blutleeren Nieren wurden nach Durchtrennung der Bauchwand frei präpariert, entnommen, von der Nierenkapsel getrennt und für die unterschiedlichen diagnostischen Verfahren (Durchflusszytometrie, Western Blot, Histologie, RNA-Analyse) aufgeteilt und vorbereitet.

2.3 In vitro-Methoden

2.3.1 Paramagnetische Glomeruli-Isolation

Hintergrund:

Die paramagnetische Glomeruli-Isolation wurde erstmals 2002 beschrieben [114]. Mit diesem Verfahren werden kompartmentspezifisch Glomeruli vom tubulointerstitiellem Gewebe getrennt. Dabei werden die Nieren mit ferromagnetische Mikropartikel (Beads) pefundiert [115]. Diese Beads bleiben aufgrund ihres 4,5 µm Durchmessers im Kapillarbett der Glomeruli hängen. Mit einem Magneten können dann nach Zerkleinerung und Andauung des Nierengewebes die noch intakten Glomeruli von den anderen Kompartimenten getrennt werden. Nach einigen Waschschritten kann ein glomerulärer Reinheitsgrad von 97,5 +/- 1,7% erreicht werden [114].

Durchführung der paramagnetischen Gewebe-Isolation:

Es wurden WT und A20 +/- Mäuse im C57BL/6J-Hintergrund unmittelbar nach dem Absetzen für die paramagnetische Glomeruli-Isolation verwendet. Die Tiere wurden euthanasiert und thorakotomiert. Dann wurde das Herz freipräpariert und die V.cava inferior durchtrennt, um die Perfusion mit Beads (M-450 Epoxy Dynabeads, Invitrogen, Karlsruhe) zu ermöglichen. Vorher wurden bereits die Beads nach Herstellerangaben geblockt und mit 40 ml auf 37°C vorgewärmtes PBS vermischt. Mittels einer speziellen Perfusionsvorrichtung wurden die Beads über den linken Herzventrikel in den Körperkreislauf der Maus unter konstantem Druck von 60 mmHg gespritzt [116].

Über die durchtrennte V. cava inferior konnte die überschüssige Perfusionslösung abfließen. Aufgrund ihrer Größe embolisieren die Beads in die Kapillarbetten der Maus, einschließlich der glomerulären Kapillaren. Im Anschluss an die Perfusion zeigten sich die inneren Organe entfärbt als Zeichen Blutleere. Nun erfolgte eine beidseitige Nephrektomie mit Entfernung der Nierenkapsel. Die Nieren wurden dann grob mit einem Skalpell zerkleinert und dann zur Andauung für 30 min bei 37°C mit 2 ml Kollagenase A (1 mg/ml in HBSS) inkubiert. Mit einem Spritzenpistill wurde das angedaute Gewebe durch ein Sieb mit 100 µm großen Maschen gepresst. 7 ml PBS wurden verwendet, um das Sieb auszuwaschen. Die Bedingungen des Kollagenaseverdau sind so gewählt, dass das tubulointerstitielle Gewebe in kleine Gewebefragmente (v.a. Tubuli) und Einzelzellen verdaut wird. Insbesondere werden embolisierte Beads in den peritubulären Kapillaren freigesetzt. Das Schlingenkonvolut der Glomeruli bleibt jedoch mit den in die Kapillaren embolisierten Beads intakt. Durch den Verdau wird allerdings die Bowman-Kapsel zerstört.

Die in 15 ml großen Falconröhrchen überführte Gewebesuspension wurde für 7 Minuten in eine Magnethalterung (Cell Separation Magnet, BD IMagTM, BD Biosciences, Heidelberg) gestellt (Abbildung 14). Die mit den paramagnetischen Beads embolisierten Glomeruli lagerten sich an die zum Magneten gewandte Seite des Falconröhrchens an. Nun wurde mit einer Pasteurpipette der Überstand mit den tubulointerstitiellen Zellen abpipettiert und in ein weiteres Falconröhrchen überführt. Der Überstand wurde durch ein Sieb mit 70 µm großen Maschen pipettiert und anschließend bei 4 °C für 3 Minuten bei 300 G zentrifugiert. Der nun vorliegende Überstand wurde verworfen und das Pellet mit dem tubulointerstitiellen Gewebe mit Puffer resuspendiert. Die Glomeruli im

ersten Falconröhrchen wurden mit 10 ml auf 4°C gekühltes PBS resuspendiert und erneut für 7 Minuten in die Magnethalterung gestellt. Dieses Mal wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Die nun weiter aufgereinigten Glomeruli wurden mit 4 ml auf 4°C gekühltes PBS resuspendiert und durch ein Sieb mit 100 μm großen Maschen gesiebt und in einem neuen Falconröhrchen aufgefangen. Die vorliegende Suspension wurde mit 6 ml auf 4°C gekühltes PBS aufgefüllt. Dieser Waschschrift wurde 3 weitere Male wiederholt. Im Anschluss wurde der Reinheitsgrad der Glomerulisuspension unter einem Mikroskop geprüft (Abbildung 15). Die Ausbeute lag in etwa bei 10000 bis 15000 Glomeruli pro Tier.

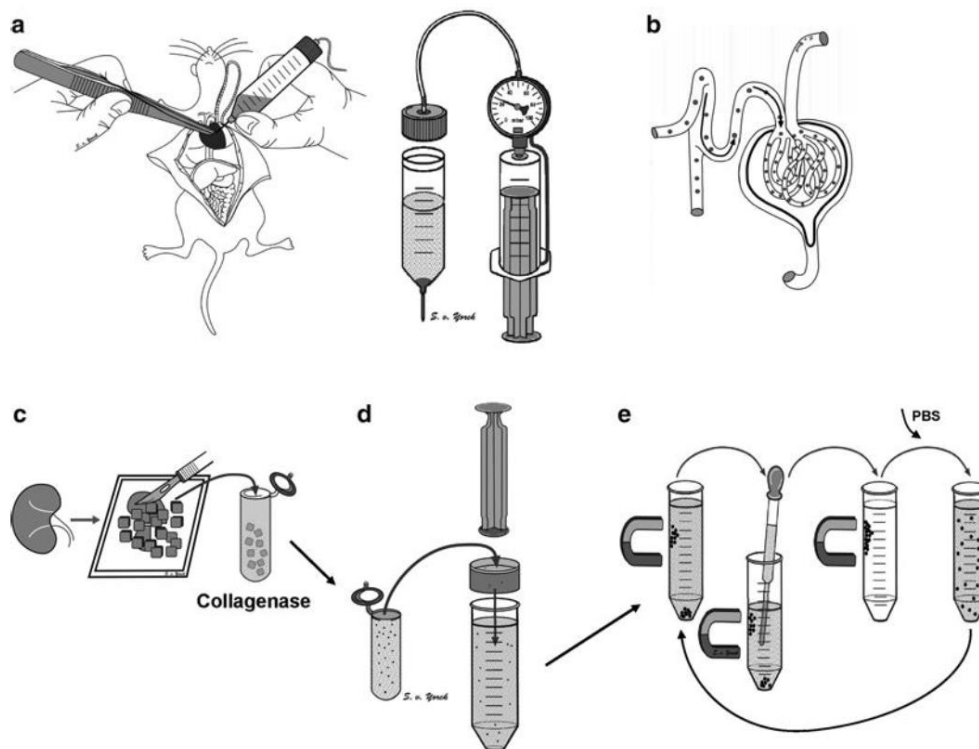


Abbildung 14: Ablauf der paramagnetischen Glomeruli-Isolation [116].

(a) Perfusion von Beads in den Körperkreislauf einer Maus über den linken Ventrikel mithilfe einer Perfusionsapparatur. (b) Embolisierte Beads in den Kapillaren des glomerulären Schlingenkonvoluts. (c) Nierenentnahme, Zerkleinerung und Kollagenaseverdau. (d) Filtration des angedauten Gewebes durch einen 100 μm Zellfilter. (e) Isolierung der Glomeruli mithilfe eines Magneten und anschließendes Waschen.

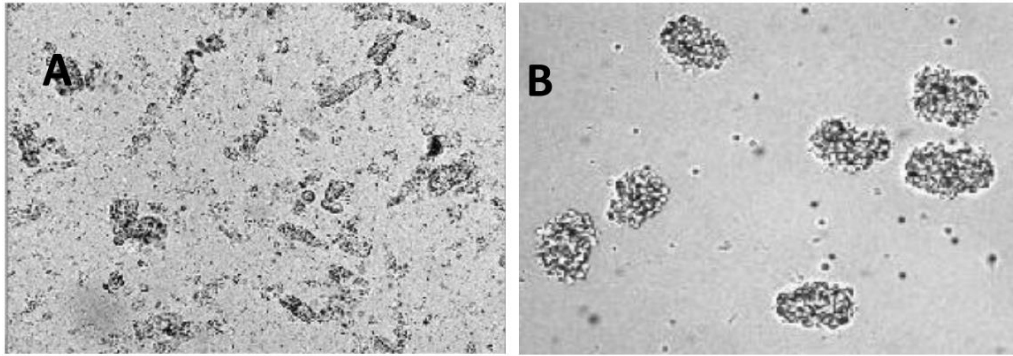


Abbildung 15: Paramagnetische Glomeruli-Isolation aus einer C57BL/6J-Maus [116].

(A) Tubulointerstitielles Gewebe. (B) Isolierte Glomeruli.

Isolierte Glomeruli und Tubulointerstitium in Zellkultur:

Isolierte Glomeruli und Tubulointerstitium wurden in Zellkulturmedium (RPMI 1640 Medium) resuspendiert. Hinzugegeben wurden 15% Fetal Bovine Serum (FBS), 15 mM HEPES-Puffer, 0,66 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin und 100 µl Streptomycin. Es wurden 10.000 Glomeruli in 2 ml Medium in ein Well einer 6-Well-Platte überführt. Isoliertes tubulointerstitielles Gewebe wurde ebenfalls mit 2 ml Medium in ein Well einer 6-Well-Platte gegeben. Die Proben wurden anschließend im Brutschrank für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Für die nachfolgende Stimulation wurde auf FBS-freies Medium gewechselt. Die Proben wurden für 24 Stunden mit 50 ng/ml TNF oder mit der gleichen Menge an PBS als Negativkontrolle stimuliert. Im Anschluss wurde der Well-Inhalt in 15 ml Falconröhrchen überführt und bei 300 G zentrifugiert. Der Überstand wurde dann direkt für ELISA-Messungen verwandt oder bei -80°C aufbewahrt. Die Normierung der Ergebnisse des tubulointerstitiellen Gewebes erfolgte durch Messung des Gesamtproteingehalts der jeweiligen Probe mit der Methode nach Bradford (siehe Kapitel 2.6.1).

2.3.2 Splenozytenisolation und T-Zell-Aktivierung

Durchführung der Splenozytenisolation:

Es wurden Milzen aus WT und A20 +/- Mäusen am Tag 14 der autologen NTN untersucht. Die entnommenen Milzen wurden einzeln durch ein Sieb mit 70 µm großen Maschen gedrückt. Zuvor wurde das Sieb mit MACS-Puffer angefeuchtet. Die durchgepresste Gewebesuspension wurde in einem 50 ml Falconröhrchen aufgefangen. Mit 15 ml PBS wurden die Siebe über das 50 ml Falconröhrchen gespült, sodass das PBS ebenfalls aufgefangen wurde. Anschließend wurde die Suspension mit 300 G bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Im Anschluss wurde das Pellet mit 5 ml auf 4°C gekühltem TAC-Puffer zur Erythrozyten-Lyse resuspendiert und für genau 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Lyse wurde mit 20 ml 4°C kalten MACS-Puffer gestoppt. Nun wurde die Suspension erneut durch ein Sieb mit 70 µm großen Maschen pipettiert. Im Anschluss erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt mit 300 G bei 4°C für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgegossen. Anschließend wurde das Pellet mit 10 ml DMEM resuspendiert und erneut mit 300 G bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet mit 500 µl DMEM (mit 5% FBS, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. In der Neubauer-Zählkammer wurde abschließend die Zellzahl bestimmt.

T-Zell-Aktivierung:

3×10^6 Splenozyten suspendiert in DMEM (mit 5% FBS, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin) wurden pro Well in eine 6-Well-Platte pipettiert. Die Zellen wurden anschließend mit 20 µg/ml Schaf-IgG für 72 Stunden inkubiert.

Die Negativkontrolle wurde mit dem gleichen Volumen PBS inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde der Überstand abgegossen und aufbewahrt. Die Zellen wurde mit 2 ml PBS resuspendiert und vorsichtig mit einem Zellschaber von dem Well-Boden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und nun mit 300 G bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 5 ml FACS-Puffer resuspendiert und erneut mit 300 G bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach erneuter Verwerfung des Überstandes wurde jedes Pellet mit 500 µl FACS-Puffer resuspendiert.

CD69-Färbung für die Durchflusszytometrie:

Zunächst wurde die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden zur Blockierung unspezifischer Bindungen 10 µl Ratten/Hamster-Serum hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde jeweils 1,4 µl der folgenden Antikörper hinzugegeben und für 45 Minuten bei 4 °C inkubiert: Anti-CD3e-FITC, Anti-CD4-APC, Anti-CD8-PE-Cy5 und Anti-CD69-PE. Im Anschluss wurden 2 ml FACS-Puffer zupipettiert. Die Suspension wurde dann mit 200 G bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde dieser Schritt wiederholt. Danach wurde das Pellet ein letztes Mal in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden anschließend bei 4°C im Dunkeln bis zur durchflusszytometrischen Analyse gelagert. Die Durchflusszytometrie erfolgte wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben.

2.3.3 Zellkultur und Zelltodinduktion muriner Mesangialzellen

Hintergrund:

Immortalisierte glomeruläre Mesangialzellen in Zellkultur wurden bereits in den 80iger Jahren zur Untersuchung nephrologischer Fragestellungen verwendet. Kultivierte Mesangialzellen weisen viele Ähnlichkeiten mit Mesangialzellen in vivo auf. Mesangialzellen spielen eine wichtige Rolle bei immunologischen und metabolischen Prozessen, welche den Glomerulus schädigen [117]. Somit sind kultivierte Mesangialzellen gut geeignet, um Mechanismen der glomerulären Inflammation und des Zelltods in vitro zu untersuchen.

Durchführung der Zellkultur:

Die in Flüssigstickstoff gelagerte murine Mesangialzelllinie (mMCs) wurden in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in eine Kulturschale mit 37°C warmen DMEM-Medium (mit 2,5% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin) überführt und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert [118]. 24 Stunden später wurde das Medium gewechselt. Um eine hohe Zellteilungsrate aufrechtzuerhalten wurden die mMCs regelmäßig gesplittet. Hierfür wurde zuerst das Medium abgesaugt. Dann wurden die Platten mit den konfluierenden Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS wieder abgesaugt. Als nächstes wurden 2 ml Trypsin-EDTA zupipettiert, um die angehefteten Zellen von der Kulturschale zu lösen. Danach folgte eine 5-minütige Inkubation im Brutschrank. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und die Reaktion mit 3 ml Medium gestoppt. Nun wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Anschließend wurde die Suspension bei 200 G für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml Medium resuspendiert. In einer neuen Kulturschale wurden anschließend

1 ml Zellsuspension mit 9 ml Medium vermischt und die Zellen erneut im Brutschrank inkubiert. Regulär erfolgten die nächsten Mediumwechsel alle 2-3 Tage.

Zelltodinduktion:

Die kultivierten Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die angehefteten Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA von der Platte gelöst. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und die Reaktion wurde mit 3 ml Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und bei 200 G für 3 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 3 ml RPMI-1640 Medium (ohne Phenolrot) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurden jeweils 10.000 mMCs in 100 µl RPMI-Medium (ohne Phenolrot) in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Vor der Zellstimulation mussten die kultivierten mMCs subkonfluent sein (mind. 80%). Bei ausreichender Zellkonfluenz wurden jeweils Proben-Triplets mit entweder dem Apoptose-Inhibitor Z-VAD-FMK (20 µM), Z-VAD-FMK (20 µM) zusammen mit dem Nekroptose-Inhibitor Necrostatin-1s (Nec-1s) (100 µM) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Negativkontrolle versetzt [98, 119]. 30 Minuten später wurde die entsprechende Menge TNF-α für eine Endkonzentration von 300 ng/ml zur Zelltodinduktion hinzugegeben und für 6 Stunden inkubiert. Anschließend konnte das Ausmaß zwischen apoptotischen und nekroptotischen Zelltods anhand der Zellviabilität im MTT-Assay (siehe Kapitel 2.6.3) quantifiziert werden.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Durchflusszytometrie

Hintergrund:

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, um Zellen in einer Zellsuspension zu zählen und zu charakterisieren. Zellen können anhand ihrer Größe, Granularität und Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen unterschieden werden. Im Durchflusszytometer ist ein Laser auf eine Glaskapillare gerichtet. Zellen in Suspension werden durch die Kapillare geleitet und passieren den Laser in Reihe. Mittels Detektoren können dann Zellcharakteristika anhand der entstehenden Streumuster des Laserlichtes erfasst werden. Das Vorwärtstreulicht (Forward Scatter, FSC) verändert sich mit der Größe der Zelle und das Seitwärtstreulicht (Sideward Scatter, SSC) mit der Granularität der Zelle. Zusätzlich können individuelle Zellpopulation unterschieden werden. Spezifische Antikörper werden verwendet, um Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Bestandteile zu markieren. Diese primären Antikörper sind entweder Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelt oder können durch farbstoffmarkierte Sekundärantikörper gebunden werden. Das jeweilige Fluoreszenzsignal wird mittels Laser angeregt und das emittierte Licht kann von entsprechenden Detektoren gemessen werden. Unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe emittieren Licht unterschiedlicher Wellenlängen, das spezifisch detektiert werden kann. Folglich lässt sich, abhängig von der Anzahl an Lasern des Durchflusszytometers, je Zelle eine Vielzahl an Oberflächenmolekülen detektieren. Dies ermöglicht eine genauere Differenzierung zwischen

Zellpopulationen. Anschließend werden die gewonnen Daten mittels einer Auswertungssoftware analysiert.

Herstellung renaler Einzelzellsuspension zur durchflusszytometrischen Analyse:

Alle beschriebenen Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Einzelzellsuspensionen der Versuchstiere wurden wie folgt hergestellt. PBS-perfundierte Versuchstiere wurden in Petrischalen mit 3 ml eisgekühltem Paris-Puffer gelegt und mit einem Skalpell zerkleinert. Das Gewebe wurde anschließend in ein Falconröhrchen überführt und mit 7 ml Paris-Puffer aufgefüllt. Es folgten 2 Waschschrte mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltigen HBSS-Puffer und Zentrifugieren bei 250 G. Anschließend wurde das Gewebe in 5 ml vorgewärmter Kollagenase Typ A/DNAse Typ IV-Lösung für 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das verdaute Gewebe wurde mit 250 G zentrifugiert, erneut in HBSS-Puffer gewaschen und anschließend in 5 ml 2mM EDTA/ Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien HBSS-Lösung für 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um die Kollagenase- und DNAse-Aktivität zu beenden. Die nun vorliegende Zellsuspension wurde bei 30 G zentrifugiert und der Überstand in ein eisgekühltes Falconröhrchen überführt. Das Pellet wurde erneut mit 5 ml Kollagenase Typ A-Lösung (ohne DNAse) für 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das erneut verdaute Gewebe zur weiteren mechanischen Zerkleinerung mittels 10 ml Spritze durch zuerst 20-Gauche und dann 26-Gauche Kanülen gepresst. Diese zellreiche Suspension wurde mit dem im vorangegangenen Schritt aservierten Überstand vereinigt. Schließlich wurde zur Entfernung von verbliebenen größeren

Geweberesten die Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb gedrückt und in FACS-Puffer resuspendiert.

Vorbereitung der Antikörperfärbungen:

Je 100 µl der renalen Einzelzellsuspension wurde in die gewünschte Anzahl an FACS-Röhrchen überführt. Zuerst erfolgte das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mittels der Zugabe von 10 µl gemischtem Maus- und Rattenserum und Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 1,4 µl der jeweiligen fluoreszenzmarkierten Antikörper hinzugegeben und für 60 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Es wurde nach folgenden Ansätzen zur Detektion von T-Zellen und Makrophagen/DCs gefärbt:

Antikörper	CD45-PE	CD3e-FITC	CD4-APC	CD8-PE-Cy5
bindet an	Leukozyten	T-Zellen	T-Helferzellen	Zytotoxische T-Zellen

Tabelle 6: Antikörperansatz zur T-Zell-Detektion.

Antikörper	CD45-PE	F4/80-APC	CD11c-FITC
bindet an	Leukozyten	Makrophagen	DCs

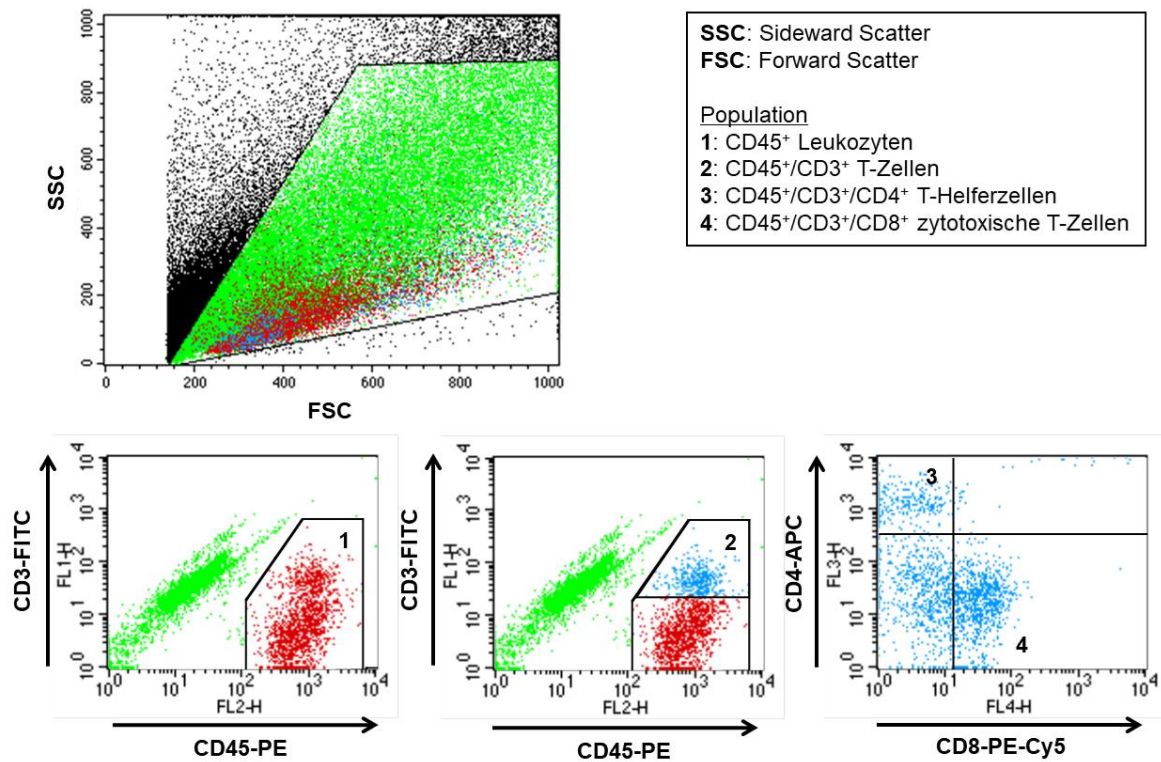
Tabelle 7: Antikörperansatz zur Detektion von Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs).

Zudem wurden Ansätze mit unspezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern als Isotypkontrollen angefertigt. Anschließend wurden alle Ansätze gewaschen.

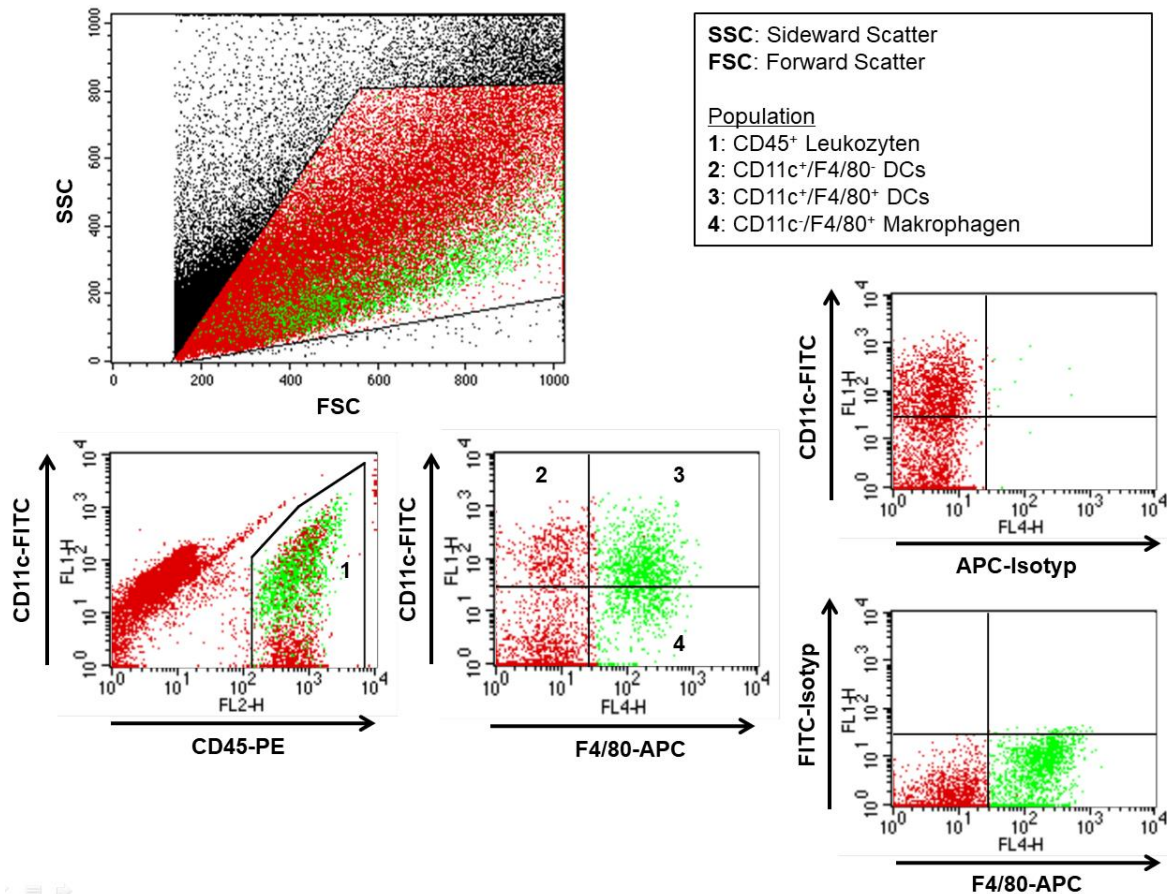
Messung der renalen Leukozyteninfiltration:

Infiltrierende renale T-Zellen, Makrophagen und DCs wurden mittels 4-Farben-Durchflusszytometrie quantifiziert. Im Durchflusszytometer FACSCalibur wurden pro Ansatz 100.000 Detektionseignisse aufgezeichnet. Die Summe der Ereignisse entspricht der Anzahl an einzelnen intakten Zellen in der renalen Zellsuspension, jedoch ist anzunehmen, dass in seltenen Fällen kleine Zellhaufen oder Zelldetritus vom Detektor als Ereignis registriert werden. Initial wurden die einzelnen Zellen auf ihre Seitenstreuung durch einfallendes Licht untersucht. Dabei weisen stärker granulいたete Zellen, beispielsweise Leukozyten einen höheren Grad an Seitenstreuung auf, sodass bereits hier eine grobe Unterteilung der Zellen erfolgen konnte. Eine Verbesserung der Auflösung des Durchflusszytometrie-Experiments ermöglicht die Fluoreszenzmarkierung, da Zellen anhand ihrer Antigen-Expressionen unterschieden werden können. Die renale Einzelzellsuspension wurde anhand der Antikörperansätze wie in Tabelle 6 und Tabelle 7 gefärbt und das Gating der Ereignisse erfolgte wie in Abbildung 16 dargestellt. Hiermit konnten $CD3^+/CD4^+$ T-Helferzellen von $CD3^+/CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen und $CD11c^+/F4/80^-$ DCs von $CD11c^-/F4/80^+$ Makrophagen unterschieden werden. Die gesammelten Daten wurden dann mit der Software CellQuest analysiert. Die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen wurden in dieser Arbeit als Prozent aller renalen Zellen quantifiziert.

A Gatingstrategie zur Analyse renaler CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen



B Gatingstrategie zur Analyse renaler CD11c⁺ DCs und F4/80⁺ Makrophagen



Abbildungsbeschriftung siehe nächste Seite.

Abbildung 16: Gatingstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung renaler Leukozytenpopulationen.

(A) Gatingstrategie zur renalen T-Zell-Analyse. Oben links Darstellung aller durchflusszytometrischen Ereignisse einer renalen Gewebeprobe und Gating ausgewählter Ereignisse zur Minimierung unspezifischer Signale mit Hilfe des Forward- (FSC)- und Sideward Scatters (SSC). Unten links Gating der $CD45^+$ Leukozyten (Population 1, rot), unten Mitte Gating der $CD45^+/CD3^+$ T-Zellen (Population 2, blau), unten rechts Gating der $CD4^+$ T-Helferzellen (Population 3, blau) und der $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen (Population 4, blau). (B) Gatingstrategie zur renalen DC- und Makrophagen-Analyse. Oben links Darstellung aller durchflusszytometrischen Ereignisse einer renalen Gewebeprobe und Gating ausgewählter Ereignisse zur Minimierung unspezifischer Signale mit Hilfe des FSC und SSC. Unten links $CD45^+$ Leukozyten (Population 1, rot und grün), unten Mitte Aufteilung der renalen monozytären Phagozyten in $CD11c^+/F4/80^-$ DCs (Population 2, rot), $CD11c^+/F4/80^+$ DCs (Population 3, grün) und der $CD11c^-/F4/80^+$ Makrophagen (Population 4, grün), rechts Isotypkontrollen für APC und FITC.

2.4.2 ELISA

Hintergrund:

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Immunoassay basierend auf ein Immunadsorptionsverfahren mit enzymatischer Farbreaktion. Das ELISA ermöglicht es, mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen Proteine quantitativ nachzuweisen. Ein primärer Antikörper mit starker Affinität für das gesuchte Antigen ist entweder direkt an ein Enzym gekoppelt oder ein sekundärer Antikörper, spezifisch für den primären Antikörper, ist enzym-gekoppelt. Das Enzym wiederum katalysiert die Farbreaktion eines Substrates. Somit ist die Intensität der Farbreaktion proportional zur Menge an Antigen-Antikörper-Reaktionen und damit zum nachzuweisenden Antigen. In

dieser Arbeit wurde nur die Variante des direkten Sandwich-ELISA verwendet. Hier wird initial ein Antigen-affiner Bindungs-Antikörper eingesetzt, um das gesuchte lösliche Antigen an eine 96-well Platte zu fixieren. Die genauen Versuchsprotokolle kann den Herstellerangaben entnommen werden.

CCL2-, CCL5-, IP-10- und KIM-1-ELISA:

Im Zellkulturüberstand von TNF α -stimulierten Glomeruli und tubulointerstitiellem Gewebe wurden die Chemokine CCL2, CCL5 und IP-10 untersucht. Ergebnisse wurden entweder in pg/ml pro 10.000 Glomeruli oder in pg/mg Gesamtprotein angegeben. Der tubuläre Schadensmarker KIM-1 wurde in Spontan-Urinproben von Mäusen nach autologer NTN-Induktion untersucht. Ergebnisse wurden in pg/ μ g Kreatinin angegeben. Die Kreatininmessung erfolgte mittels Jaffé-Methode.

Albumin ELISA:

Den Versuchstieren wurden Spontan-Urinproben entnommen. Zur Bestimmung der Albuminkonzentration wurde der kommerziell erhältliche Mouse Albumin ELISA Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) verwandt, jedoch unter Verwendung eines abgewandelten Versuchsprotokolls mit Verdünnung der Urinproben um den Faktor 10^4 bis 10^7 . Die Verdünnungen wurden im Dreifachansatz auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Als Ergebnis wurde der Durchschnitt aller Verdünnungen herangezogen. Die Albuminkonzentration wurde als Ratio der Kreatininkonzentration in mg/mg angegeben.

2.4.3 Western Blot

Hintergrund:

Der Western Blot ist eine semiquantitative Methode zum Nachweis von Proteinen, wobei man unter Blot bzw. Blotting die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran versteht. Vor dem eigentlichen Western Blot werden die Proben mit gleicher Gesamtproteinmenge auf ein Gel (z.B. Polyacrylamid-Gel) aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgt der Proteintransfer auf die Trägermembran, entweder mittels semi-dry- oder wet-Transfer Verfahren. In dieser Arbeit wurde nur der semi-dry-Transfer verwandt. Nachdem das Protein auf die Membran übertragen wurde erfolgt die Immundetektion einzelner Proteine. Hierbei wird die Membran mit primären Antikörpern, spezifisch für das gesuchte Protein, inkubiert. Anschließend werden enzymgekoppelte sekundäre Antikörper, spezifisch für die Fc-Region des primären Antikörpers, auf die Membran gegeben. Unter lichtgeschützten Bedingungen kann das antikörpergekoppelte Enzym verwendet werden, um eine Chemolumineszenzreaktion (ECL) zu katalysieren. Diese Lichtreaktion kann detektiert werden, z.B. mittels Röntgenfilm.

Proteinisolation:

Nierengewebe wurde direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Gewebestück bei 4°C in Lysepuffer (RIPA-Puffer) mit Protease-Inhibitor (1:25) und Phosphatase-Inhibitor (1:100) in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß gelegt und mit einem Homogenisator zerkleinert. Danach erfolgt eine Ultraschallbehandlung (Sonicaten) zur Zelllyse, um

zytosolischen Proteine freizulegen. Zur weiteren Zellyse wurde das Lysat für ca. 2 Stunden bei 4°C auf einem Rotator langsam rotiert. Anschließend wurden die Proben bei 15.000 G und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und der zurückgebliebene Zelldetritus verworfen.

Vorbereitung der Proben:

Lysate wurden anhand des Bradford-Testes (siehe Kapitel 2.6.1) in ihrer Gesamtproteinkonzentration angeglichen (i.d.R. 3 mg/ml). Anschließend wurden die Proben mit Ladepuffer nach Lämmli versetzt. Mittels 5-minütigem Erhitzen bei 95°C und β -Mercaptoethanol-Zusatz (im Ladepuffer) wurden die Proteine denaturiert.

Elektrophorese und Blotting:

Zur Elektrophorese wurde ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) verwandt. Dieses wurde in Abhängigkeit der Größe des gesuchten Proteins (Tabelle 8) in unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen hergestellt und in Gelkassetten gegossen. Nachdem die Gele gehärtet waren wurden die Taschen mit 20 μ l der vorbereiteten Proben gefüllt, entsprechend 60 μ g Protein. Die Elektrophorese erfolgt bei 100-150 V für ca. 2 Stunden. Die Dauer war abhängig von der verwendeten Acrylamidkonzentration und Laufzeit des gesuchten Proteins. Mittels semi-dry-Transfer wurden die aufgetrennten Proteine bei 15 V für 1 Stunde vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran

(PVDF) übertragen. Anschließend wurde die Membran in Tris-buffered Saline mit 0,1% Tween-20 (TBS-T) gelagert.

	Gel	H₂O	Acrylamid	Trennpuffer	10 % SDS	APS	TEMED
<<<< Proteingröße <<<<	8 %	3,76 ml	2,16 ml	2 ml	80 µl	40 µl	4 µl
	9 %	3,52 ml	2,4 ml	2 ml	80 µl	40 µl	4 µl
	10 %	3,28 ml	2,64 ml	2 ml	80 µl	40 µl	4 µl
	11 %	2,96 ml	2,96 ml	2 ml	80 µl	40 µl	4 µl
	12 %	2,72 ml	3,2 ml	2 ml	80 µl	40 µl	4 µl
	13 %	2,48 ml	3,44 ml	2 ml	80 µl	40 µl	4 µl
	14 %	2,16 ml	3,76 ml	2 ml	80 µl	40 µl	4 µl
	15 %	1,92 ml	4,0 ml	2 ml	80 µl	40 µl	4 µl

Tabelle 8: Gelvorbereitung.

Immundetektion der Proteine:

Initial wurden die Proteine auf der Membran mittels 5% Magermilchlösung in TBS-T blockiert. Hierbei wurden unspezifische Bindungsstellen durch die Milchproteine abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper, entweder gegen RIP1 (1:1000), RIP3 (1:1000), Cleaved Caspase-3 (1:300) oder β -Actin (1:1000) gerichtet, in 5% Magermilchlösung in TBS-T gelöst und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit TBS-T für je 10 Minuten wurde die Membran mit dem sekundären, gegen Kaninchen-Antikörper (RIP1) oder Maus-Antikörper (RIP3, Cleaved Caspase-3, β -Actin) gerichteten, Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Antikörper (1:10.000), in 5% Magermilchlösung in TBS-T gelöst und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach 3 erneuten Waschschritten mit TBS-T für je 10 Minuten wurde die Membran

lichtgeschützt in einer Dunkelkammer entwickelt. Hierfür wurde die Membran für 1 Minute in dem Detektionsreagenz ECL Prime inkubiert. Anschließend konnte die Chemoluminiszenzreaktion, katalysiert durch die HRP, mit einem Röntgenfilm aufgenommen werden. Um mehrere Proteine auf einer Membran zu untersuchen, wurden die gebundenen Antikörper mittels Stripping-Puffer (Restore Plus Stripping Buffer, Thermo Scientific), nach dem Entwicklungsschritt entfernt und anschließend mit einem weiteren primären Antikörper inkubiert [120]. Zur Kontrolle der Lademenge wurde jeder Blot auf ein gleichmäßiges β -Actin-Signal geprüft. Mit dem Programm ImageJ wurden die Intensitäten der Banden auf dem Röntgenfilm gemessen und in Relation zur β -Actin-Intensität gesetzt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Real-Time PCR

Hintergrund:

Die Real-Time PCR (RT-PCR) ermöglicht nicht nur die Detektion einer bestimmten DNA-Sequenz, wie bei der herkömmlichen PCR, sondern gibt auch Aufschluss über die Menge der DNA in Echtzeit an [113]. Mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes, der nicht-spezifisch mit doppelsträngiger DNA interkaliert, kann das entstehende PCR-Produkt detektiert und quantifiziert werden [113]. In unserem Labor wurde der Farbstoff SYBR Green I verwendet. Der Farbstoff lagert sich nur in Doppelstrang-DNA ein, womit die Fluoreszenz-

intensität proportional zur Menge der vervielfachten DNA und der PCR-Zyklen ist. Die Anzahl an durchlaufenen Zyklen, bis die Fluoreszenzintensität signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, entspricht dem Cycle Threshold (CT-Wert). Somit steigt der CT-Wert antiproportional zur Ausgangsmenge des markierten DNA-Abschnittes. Als Kontrolle dient ein Houskeeping-Gen, welches in allen Proben im gleichen Maß exprimiert wird. Das Bilden der Ratio aus Anzahl an Probenzyklen und Anzahl an Houskeeping-Gen-Zyklen ermöglicht es, das Expressionsniveau der einzelnen Proben untereinander zu vergleichen. Zur Qualitätskontrolle jeder RT-PCR-Amplifikation erfolgt abschließend eine Schmelzkurvenanalyse. Hierbei werden die PCR-Ansätze von 65°C auf 95°C erhitzt. Spezifische Amplifikate (doppelsträngige DNA) weisen im Vergleich zu unspezifischen PCR-Produkten (Primer-Dimere) eine höhere Schmelztemperatur auf. Unter dieser Temperatur denaturieren DNA-Doppelstränge zu zwei Einzelsträngen, was zur Freisetzung der interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe und zu einem abrupten Absinken der Fluoreszenzintensität führt. Aufgrund charakteristischer Schmelzkurven der unterschiedlichen PCR-Produkte kann die Spezifität der abgelaufenen PCR-Reaktion untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die RT-PCR verwendet, um nach reverser Transkription die Expressionshöhe verschiedener mRNA-Transkripte im Nierengewebe zu bestimmen.

RNA-Isolation:

Zur renalen RNA-Isolation wurde das PureLink RNA Mini Kit (Ambion) verwandt. Das in RNA-Later aufbewahrte Nierengewebe wurde mit 350 µl RNA-Lyse-Puffer mit 1% β -Mercaptoethanol versetzt und im Homogenisator

zerkleinert. An einem RNase freien Arbeitsplatz wurden die Proben mit 350 µl 70%igem nicht vergälltem Ethanol vermischt und auf eine Filtriersäule pipettiert. Mittels Zentrifugation der Filtriersäule für 15 Sekunden bei 12.000 G wurde die gebundene RNA vom restlichen Gemisch getrennt. Das Ethanol wird dann mit 700 µl Waschpuffer 1 aus der Filtriersäule gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 12.000 G wurde das Filtrat abgegossen. Als nächstes wurden die Filtriersäulen mit 500 µl Waschpuffer 2 gewaschen und wieder zentrifugiert. Schließlich erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt zum Trocknen der Filtermembran bei 12.000 G für zwei Minuten. Dabei wurde die Filtersäule auf RNase-freie Auffangbehälter gesetzt. Die RNA wurde dann mit 30 µl RNase-freiem Wasser 1 Minute lang inkubiert und somit aus der Filtriersäulen gelöst. Abschließend wurde die RNA nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 12.000 G für 2 Minuten am Boden des Auffanggefäßes gesammelt. Die nun gelöste RNA konnte entweder bei -20°C gelagert oder zu cDNA umgeschrieben werden.

Bestimmung der RNA-Konzentration und –Qualität:

Es erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA mithilfe eines Photometers (NanoDrop). 2 µl isolierte RNA-Probe wurde auf den Probenabnehmer des Photometers aufgetragen, um das Verhältnis der optischen Dichte bei $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm zu messen. Bei einer Ratio (260 nm/280 nm) kleiner 1,8 oder größer 2,2 konnte von einer kontaminierten und unbrauchbaren Probe ausgegangen werden. Nur qualitativ hochwertige RNA-Isolate wurden für weitere Analysen verwendet. Da die optische Dichte für RNA mit einer Konzentration von 40 ng/µl bei einer Wellenlänge von 260 nm bei

1,0 liegt, konnte die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe anhand des Photometer-Messwertes berechnet werden.

Reverse Transkription der mRNA zu cDNA:

Das Umschreiben der mRNA zu cDNA wird mittels Reverse Transkriptase durchgeführt. Die mRNA-Proben wurden initial für 5 Minuten bei 65°C erhitzt, um ungewollte Molekülbindungen zu lösen. Anschließend erfolgte die Lagerung auf Eis. Anschließend wurden die Proben mit RNase-freiem Wasser gemischt, so dass in 13,2 µl Volumen 1 µg mRNA enthalten war. Nun wurden die Proben mit einem Master-Mix, welcher Reverse Transkriptase beinhaltet, versetzt (Tabelle 9). Als Negativkontrolle diente der gleiche Ansatz, nur anstatt Reverser Transkriptase wurde RNase-freies Wasser hinzugemischt. Die cDNA-Synthese wurde durch Erhitzen von 20 µl der jeweiligen Lösung auf 42°C für 90 Minuten gestartet. Gestoppt wurde die Reaktion indem das Gemisch für 5 Minuten auf 90°C erhitzt wurde, was die Reverse Transkriptase denaturiert.

Bestandteile	Menge in µl
5x-Puffer	4
dNTP-Mischung	0,4
DTT	1
40 U/µl RNasin	0,5
Hexanukleotide	0,215
15 µg/ml Acrylamid	0,25
Reverse Transkriptase oder RNase-freies H ₂ O	0,43

Tabelle 9: Master-Mix für die mRNA/cDNA-Umschreibung.

Durchführung der Real-Time PCR:

Die nun vorliegenden cDNA Ansätze für jede Probe (RT+) und die Negativkontrolle ohne Reverser Transkriptase (RT-) wurden mit RNase freiem Wasser 1:10 verdünnt. Dann wurden jeweils 2,2 µl eines Ansatzes RT+ und RT- mit 10 µl RT-PCR-Mastermix (Tabelle 10), 0,6 µl des rechten und 0,6 µl des linken Primers, 0,16 µl Taq-Polymerase und 6,64 µl RNase-freies Wasser versetzt.

Bestandteile	Menge in ml
Tag Puffer 10x ohne Detergens	2
dNTP 25 mM	0,15
PCR optimizer	4
Bovines Serumalbumin, 20 mg/ml	0,2
SYBR Green I	0,04
MgCl ₂ 25 mM	2,4
H ₂ O	1,210

Tabelle 10: Mastermix für RT-PCR (10 ml Gesamtvolumen).

Jeder RT+ und jeder RT- Probenansatz wurde im Doppelansatz auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde dann mit einer Folie überklebt und abgedichtet. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugieren der Platten. Danach konnte die RT-PCR im LightCycler mit den in Tabelle 11 aufgeführten Bedingungen gestartet werden.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden mittels der LightCycler 480 Software von Roche, Version 1.2.9.11, ausgewertet. 18s rRNA wurde als Housekeeping-Gen verwandt.

PCR-Phase	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95	5 min	
Denaturierung	95	15 s	1
Primerhybridisierung	60	45 s	40x
Elongation	72	30 s	1
Schmelzkurve	95	5 s	
	Steigerung von 65 auf 95	10 min	

Tabelle 11: RT-PCR-Ablauf.

2.6 Kolorimetrische Methoden

2.6.1 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Die Gesamtproteinbestimmung nach Bradford (Bradford-Test) ist eine kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen [121]. Standardreihe (1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml) und Proben (1:10) wurden auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde 200 µl Bradford-Reagenz pro Well hinzugegeben. Nach 5 min Inkubation erfolgte die Extinktionsmessung bei 590 nm im ELISA-Reader (siehe Kapitel 2.4.2). Anhand der Standardkurve wurden die Proteinmengen in mg/ml berechnet.

2.6.2 Kreatinin-Bestimmung mittels Jaffé Methode

Die Kreatininkonzentration in Spontan-Urinproben der Versuchstiere wurde mittels des Creatinine FS Kits (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim) nach der Jaffé-Methode untersucht. Hier wurde ein modifiziertes Versuchsprotokoll im Vergleich zu den Herstellerangaben verwandt. Kreatinin bildet mit Pikrinsäure in alkalischer Lösung orange-rote Kreatinin-Pinkrat-Komplexe. Während dieser Reaktion ist die Absorptionsdifferenz zwischen unterschiedlichen Zeitpunkten proportional zur Kreatininkonzentration in der Probe [122]. Auf eine 96-Well-Platte wurde zunächst eine Standardreihe für die Kreatininkonzentration (0, 1, 2, 4, 8 mg/dl) aufgetragen. Anschließend wurden die Urinproben 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt, mit Natronlauge alkalisiert und mit Pikrinsäure (4 mmol/l) versetzt. Zur Bestimmung der Absorptionsdifferenz wurde die Extinktion (492 nm) nach 1 und 3 Minuten im ELISA-Reader gemessen. Anhand der Standardkurve konnte die Kreatininkonzentration (mg/dl) für alle Proben bestimmt werden.

2.6.3 LDH-Assay

Das Laktatdehydrogenase- (LDH-) Assay ist eine kalorimetrische Methode zur Quantifizierung von Zelltod und Zelllyse durch die Messung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand, freigesetzt durch geschädigte Zellen [123]. Dabei wird die LDH-Aktivität im zellfreien Zellkulturüberstand mittels eines enzymatischen Tests detektiert, bei dem die LDH-katalysierte Reaktion von Laktat zu Pyruvat zur Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ führt. Der Katalysator Diaphorase transferiert dann das H/H^+ vom NADH/H^+ zum Tetrazoliumsalz INT, woraufhin

dieses zu Formazan reduziert wird. Somit korreliert die Menge an gebildetem Formazan direkt mit der LDH-Enzymaktivität [123]. Jeweils 100 µl Zellkulturüberstand von TNF-stimulierten und nicht stimulierten Glomeruli und tubulointerstitiellem Gewebe wurden mit 100 µl der LDH-Assay-Reaktionsmischung in eine 96-Well-Platte versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm und nach Subtraktion des Hintergrundes von 620 nm gemessen. Die relative LDH-Aktivität wurde durch Bildung einer Ratio mit dem Gesamtprotein der jeweiligen Probe normiert.

2.6.4 MTT-Assay

Das MTT-Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der metabolischen Zellaktivität, welche unter bestimmten Bedingungen mit der Zellviabilität korreliert [124, 125]. Dabei wird das Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch lebende Zellen in das blaue Formazan NADPH-abhängig metabolisiert [126]. In einer 96-Well-Platte kultivierte mMCs, jeweils 10.000 Zellen pro Well, wurden nach Zelltodinduktion mit 10 µl der MTT-Working Solution (Endkonzentration von 0,5 mg/ml) pro Well versetzt. Die Zellen wurden dann für 4 Stunden bei 37°C mit der MTT-Lösung inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde der kristalline Farbstoff Formazan mit 100 µl angesäuertem Isopropanol (0,04 M HCl in Isopropanol) löslich gemacht [125]. Schließlich wurde die Extinktion des umgeschlagenen Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 570 nm und nach Subtraktion des Hintergrundes von 650 nm gemessen.

2.7 Histologische Methoden

Die morphometrische Auswertung aller histologischen Methoden, einschließlich der Histopathologie, Immunhistologie und Immunfluoreszenz, erfolgte geblindet.

2.7.1 Histopathologie in der Lichtmikroskopie

Vorbereitung der Schnitte:

Für jedes Versuchstier wurden aus der Mitte beider Nieren 2-3 mm große Nierengewebsstücke geschnitten, in Histologiekassetten gelegt und für 24 Stunden bei 4°C in 10%iger Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet. Die Objektträger wurden 2-malig mit Aceton für 5 Minuten entfettet und mit in Aceton gelöstem Ammoniumpersulfat (APES) für ebenfalls 5 Minuten vorbehandelt. Dann wurden die Objektträger mit entmineralisiertem Wasser gespült und bei Raumtemperatur getrocknet. Das in Paraffin eingebettete Nierengewebe wurde anschließend mithilfe eines Mikrotoms in 2 µm dicke Schnitte geschnitten. Diese wurden in einem 40°C warmen Wasserbad aufgefangen und anschließend auf die vorbehandelten Objektträger aufgetragen. Diese wurden anschließend in einem Trockenschrank bei 60°C über Nacht getrocknet. Nachfolgend wurde das Paraffin entfernt. Hierfür wurden die Schnitte 3-malig für 5 Minuten mit Xylol behandelt. Dann wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und anschließend mit PBS gewaschen.

Die PAS-Färbung:

Die Perjodsäure Schiff (PAS)-Färbung ermöglicht mithilfe der PAS-Reaktion Glykogen, Glykoproteine oder anderer Kohlenhydrate anzufärben. Dabei werden Hydroxylgruppen zu Aldehyden oxidiert [127]. Die Schnitte wurden für 5 Minuten in 2%ige Perjodsäure-Lösung inkubiert. Dann erfolgte ein Waschschrift mit destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Schnitte für 20 Minuten in Schiff-Reagenz inkubiert. Mit Mayer's Hämatoxylin wurde für 2 Minuten die Zellkerne gegengefärbt und mit fließendem Leitungswasser gewaschen. Schließlich wurden die gefärbten Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eindeckmedium (Pertex) eingebettet.

Glomerulosklerose in der PAS-Färbung:

Die glomeruläre Schädigung wurde anhand der Ausdehnung der Glomerulosklerose im Nierengewebe quantifiziert. Glomerulosklerose wurde in der PAS-Färbung nach El Nahas ausgewertet (Tabelle 12) [128]. Pro Versuchstier wurden 50 Glomeruli semiquantitativ ausgewertet.

Grad	Beschreibung
0	Keine Läsion
1	Mesangiale Zellproliferation oder Verdickung der GBM
2	≤ 50% Sklerose innerhalb des glomerulären Gefäßkonvoluts
3	> 50 % Sklerose innerhalb des glomerulären Gefäßkonvoluts
4	Diffuse Glomerulosklerose mit Zellnekrose und Zellkollaps

Tabelle 12: Glomerulosklerose-Score nach El Nahas [128].

Tubulointerstitieller Schaden in der PAS-Färbung:

Die Schädigung des Tubulointerstitiums wurde in der PAS-Färbung mithilfe eines semiquantitativen Scores bestimmt. Dabei wurde eine Punktzahl von 0 bis 3 für die Ausprägung von 4 unterschiedlichen morphologischen Kriterien vergeben. Diese waren tubuläre Dilatation, tubuläre Atrophie, tubuläre Denudation und intraluminale Zylinder. Somit konnte für jedes Tier eine Punktzahl von 0 bis 12 generiert werden, wobei 0 physiologischen Tubuli und 12 dem größten tubulären Schaden entsprach.

2.7.2 Immunhistochemische Färbungen

Hintergrund:

In der Immunhistochemie werden Farbstoff-gekoppelte Antikörper zur Anfärbung von Zellstrukturen verwendet. Das Prinzip beruht auf Antigen-Antikörper-Reaktionen. Dabei sind die Antikörper affin und spezifisch für ein Gewebeantigen. Wenn der gekoppelte Farbstoff fluoreszierende Eigenschaften hat, spricht man von einer Immunfluoreszenzfärbung. Unterschieden wird zwischen einer direkten und einer indirekten Methode, wobei bei der direkten der Farbstoff direkt an den primären Antikörper gebunden ist. Bei der indirekten Methode ist der Farbstoff an einen sekundären Antikörper gebunden, der an die Fc-Region des farbstofffreien primären Antikörpers bindet. In dieser Arbeit wurde alle immunhistochemischen Färbungen mithilfe der Labelled-(Strept-)Avidin-Biotin (LSAB)-Methode angefertigt. Die LSAB-Methode gehört zu den indirekten Verfahren. Dabei bindet ein mit Biotin gekoppelter

Sekundärantikörper an die Fc-Region des Primärantikörpers. Peroxidase-konjugiertes Avidin bildet aufgrund seiner hohen Affinität Komplexe mit Biotin. Die Zugabe eines Farbsubstrats für die Peroxidase ermöglicht dann eine Farbreaktion an der Zielstruktur. Zur Vermeidung von Hintergrundsignalen durch endogenes Avidin und Biotin werden die Gewebeschnitte mit einer speziellen Blockierlösung vorbehandelt. Zudem werden endogene Peroxidasen mit Wasserstoffperoxid blockiert. Letztlich werden andere unspezifische Bindungen mit Magermilchlösungen blockiert.

Durchführung der Blockierung und Antigendemaskierung:

Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Gewebeschnitte mit 3%iger Wasserstoffperoxidlösung (30%ige H_2O_2 -Lösung 1:10 in Methanol gelöst) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. 2 Verfahren für die Antigendemaskierung wurden angewendet. Entweder wurden die Gewebeschnitte nach Behandlung mit einer kommerziellen Antigen-Unmasking-Solution autoklaviert oder die Schnitte wurden für 10 Minuten im Salzsäurebad behandelt.

Durchführung der Labelled-(Strept-)Avidin-Biotin-Methode:

Zuerst wurden die Schnitte zur Neutralisierung von endogenem im Gewebe vorkommenden Avidin und Biotin mit einem speziellen Blockierungskit 15 Minuten lang behandelt. Nach mehreren Waschschritten wurden die Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper, gelöst in 4%iger Magermilch, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die

Gewebeschnitte mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper für 30 Minuten behandelt. Danach wurde das Avidin-Biotin-Enzymkonjugat hinzugegeben. Nach einem Waschschrift mit TRIS-Puffer wurden die Schnitte mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen und dem Peroxidasesubstrat inkubiert. Dies führte zu einer Schwarzfärbung der gesuchten Gewebeepitope. Anschließend erfolgte noch eine Gegenfärbung mit Methylgrün. Das Enzymsubstrat wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe ausgewaschen. Schließlich wurde VedaMount für die Fixierung des Deckglases auf dem Gewebeschnitt verwendet. In dieser Arbeit wurde diese immunhistochemische Methode für die Anfärbung von CD3⁺-, F4/80⁺- und Mac2⁺-Zellen sowie IgG-Antikörpern angewendet.

Färbung für T-Zellen und Makrophagen:

Anti-CD3-, anti-F4/80 und anti-Mac-2-Antikörper wurden zur Detektion von infiltrierenden Leukozytensubpopulationen im Nierengewebe verwandt. Die angefärbten Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop ausgewertet. Dabei wurde die Zahl infiltrierender CD3⁺ T-Zellen in 200-facher Vergrößerung für 20 Gesichtsfelder (GF) pro Versuchstier ausgezählt. Zudem wurden gesondert die CD3⁺ T-Zellen in 50 Glomeruli pro Versuchstier gezählt (Tabelle 13). Hingegen wurde das Ausmaß F4/80⁺-Zellen als Anteil der angefärbten Fläche an der Gesamtfläche bestimmt. Hierfür wurden 20 GF in 400-facher Vergrößerung fotografiert und mittels ImageJ morphometrisch analysiert. Zur Bestimmung der glomerulären Makrophageninfiltration wurde die Fläche der Mac-2⁺-Färbung pro Glomerulus bestimmt. Hierfür wurden 50 Glomeruli pro Versuchstier fotografiert und

mittels ImageJ morphometrisch ausgewertet (Tabelle 13). Die Vorbereitung der Gewebeschnitte erfolgte wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben.

Zelltyp	Auswertung
CD3 ⁺	• Zellzahl pro GF, 20 GF pro Versuchstier bei 200x Vergrößerung ausgezählt • Zellzahl pro Glomerulus, 50 Glomeruli pro Versuchstier bei 400x Vergrößerung ausgezählt
F4/80 ⁺	• Gefärbte Fläche pro GF, 20 GF pro Versuchstier bei 400x Vergrößerung fotografiert, Auswertung mit ImageJ
Mac-2 ⁺	• Gefärbte Fläche pro Glomerulus, 50 Glomeruli pro Versuchstier bei 400x Vergrößerung fotografiert, Auswertung mit ImageJ

**Tabelle 13: Auswertung der immunhistochemischen Leukozytenfärbungen.
(GF: Gesichtsfeld)**

Färbung für glomeruläre IgG-Ablagerungen:

Anti-IgG-Antikörper wurden zur immunhistochemischen Färbung von IgG-Ablagerungen im Nierengewebe verwandt. Die angefärbten Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop ausgewertet. Dabei wurde der Anteil der angefärbten Fläche pro Glomerulus ausgemessen. Hierfür wurden 25 Glomeruli pro Versuchstier fotografiert und mittels ImageJ morphometrisch ausgewertet. Die Vorbereitung der Gewebeschnitte erfolgte wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben.

2.7.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Hintergrund:

Die Methode der Immunfluoreszenzfärbung basiert wie auch die Immunhistochemie auf Antigen-Antikörper-Reaktionen. Dabei wird ein bestimmtes Antigen durch einen Primäreantikörper gebunden. Ein Sekundärantikörper bindet dann gegen die Fc-Region des Primärantikörpers. Ein am Sekundärantikörper gebundener Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) kann im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden und erlaubt die Lokalisation des Antigens im Gewebe.

Podozytenquantifizierung mittels WT1/Nephrin-Doppelfärbung:

Das Wilms' Tumor-1 (WT1)-Gen spielt als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung der Nieren und spielt als Tumorsuppressorgen eine Rolle in unterschiedlichen Tumorerkrankungen, einschließlich dem Wilms' Tumor. In vollentwickelten Glomeruli findet sich WT1-Expression vor allem in den Zellkernen von Podozyten [129]. Nephrin hingegen ist ein wesentlicher Bestandteil der Schlitzmembran [130]. Die WT1/Nephrin-Doppelfärbung ermöglicht es, die Anzahl der Podozyten in einem Glomerulusquerschnitt zu bestimmen. Nur doppelpositive Zellen mit nukleärer WT1- und zytoplasmatischer oder membranständiger Nephrin-Färbung wurden dabei als Podozyt gezählt. Gezählt wurde die Anzahl an Podozyten in 20 Glomeruli pro Versuchstier. Zudem wurde die Nephrin-Expression als prozentualer Anteil der Fläche pro Glomerulus mittels ImageJ ebenfalls in 20 Glomeruli pro Versuchstier bestimmt.

Zelltodquantifizierung mittels TUNEL-Färbung und WT1/TUNEL-Doppelfärbung:

Die TdT-mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling (TUNEL)-Methode ermöglicht es, Zellkerne mit DNA-Strangbrüchen und somit regulierten Zelltod zu detektieren. Diese DNA-Strangbrüche sind typisch für sterbende Zellen. Als Gegenfärbung wird DAPI eingesetzt, welches grundsätzlich an DNA bindet und somit Zellkerne sichtbar macht. Um regulierten Zelltod von Zellkernfragmenten abzugrenzen wurden nur TUNEL-positive Strukturen, die auch DAPI-positiv waren und optisch eine intakte Zellmorphologie aufwiesen gezählt. In dieser Arbeit wurde der in situ-Zelltod-Detektions-Kit von Roche verwendet. Es wurde im Niereninterstitium 20 GF pro Versuchstier bei 200-facher Vergrößerung auf TUNEL-positive Zellkerne untersucht. Zudem wurde die Anzahl an TUNEL-positiven Zellen in 20 Glomeruli pro Versuchstier gezählt. Um regulierten Zelltod speziell in glomerulären Zellen nachzuweisen wurde für WT1 und TUNEL doppelgefärbt, da sich insbesondere in vollentwickelten Podozyten eine hohe WT1-Expression findet [129]. Die Anzahl an WT1/TUNEL-doppelpositiven Zellen wurde in 50 Glomeruli pro Versuchstier gezählt.

2.8 Statistische Methoden

Sämtliche Ergebnisse sind als Mittelwerte aller Versuchstiere innerhalb einer Versuchsgruppe angegeben. Die Fallzahl einer Versuchsgruppe ist mit dem Buchstaben „n“ gekennzeichnet. Die Fehlerbalken stellen die errechnete, einfache Standardabweichung innerhalb einer Versuchsgruppe dar. Die Versuchsgruppen wurden untereinander mit dem zweiseitigen T-Test für 2 Stichproben verglichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen wurde durch Sterne gekennzeichnet, wobei die Signifikanzniveaus mit einem Stern (* $\triangleq$ $p < 0,05$), 2 Sternen (** $\triangleq$ $p < 0,01$) und 3 Sternen (***) $\triangleq$ $p < 0,001$) dargestellt sind.

3 Ergebnisse

3.1 Renale Funktionsparameter in WT- und A20-defizienten

Mäusen mit NTN

Das autologe Modell der NTN wurde in WT- und A20 +/- Mäusen induziert und der Verlauf der Nephritis charakterisiert. Die renalen Funktionsparameter Serumkreatinin und -harnstoff wurden an Tag 14 nach NTN-Induktion gemessen. Beide Parameter ermöglichten eine Abschätzung der exkretorischen Nierenfunktion, wobei sowohl ein Anstieg des Serumkreatinins als auch des Serumharnstoffs mit einem Verlust der Nierenfunktion korreliert [12]. Kreatinin und Harnstoff waren in den A20 +/- Mäusen im Vergleich zum WT an Tag 14 signifikant erhöht (Abbildung 17), was auf einen verstärkten Nierenfunktionsverlust und Nierenschaden in A20-defiziente Tieren im Verlauf der NTN hinwies.

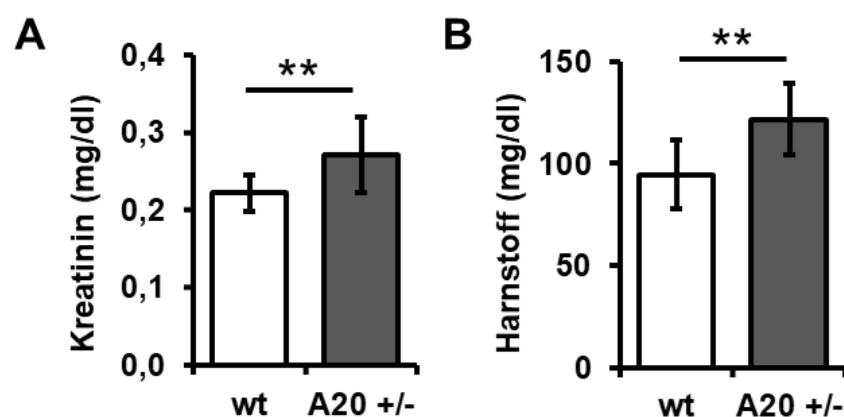


Abbildung 17: Nierenfunktionsparameter nach NTN-Induktion.

Nierenfunktionsparameter von WT-Mäusen und A20 +/- Mäusen während der autologen NTN. (A) Serumkreatinin in mg/dl an Tag 14. (B) Serumharnstoff in mg/dl an Tag 14 (N=8-10 je Gruppe, ** p<0,01).

3.2 Funktionelle Parameter der glomerulären Schädigung in WT- und A20-defizienten Mäusen mit NTN

Um die Ausprägung des glomerulären Schadens im Modell der autologen NTN in WT- und A20 +/- Mäusen zu untersuchen wurde zunächst eine Reihe weiterer funktioneller Parameter bestimmt. Das NTN-Modell ist durch eine vermehrte Proteinurie mit führender Albuminurie bedingt durch einen glomerulären Schaden charakterisiert [26]. Dieser systemische Eiweißverlust führt charakteristischerweise zu einer kompensatorisch gesteigerten Lipoproteinsynthese in der Leber mit Ausbildung einer Hypercholesterinämie [17]. Aus diesem Grund wurden sowohl das Serumprotein und Cholesterin an Tag 14 als auch die Albuminurie in Spontanurinproben an Tag 0, 7 und 14 nach NTN-Induktion gemessen. Dabei entspricht Tag 0 dem Normalbefund vor NTN-Induktion. Die gemessene Albuminkonzentration wurde mit der Kreatinin-Konzentration im Urin ins Verhältnis gesetzt und das Ausmaß der Albuminurie als Albumin/Kreatinin-Ratio dargestellt. Das Serumprotein zeigte sich ohne signifikanten Unterschied in A20-defizienten Mäusen im Vergleich zum WT, hingegen war das Serumcholesterin in den A20 +/- Tieren signifikant erhöht (Abbildung 18). Nach Induktion der NTN entwickelten sowohl WT- als auch A20 +/- Mäuse bis Tag 7 eine deutliche Albuminurie, die bis Tag 14 persistierte. Allerdings zeigten A20-defiziente Tiere eine signifikant höhere, etwa um das 2-fache gesteigerte Albuminurie als die WT-Kontrollen (Abbildung 18). Somit zeigten alle Versuchstiere laborchemische Veränderungen infolge der glomerulären Schädigung, jedoch deutlich ausgeprägter in den A20 +/- Tieren. Insbesondere wies die erhöhte Albuminurie

in den A20-defizienten Versuchstieren auf einen verstärkten glomerulären Schaden hin [18].

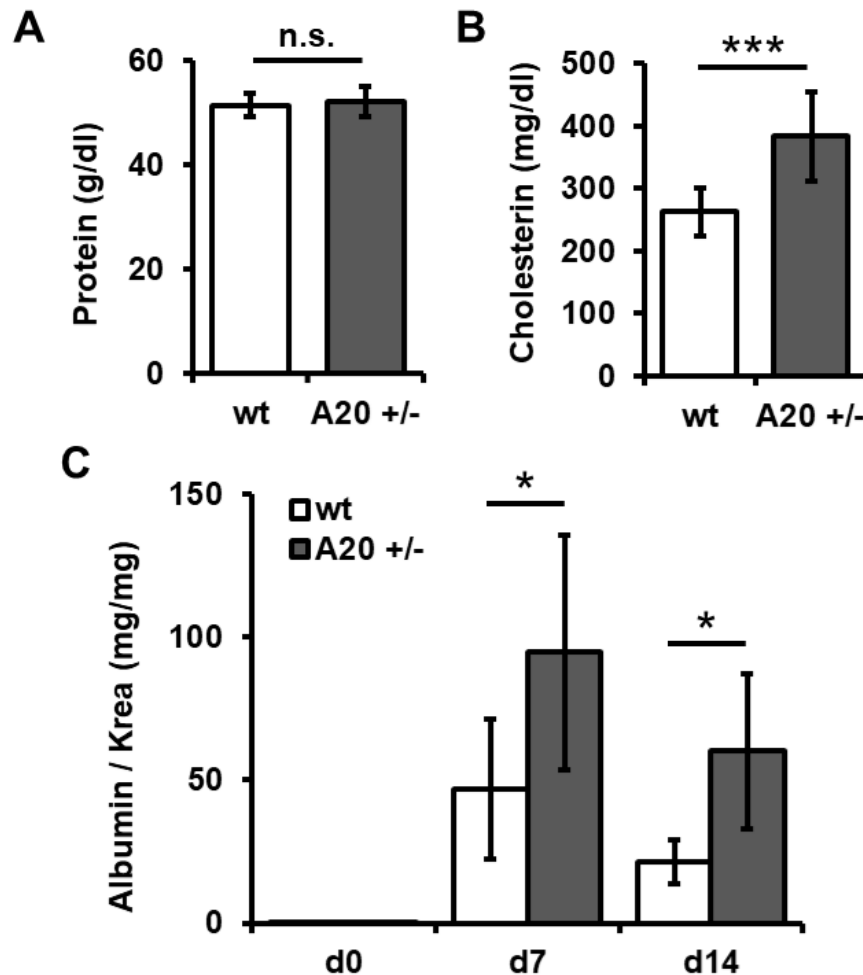


Abbildung 18: Funktionelle Parameter der glomerulären Schädigung nach NTN-Induktion.

Parameter des nephrotischen Syndroms in WT- und A20 +/- Mäusen während der autologen NTN. (A) Serumprotein in g/dl an Tag 14. (B) Serumcholesterin in mg/dl an Tag 14. (C) Albuminurie in mg/mg Kreatinin aus Spontanurinproben an Tag 0, Tag 7 und Tag 14 (N=8-10 je Gruppe, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

3.3 Glomerulärer Schaden nach NTN-Induktion

Zur Beurteilung des renalen Schadens am Tag 14 der NTN wurde das Nierengewebe der WT- und A20 +/- Mäuse histologisch untersucht. Hierfür wurden PAS-Färbungen der Nieren angefertigt. Diese wurden mit Hilfe des glomerulären Sklerose-Scores nach El Nahas (siehe Kapitel 2.7.1) bewertet [128]. Hier zeigte sich, dass A20 +/- Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren eine signifikant vermehrte Glomerulosklerose aufwiesen (Abbildung 19). Glomerulosklerose als Zeichen des narbigen Gewebeumbaus nach Nierenschaden geht mit Verlust an funktionalem Gewebe einher. Entsprechend korrelierte die verstärkte Glomerulosklerose mit erhöhten Serumkreatinin und -harnstoffwerten in den A20-defizienten Mäusen. Zudem geht die Glomerulosklerose mit einem Schaden der Filtrationsbarriere einher, was zu vermehrter Albuminurie führt. Ein integraler Teil der Filtrationsbarriere stellt der Podozyt und die zwischen den interdigitierenden Fußfortsätzen liegenden Schlitzmembran dar [9]. Zur Beurteilung, ob in den A20-defizienten Mäusen die vermehrte Glomerulosklerose mit vermehrtem Podozytenverlust korrelierte wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für Podozyten mit WT1 und Nephrin angefertigt (siehe Kapitel 2.7.3). Doppel-positive Zellen wurden als Podozyten gewertet. Im Vergleich zu WT-Mäusen zeigte sich in A20 +/- Mäusen ein signifikant stärkerer Podozytenverlust am Tag 14 der autologen NTN (Abbildung 19). Zudem zeigten A20 +/- Tiere eine signifikant verminderte Expression von Nephrin als Zeichen des Podozytenfunktionsverlustes und Verlust der Nephrin-enthaltenden Schlitzmembran (Abbildung 19). Zusammenfassend entwickelten WT- als auch A20 +/- Mäuse im Verlauf der NTN bis Tag 14 einen glomerulären Schaden mit glomerulärer Sklerose. Diese glomeruläre

Schädigung war korrelierend zu den verschlechterten funktionellen Parametern signifikant stärker in A20 +/- Mäusen als in WT-Mäusen ausgeprägt.

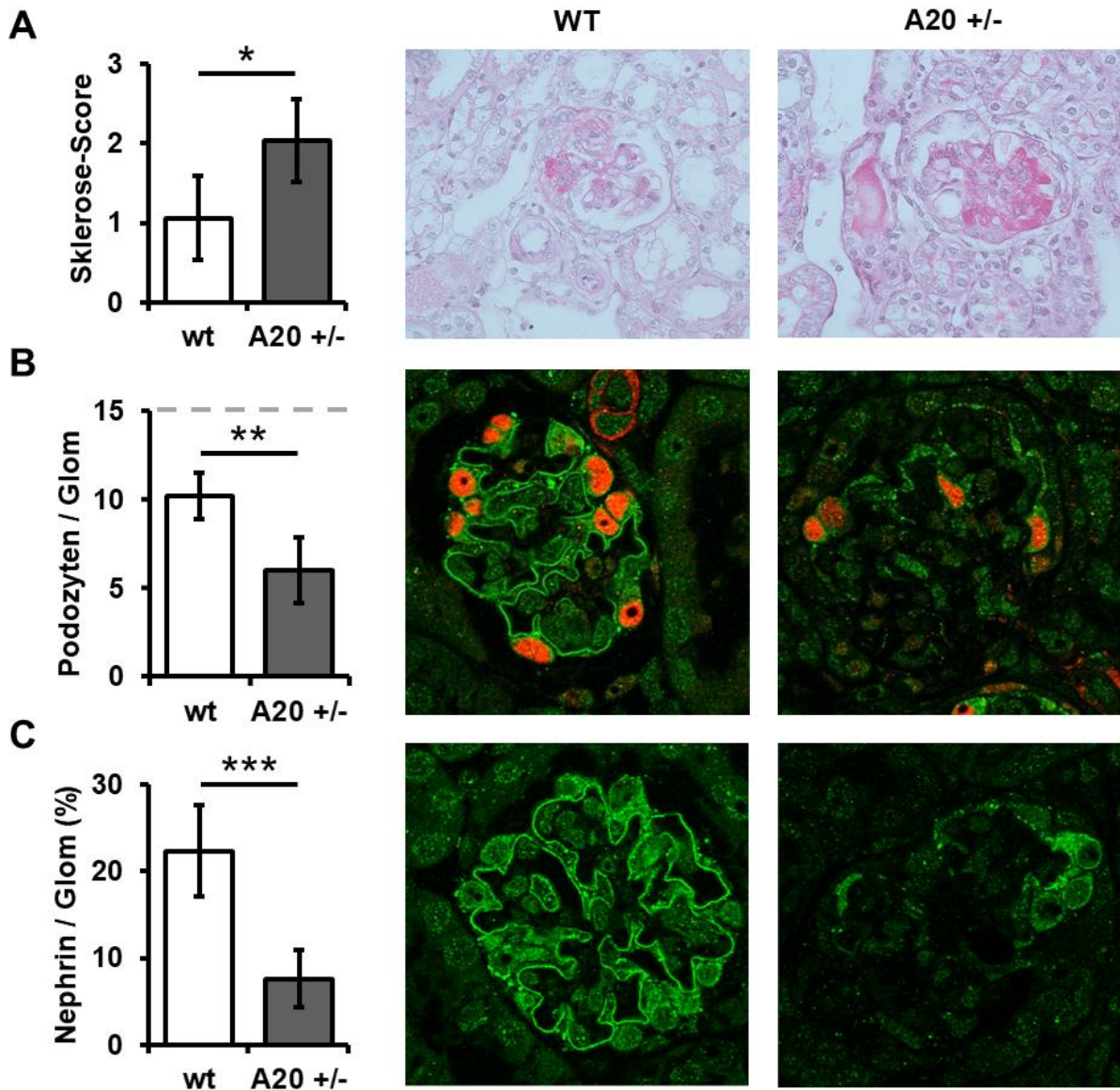


Abbildung 19: Glomerulärer Schaden in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 14 der NTN.

(A) PAS-Färbung der Niere zur Quantifizierung der Glomerulosklerose mittels Sklerose-Score nach El Nahas (N=8-11 je Gruppe, * $p < 0,05$). (B) WT1/Nephrin-Doppelfärbung zur Quantifizierung der Podozyten pro Glomerulus. Die gestrichelte Linie (grau) zeigt den Normalwert unbehandelter WT-Tiere. (C) Nephrin-Färbung zur Quantifizierung der Nephrin-Expression pro Glomerulus in % (N=5 je Gruppe, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.4 Tubulärer Schaden nach NTN-Induktion

In der Regel gehen glomeruläre Nierenerkrankungen mit einem sekundären tubulointerstitiellen Nierenschaden einher, u.a. aufgrund der tubulotoxischen Wirkung der Albuminurie und der Wirkung glomerulär produzierter Entzündungsmediatoren. Zudem zeigen die im nephrotoxischen Serum enthaltene Antikörper, die zur Induktion der NTN führen vor allem Affinität für glomeruläre Strukturen, jedoch werden auch tubuläre Strukturen gebunden [26]. Folglich war am Tag 14 der NTN auch von einer sekundären tubulointerstitiellen Schädigung auszugehen. Die tubuläre Schädigung wurde in der PAS-Färbung anhand eines semiquantitativen Scores (siehe Kapitel 2.7.1) bewertet, der die Beurteilung von tubulärer Dilatation, tubulärer Atrophie, tubulärer Denudation und intraluminaler Zylinder miteinschloss. Anhand dieser Auswertung konnte gezeigt werden, dass am Tag 14 der NTN der tubuläre Schaden in A20 +/- Mäusen signifikant stärker ausgeprägt war als in WT-Mäusen (Abbildung 20). Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde der tubuläre Schadensmarker KIM-1 im Urin gemessen. Hier zeigte sich eine signifikant höhere Konzentration an KIM-1 in den A20 +/- Tieren im Vergleich zum WT, sowohl an Tag 7 als auch Tag 14 nach autologer NTN-Induktion (Abbildung 20). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass in A20-defizienten Mäusen die verstärkte glomeruläre Schädigung im Verlauf der NTN auch mit einem signifikant vermehrten tubulären Schaden als in WT-Tieren einhergeht.

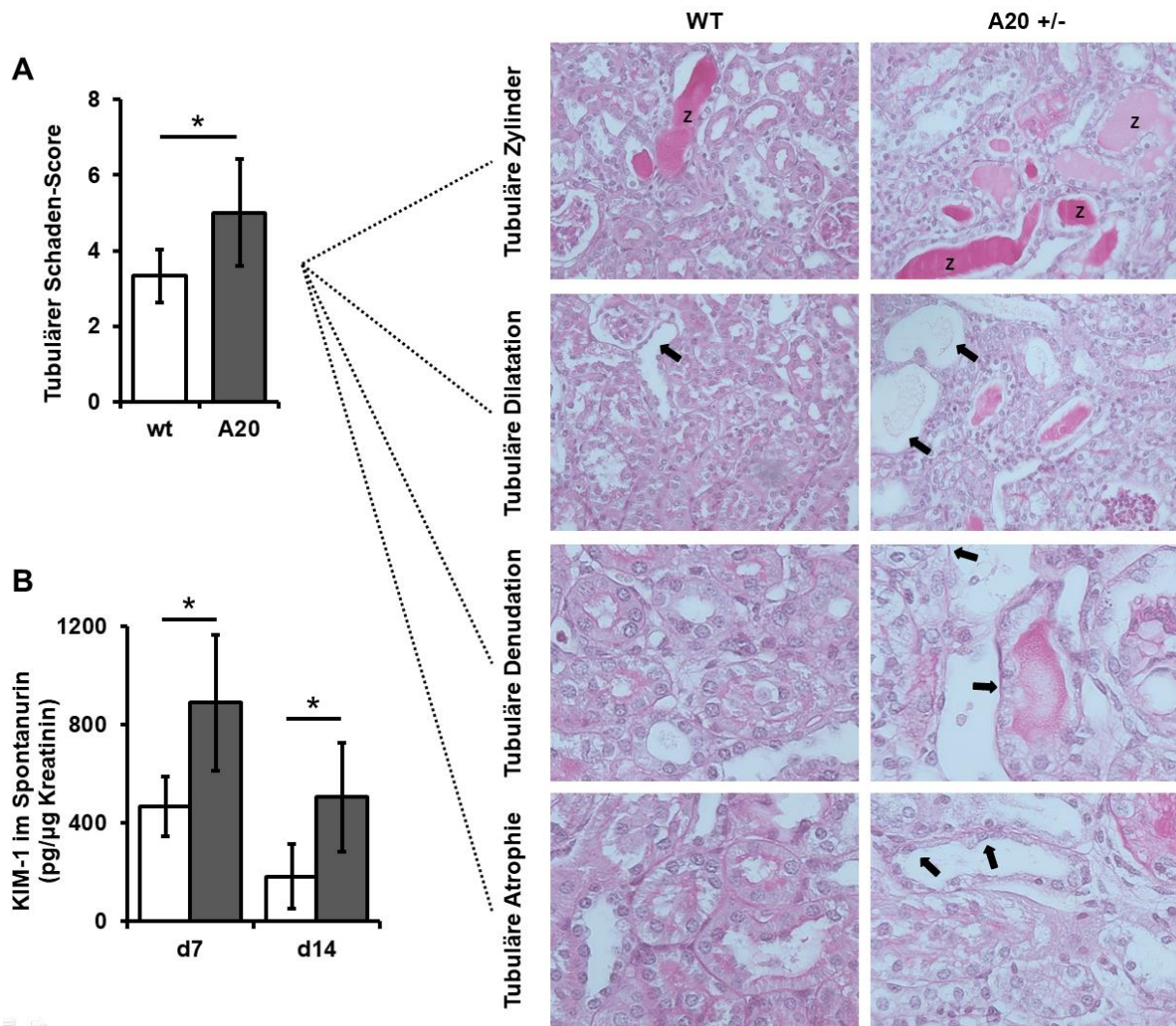


Abbildung 20: Tubulärer Schaden im Verlauf der NTN in WT- und A20 +/- Mäusen.

(A) Der tubuläre Schaden wurde in der PAS-Färbung anhand der tubulären Zylinder (Z), Dilatation, Denudation und Atrophie ermittelt und mittels eines Schaden-Scores quantifiziert. Pfeile (schwarz) deuten auf die jeweilige Pathologie. (B) Urinkonzentration des tubulären Schadenmarkers KIM-1 an Tag 7 und Tag 14 (d = Tag) nach autologer NTN-Induktion in pg/μg Kreatinin. (N=5 je Gruppe, * p<0,05).

3.5 Renale Leukozyteninfiltration im Verlauf der NTN in WT- und A20-defizienten Mäusen

Die verschlechterten Nierenfunktionsparameter und der verstärkte renale Gewebsschaden in A20-defizienten nephritischen Mäusen wiesen auf eine vermehrte Entzündungsaktivität der NTN bei A20-Defizienz hin. Daher wurde zunächst das Ausmaß der renalen Leukozyteninfiltration in WT- und A20 +/- Mäusen am Tag 14 der NTN mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Kapitel 2.4.1). Die Anzahl aller CD45⁺ Leukozyten, CD3⁺ T-Lymphozyten, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie F4/80⁺ und CD11c⁺ mononukleäre Phagozyten und deren Subpopulationen (CD11c⁺, CD11c⁺/F4/80⁻ und CD11c⁺/F4/80⁻ DCs, CD11c⁻/F4/80⁺ Makrophagen) wurde quantifiziert. Als Kontrolle wurden für beide Genotypen gesunde Versuchstiere ohne NTN-Induktion analysiert. Alle Ergebnisse der einzelnen Zellpopulationen wurden als Prozentwerte bezogen auf die renale Gesamtzellzahl angegeben. In den gesunden Kontrolltieren zeigte sich in WT- und A20 +/- Mäusen eine vergleichbare Zahl aller renalen Leukozytenpopulationen (Abbildung 21). Die nephritischen Tiere beider Genotypen hingegen fielen mit einer deutlich verstärkten Leukozyteninfiltration aller Zellreihen im Vergleich zu den gesunden Tieren auf, was auf eine vermehrte entzündliche Aktivität in den nephritischen Nieren nach Induktion der NTN hinwies. Die Genotypen untereinander wiesen hierbei deutliche Unterschiede nach NTN-Induktion auf. Die A20 +/- Mäuse zeigten eine signifikant vermehrte renale CD45⁺-Leukozyteninfiltration als die WT-Mäuse. Ähnliche Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten sich auch für CD3⁺ T-Lymphozyten. Dabei waren in den A20 +/- Mäusen sowohl signifikant mehr CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen im Nierengewebe vorhanden. Zudem war

die Akkumulation von F4/80⁺ Makrophagen und CD11c⁺ DCs in nephritischen Nieren A20-defizienter Mäuse signifikant verstärkt (Abbildung 21).

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden immunhistochemische Färbungen am Nierengewebe am Tag 14 nach autologer NTN-Induktion für CD3⁺ Lymphozyten, F4/80⁺ und Mac-2⁺ Makrophagen durchgeführt (Abbildung 22). Auch hier zeigte sich in den A20 +/- Mäusen eine signifikant stärkere Akkumulation renaler CD3⁺ T-Lymphozyten, sowohl im Tubulointerstitium als auch glomerulär. Ebenfalls konnte eine vermehrte Infiltration von F4/80⁺ Makrophagen in das Nierengewebe A20-defizienter Mäuse im Vergleich zum WT nachgewiesen werden. Analog hierzu zeigten sich eine verstärkte Infiltration von Mac-2⁺ Makrophagen in den Glomeruli der A20 +/- Mäusen im Vergleich zum WT. Somit korrelierten der verstärkte Nierenfunktionsverlust (Kapitel 3.1), die vermehrte Albuminurie (Kapitel 3.2) und der verstärkte Nierenschaden (Kapitel 3.3 und 3.4) mit einer signifikant verstärkten renalen Leukozyteninfiltration in den A20 +/- Mäusen im Vergleich zum WT.

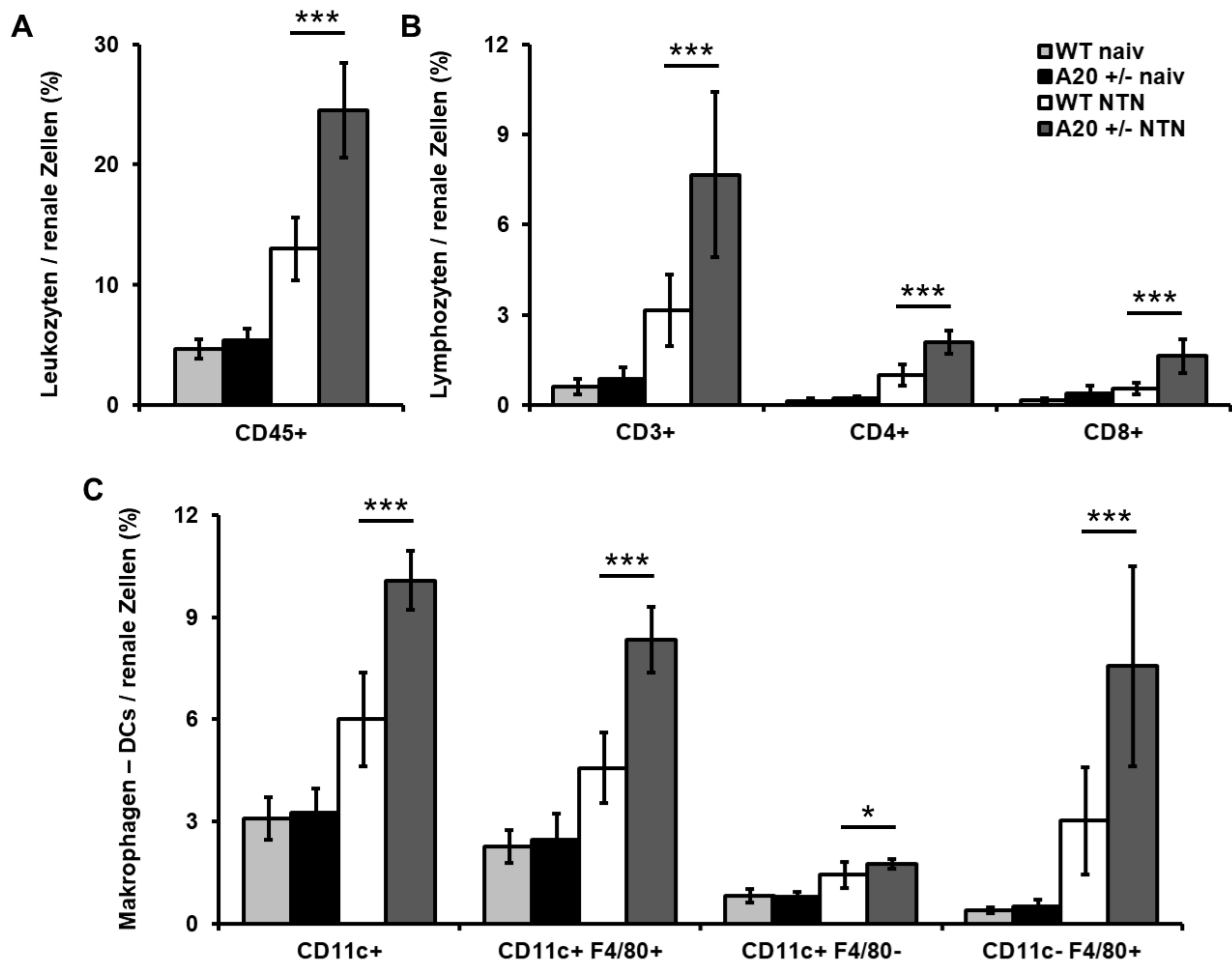


Abbildung 21: Renale Leukozyteninfiltration in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 14 der NTN (Durchflusszytometrie).

Durchflusszytometrische Messung inflammatorischer Zellen im Nierengewebe 14 Tage nach autologer NTN-Induktion. Zum Vergleich sind die Ergebnisse unbehandelter, gesunder Tiere beider Genotypen aufgeführt. (A) Anteil an CD45⁺ Leukozyten an allen renalen Zellen in %. (B) Anteil an CD3⁺ Lymphozyten an allen renalen Zellen in %. Zudem gezeigt ist die Differenzierung in CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten. (C) Anteil an CD11c⁺/F4/80⁺ Makrophagen und CD11c⁺ DCs an allen renalen Zellen in %. Zudem gezeigt ist die Differenzierung in CD11c⁺/F4/80⁺ und CD11c⁺/F4/80⁻ DCs. (N=8-11 je Gruppe, * p<0,05, *** p<0,001)

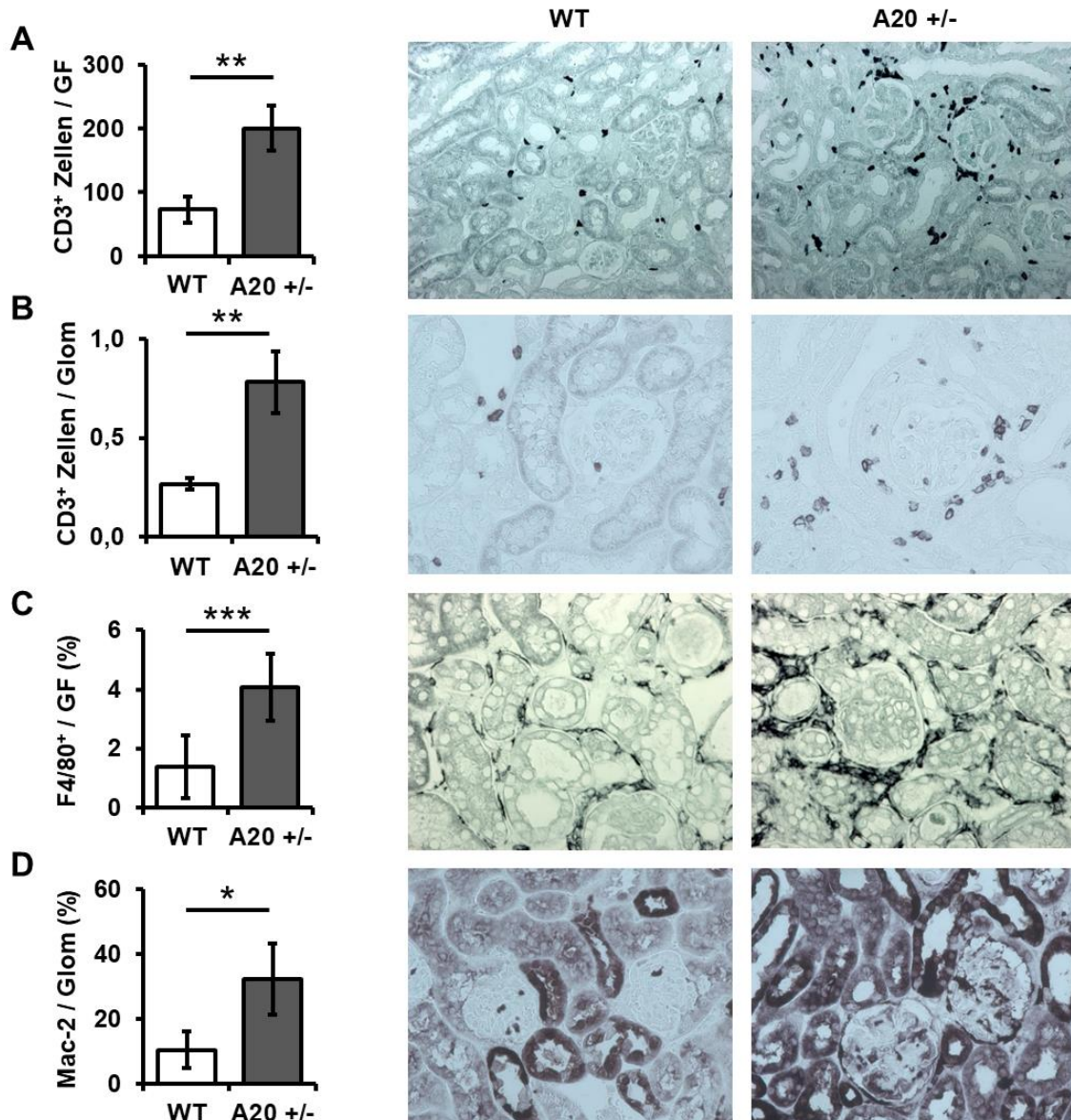


Abbildung 22: Renale Leukozyteninfiltration in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 14 der NTN (Immunhistochemie).

Immunhistochemische Färbungen renaler Leukozyteninfiltrationen in A20 +/- und WT-Mäusen nach autologer NTN-Induktion. (A) Anzahl der CD3⁺ Lymphozyten im Nierengewebe (200x Vergrößerung) (B) Anzahl der CD3⁺ Lymphozyten pro Glomerulus (400x Vergrößerung). (C) Anteil F4/80⁺-Färbung (Makrophagen) an der Gesamtfläche des Nierengewebes in % (400x Vergrößerung). (D) Anteil Mac-2⁺-Färbung pro Glomerulus in % (400x Vergrößerung) (N=5 je Gruppe, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

3.6 Renale Expression inflammatorischer Mediatoren

Die vermehrte Leukozyteninfiltration in nephritischen Nieren nach Induktion der NTN (siehe Kapitel 3.5) geht mit einer lokalen Entzündungsreaktion einher. Dabei spielen renal exprimierte Chemokine und Zytokine eine wichtige Rolle in der lokalen Leukozytenrekrutierung und -aktivierung. A20 als Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung sollte eine wichtige Rolle in der Begrenzung von NF- κ B-abhängiger Expression proinflammatorischer Zytokine spielen. Um dies in den nephritischen Nieren nach NTN-Induktion zu untersuchen, wurde die renale mRNA-Expression wichtiger pro- und antiinflammatorischer Zytokine mittels RT-PCR analysiert (siehe Kapitel 2.5.1). Die proinflammatorischen Chemokine CCL2, CCL5, CXCL5 und CXCL9 waren auf mRNA-Ebene signifikant höher in nephritischen A20 +/- Nieren am 14. Tag nach NTN-Induktion im Vergleich zum WT exprimiert. Vergleichbar zeigte sich auch eine verstärkte TNF-Expression in den A20 +/- Nieren, ähnlich wie eine tendenziell, jedoch nicht signifikant vermehrte Expression der inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6. Auch die mRNA-Expression des Enzyms iNOS, welches durch inflammatorisch aktivierte Makrophagen gebildet wird, war in A20 +/- Nieren signifikant erhöht. Die mRNA des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 war ebenfalls in A20 +/- Nieren im Vergleich zum WT signifikant stärker exprimiert (Abbildung 23). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die vermehrte Leukozytenakkumulation in nephritischen A20 +/- Nieren mit einer verstärkten renalen Expression inflammatorischer Chemokine und Zytokine einhergeht.

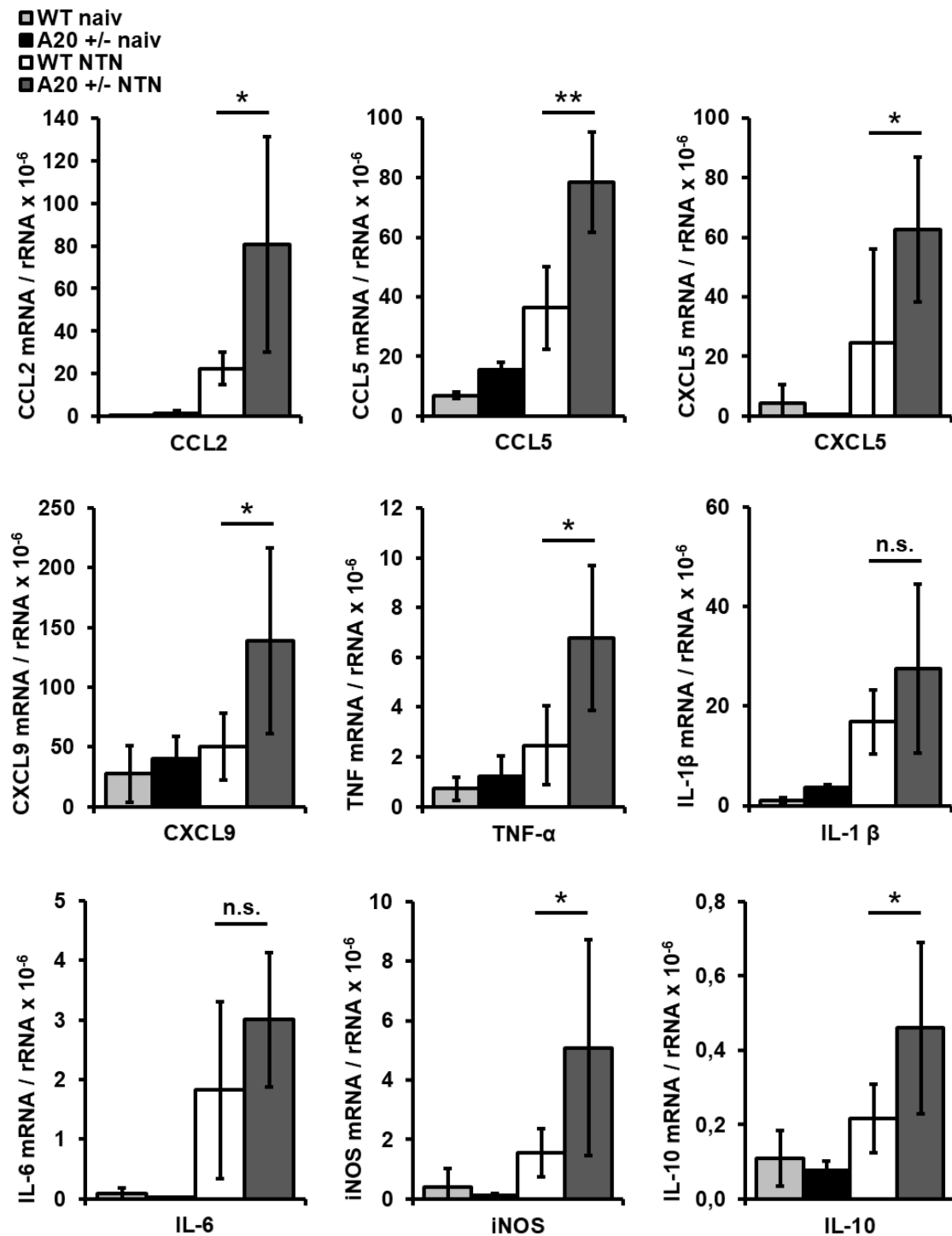


Abbildung 23: Renale Chemokin- und Zytokin-mRNA-Expression in WT und A20 +/- Mäusen am Tag 14 nach NTN-Induktion.

RT-PCR des Nierengewebes von WT und A20 +/- Mäusen am Tag 14 nach autologer NTN-Induktion. Zum Vergleich sind die Ergebnisse unbehandelter, gesunder Tiere beider Genotypen aufgeführt. Gezeigt ist die renale mRNA-Expression der proinflammatorischen Chemokine CCL2, CCL5, CXCL5, CXCL9, TNF, der Zytokine IL-1β, IL-6, iNOS und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 im Verhältnis zur rRNA-Expression ($\times 10^{-6}$). (n=5 je Gruppe, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, n.s. $p > 0,05$)

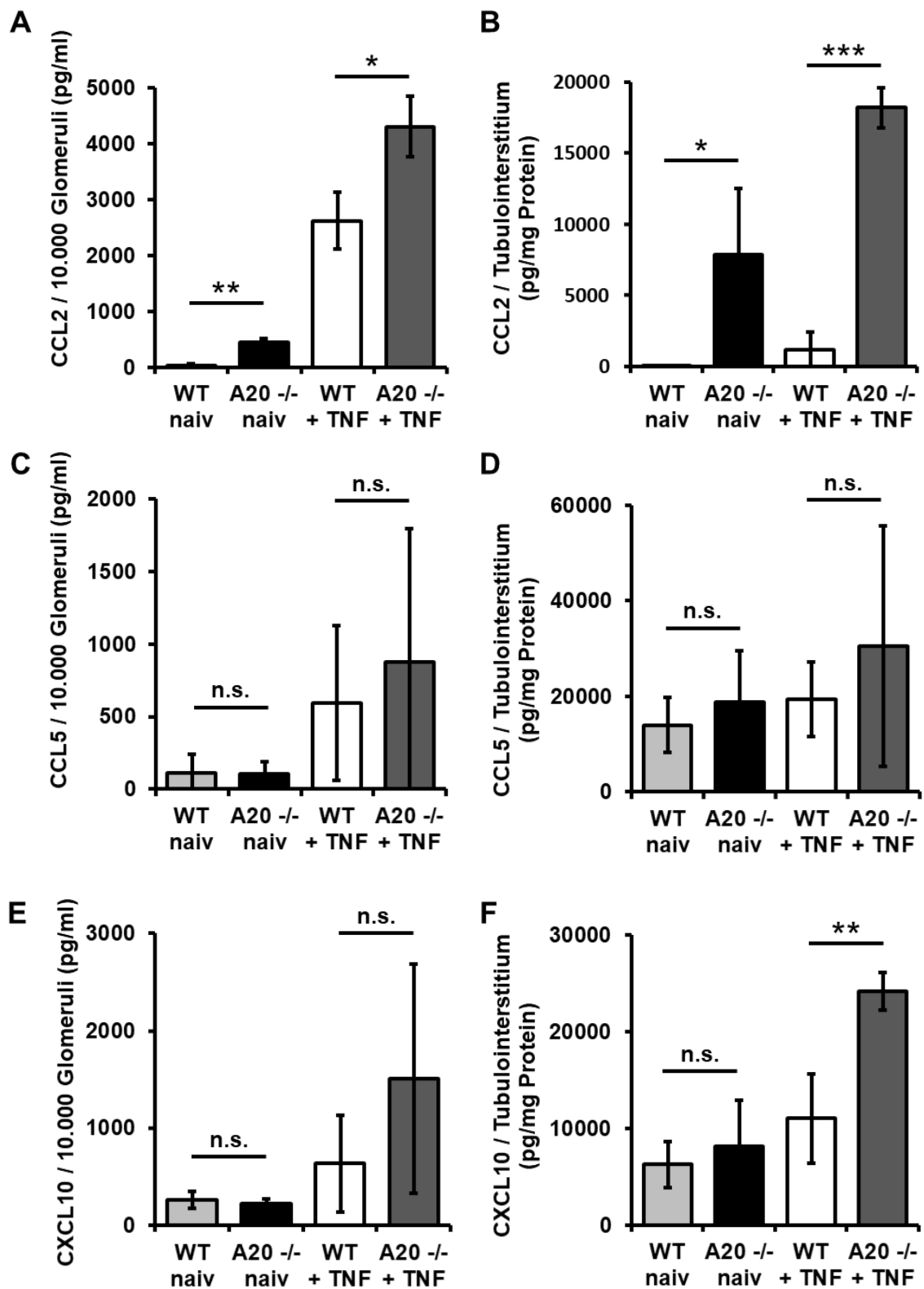
3.7 Glomeruläre Inflammation in vitro

Der verstärkten renalen Expression inflammatorischer Mediatoren in nephritischen A20 +/- Tieren könnte eine vermehrte Expression in aktivierten A20-defizienten Nierenparenchymzellen zugrunde liegen, mit nachfolgend gesteigerter Leukozyteninfiltration. Zur weiteren Charakterisierung der verstärkten renalen Entzündungsreaktion in A20 +/- Mäusen führten wir daher in vitro-Versuche an isolierten intakten Glomeruli und tubulointerstitiellem Gewebe (TI) durch. Hierfür wurden aus WT- und homozygoten A20-Knockout-Mausnieren mittels paramagnetischer Isolation Glomeruli vom tubulointerstitiellem Gewebe isoliert (siehe Kapitel 2.3.1). Anschließend wurden jeweils 10.000 Glomeruli und Tubulointerstitium kultiviert und über 24 Stunden mit 50 ng/ml TNF stimuliert. Im Zellkultur-überstand wurde anschließend die sezernierte Menge der Chemokine CCL2, CCL5 und CXCL10 mittels ELISA bestimmt. Bereits in nicht stimulierten Glomeruli und tubulointerstitiellem Gewebe zeigten sich eine signifikant höhere CCL2-Produktion in den A20 -/- Mäusen im Vergleich zum WT. Nach TNF-Stimulation zeigte sich erwartungsgemäß in beiden Genotypen ein deutlicher Anstieg der CCL2-Ausschüttung im Vergleich zur Baseline ohne Stimulation. Hierbei sezernierten A20-defiziente Glomeruli und Tubulointerstitium signifikant mehr CCL2 als WT-Gewebe. Entsprechend war auch die CXCL10-Sekretion im TNF-stimulierten A20-defizienten Tubulointerstitium signifikant erhöht im Vergleich zum WT. Tendenziell vermehrt, jedoch nicht signifikant erhöht im Vergleich zum WT, war auch die Sekretion von CXCL10 durch TNF-stimulierte A20 -/- Glomeruli und von CCL5 in TNF-stimulierten A20 -/- Glomeruli und Tubulointerstitium (Abbildung 24). Alle Gruppen ohne

oder mit Stimulation zeigten untereinander keinen signifikanten Unterschied in ihrer LDH-Aktivität als Maß für den Zelltod (Abbildung 24G, H), sodass die gezeigten Unterschiede in den Chemokinsekretionen am ehesten auf die inflammatorische Aktivität lebender Nierenparenchymzellen zurückzuführen sind.

Auch auf mRNA-Ebene zeigte sich eine vermehrte Expression proinflammatorischer Chemokine in A20-defizienten Glomeruli und im Tubulointerstitium nach TNF-Stimulation im Vergleich zum WT. CCL2-mRNA-Expression im Tubulointerstitium und CCL5-mRNA-Expression in den Glomeruli war signifikant erhöht in A20 ^{-/-} Mäusen im Vergleich zum WT. CCL2-Expression in stimulierten Glomeruli, CCL5 im Tubulointerstitium sowie CXCL10 in beiden Kompartimenten zeigte sich tendenziell erhöht (Abbildung 25).

Diese Ergebnisse zeigen, dass unabhängig vom Ausmaß der renalen Leukozyteninfiltration in vivo A20-Defizienz in inflammatorisch stimulierten renalen Parenchymzellen zu einer verstärkten Expression von Entzündungsmediatoren führt. Dies korreliert in vivo mit einem verschlechtertem Verlauf der NTN.



Abbildungsbeschriftung siehe nächste Seite.

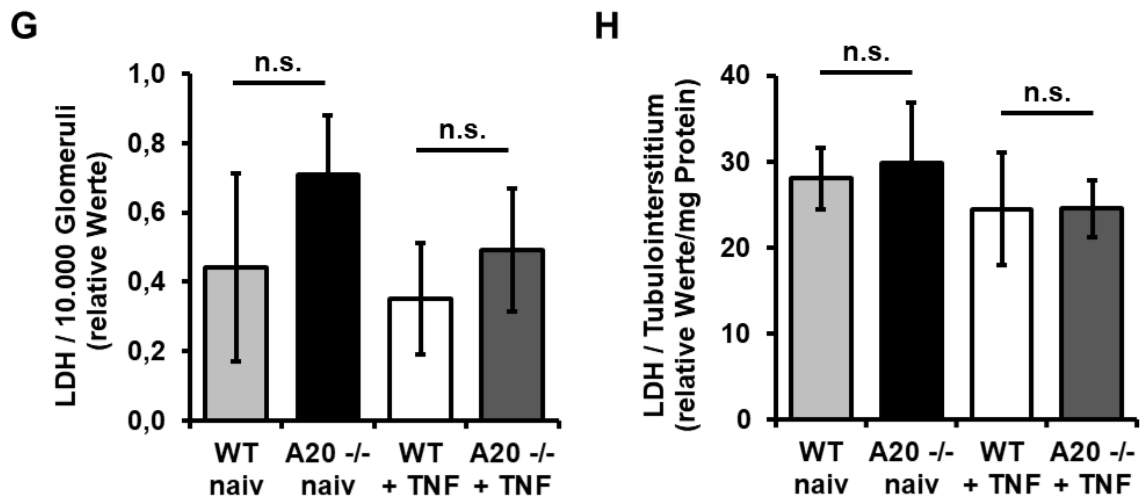


Abbildung 24: Glomeruläre und tubulointerstitielle Proteinexpression der Chemokine CCL2, CCL5 und CXCL10 und Zelltodquantifizierung mittels LDH-Assay in WT und A20 -/- nach TNF-Stimulation in vitro.

Zellkultur von 10.000 Glomeruli (Gloms) und tubulointerstitiellem Gewebe (TI) von WT- und A20 -/- Mäusen ohne und mit TNF-Stimulation (50 ng/ml) über 24 Stunden. (A, C, E) CCL2-, CCL5- und CXCL10-Proteinmessung im Zellkulturüberstand der Gloms mittels ELISA (B, D, F) CCL2-, CCL5- und CXCL10-Proteinmessung im Zellkulturüberstand des TI im Verhältnis zum Gesamtprotein mittels ELISA. (G, H) Zelltodquantifizierung mittels LDH-Assay der 10.000 Gloms und des TI im Verhältnis zum Gesamtprotein. (n=3 je Gruppe, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, n.s. p>0,05)

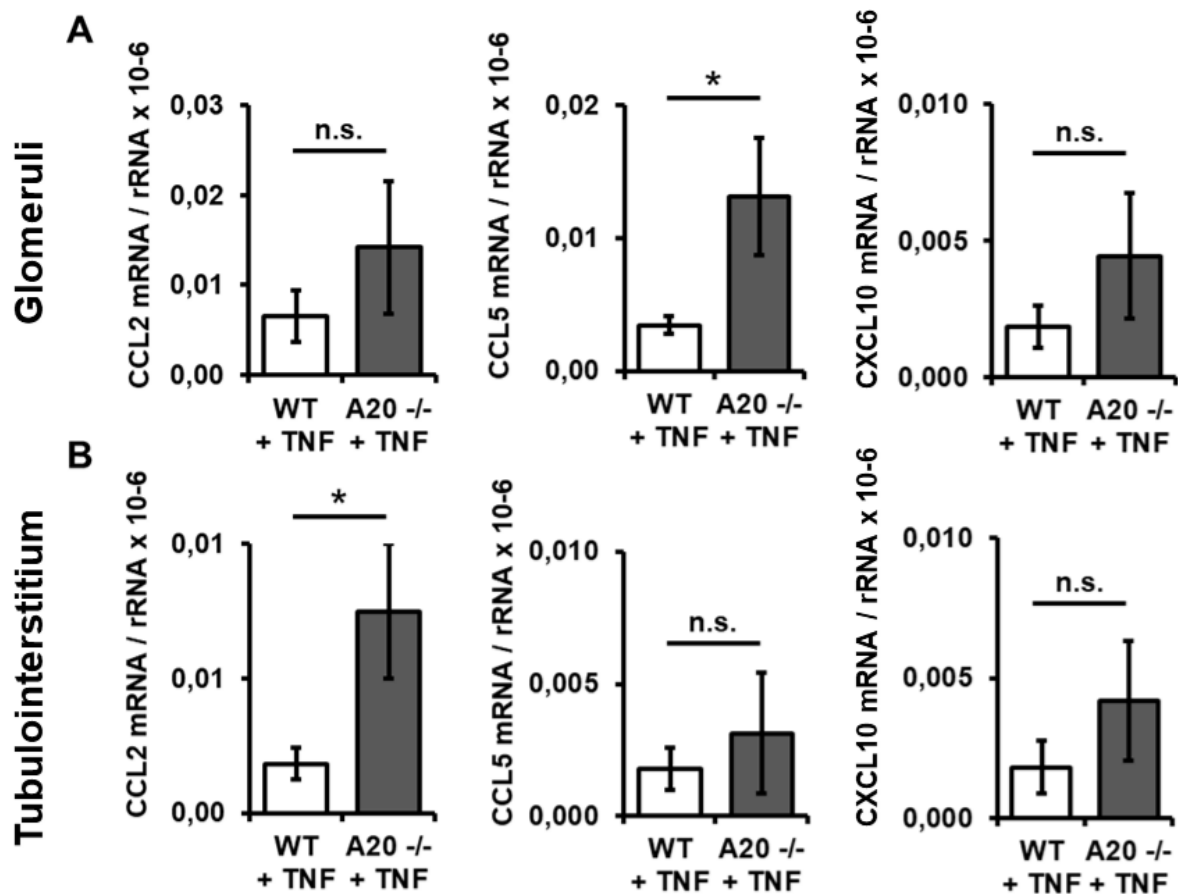


Abbildung 25: Glomeruläre und tubulointerstitielle mRNA-Expression der Chemokine CCL2, CCL5 und CXCL10 in WT und A20^{-/-} nach TNF-Stimulation in vitro.

Zellkultur von 10.000 Glomeruli (Gloms) und tubulointerstitiellem Gewebe (TI) von WT- und A20^{-/-} Mäusen ohne und mit TNF-Stimulation (50 ng/ml) über 24 Stunden. (A) CCL2-, CCL5- und CXCL10-mRNA-Expressionsmessung im Zellkulturüberstand der Gloms im Verhältnis zur rRNA-Expression ($\times 10^{-6}$). (B) CCL2-, CCL5- und CXCL10-mRNA-Expressionsmessung im Zellkulturüberstand des TI im Verhältnis zur rRNA-Expression ($\times 10^{-6}$). (n=3 je Gruppe, * $p < 0,05$, n.s. $p > 0,05$)

3.8 Lokale versus systemische Inflammation

A20-Defizienz könnte neben Verstärkung der lokalen renalen Entzündungsreaktion im Verlauf der NTN auch die systemische Immunantwort auf die glomerulär abgelagerte Immunkomplexe nach Injektion des nephrotischen Serums verstärken und so zum verschlechterten Verlauf der NTN beitragen. In ergänzenden Untersuchungen wurde daher *in vivo* sowohl die renale Entzündung als auch die systemische Komponente der Inflammation in WT- und A20 +/- Mäusen nach NTN-Induktion untersucht. Zur Betrachtung der lokalen Inflammation wurde in WT- und A20 +/- Mäusen eine heterologe NTN induziert und nach 5 Tagen analysiert. Die sich akut entwickelnde GN in diesem Modell beruht vor allem auf der lokalen Nephrotoxizität des nephrotischen Serums und somit auf der lokalen Entzündungsreaktion induziert durch die abgelagerten Immunkomplexe ohne zusätzliche autologe systemische Immunantwort [26].

Zur Untersuchung des glomerulären Schadens wurde zunächst die Albuminurie in Spontanurinproben und das Ausmaß der Glomerulosklerose in der PAS-Färbung bestimmt (Abbildung 26). Hier zeigte sich im Verlauf der heterologen NTN an Tag 5 eine signifikant größere Albuminurie in den A20-defizienten Mäusen als im WT. Entsprechend zeigte sich in der PAS-Färbung eine signifikant vermehrte Glomerulosklerose in den A20 +/- Tieren im Vergleich zum WT.

Das Ausmaß der Nephritis wurde durch durchflusszytometrische Quantifizierung des renalen Leukozytenanteils erfasst (siehe Kapitel 2.4.1). An Tag 5 der heterologen NTN lag in A20 +/- Nieren eine signifikant vermehrte

Akkumulation $CD45^+$ Leukozyten vor. Im Speziellen zeigte sich eine verstärkte renale Infiltration von $CD3^+$ T-Lymphozyten in den A20 +/- Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren. Dies galt sowohl für $CD4^+$ als auch für $CD8^+$ T-Zellen. Des Weiteren lag eine vermehrte renale Akkumulation von $F4/80^+$ Makrophagen und $CD11c^+$ DCs sowie deren Subpopulationen ($CD11c^+$, $CD11c^+/F4/80^-$ und $CD11c^+/F4/80^-$ DCs, $CD11c^-/F4/80^+$ Makrophagen) in das Nierengewebe vor (Abbildung 27).

Zusammenfassend korrelierte vermehrter glomerulärer Schaden mit einer vermehrten renalen Leukozyteninfiltration in A20-defizienten Mäusen mit heterologer NTN. Diese Ergebnisse waren vergleichbar mit den Daten aus den autologen NTN-Studien (siehe Kapitel 3.4.).

Zur Untersuchung der systemischen Immunantwort nach Injektion des nephrotoxischen Schaf-Serums wurde das Ausmaß der autologen Antikörperantwort, d.h. die Bildung von Anti-Schaf-IgG an Tag 14 der NTN im Serum von WT- und A20 +/- Mäusen mittels ELISA gemessen. Da das Schaf in dem verwendeten NTN-Modell das Spendertier für das nephrotoxische Serum ist (siehe Kapitel 2.2.5), sollte eine starke systemische Inflammation im Rahmen einer adaptiven humoralen Immunreaktion zu einer vermehrten Anti-Schaf-IgG-Produktion führen. In der vorliegenden Studie zeigten zwar beide Genotypen eine relevante Menge an autologer Antikörperproduktion, jedoch ergab sich kein Unterschied zwischen WT- und A20 +/- Mäusen in Bezug auf die Anti-Schaf-IgG-Konzentration im Serum an Tag 14 der autologen NTN (Abbildung 28A). Ergänzend wurde die adaptive humorale Immunantwort mittels immunhistochemischem Nachweis von abgelagerten IgG im Glomerulus untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied im

Ausmaß der glomerulären Ablagerung zwischen WT- und A20 +/- Mäusen (Abbildung 28B). Des Weiteren wurden T-Zellen der Milz bezüglich ihres Aktivierungsgrades mittels Splenozyten-Isolation am Tag 14 der autologen NTN untersucht. Hierfür wurden isolierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen anhand des T-Zell-Aktivitätsmarker CD69⁺ durchflusszytometrisch analysiert (siehe Kapitel 2.3.2). Doppelpositive Zellen (CD4⁺/CD69⁺ oder CD8⁺/CD69⁺) wurden als aktivierte T-Zellen gewertet. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Anteil aktivierter T-Zellen zwischen WT- und A20 +/- Mäusen (Abbildung 28C). Am ehesten zeigte sich eine nicht signifikante Tendenz zu einer verminderten T-Zellaktivierung in den Milzen von A20 +/- Mäusen, im Gegensatz zur verschlechterten Nephritis in diesen Tieren. In der Zusammenschau zeigen diese Ergebnisse eine verstärkte lokale Inflammation in den nephritischen Nieren A20-defizienter Mäuse im Vergleich zum WT. Dagegen wird die adaptive systemische Immunreaktion nicht durch die A20-Defizienz verstärkt und trägt somit nicht zu dem verschlechterten renalen Phänotyp in A20 +/- Mäusen bei.

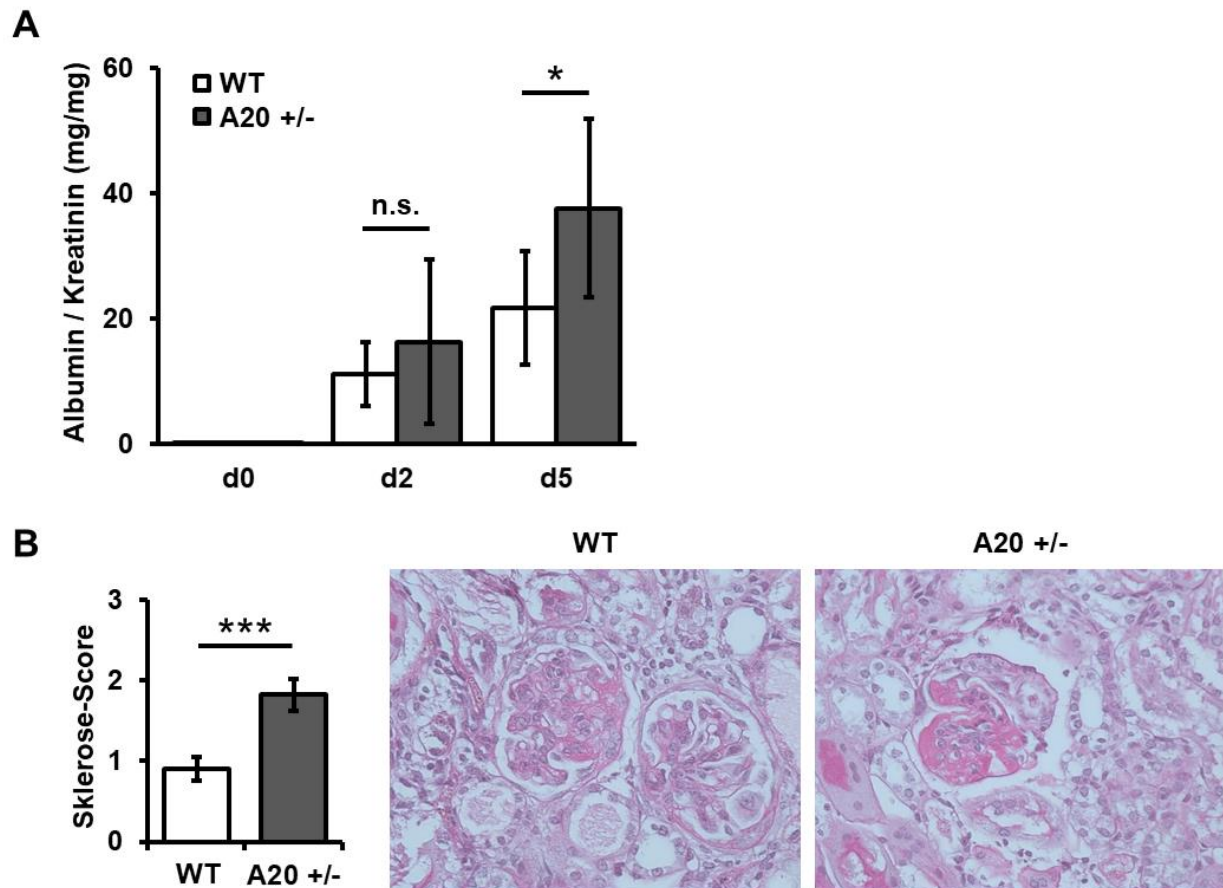


Abbildung 26: Funktioneller und struktureller glomerulärer Schaden in WT- und A20 +/- Mäusen im Verlauf der heterologen NTN.

(A) Albuminurie in mg/mg Kreatinin aus Spontanurinproben an Tag 0, Tag 2 und Tag 5 der heterologen NTN (B) PAS-Färbung der Niere zur Quantifizierung der Glomerulosklerose mittels Sklerose-Score nach El Nahas an Tag 5 der heterologen NTN (N=7-8 je Gruppe, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

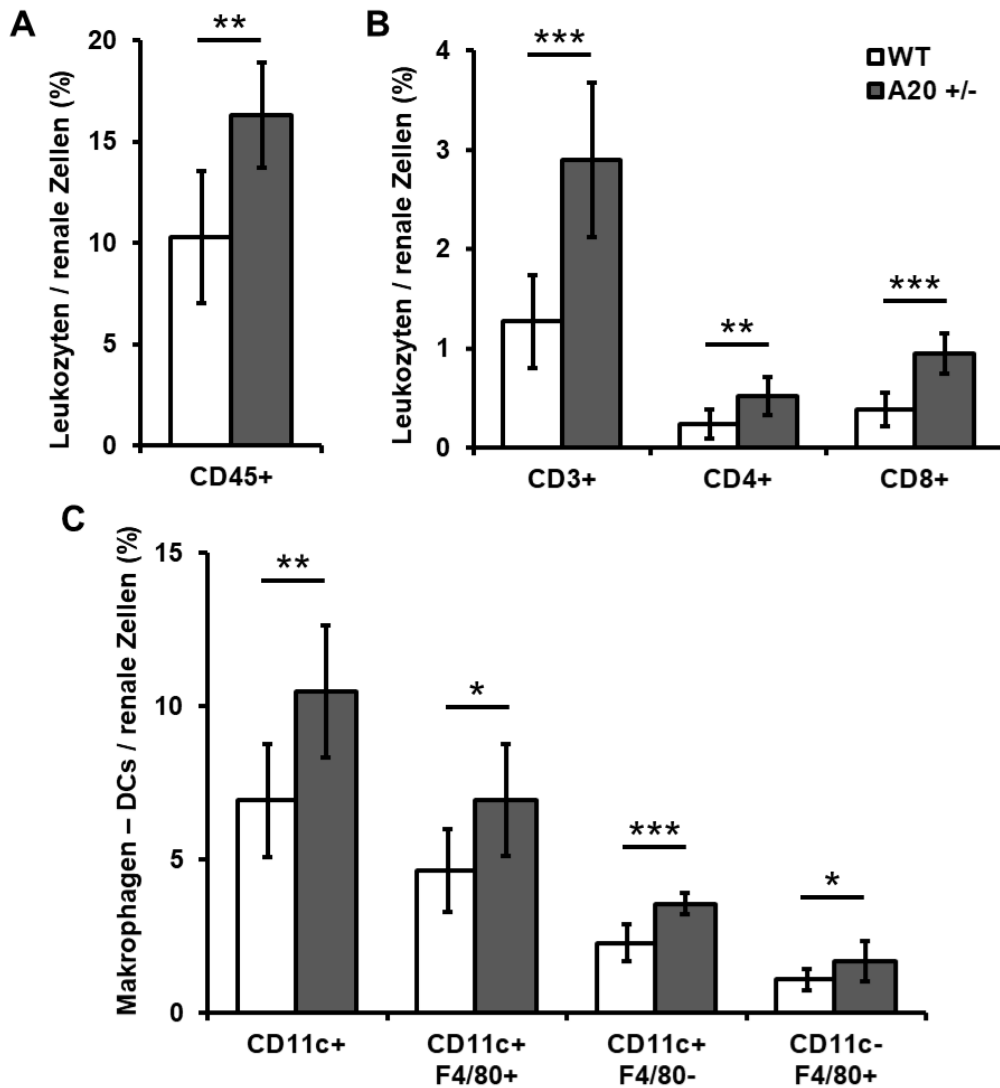


Abbildung 27: Renale Leukozyteninfiltration in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 5 der heterologen NTN (Durchflusszytometrie).

Durchflusszytometrische Messung inflammatorischer Zellen im Nierengewebe an Tag 5 der heterologen NTN. (A) Anteil an CD45⁺ Leukozyten an allen renalen Zellen in %. (B) Anteil an CD3⁺ Lymphozyten an allen renalen Zellen in %. Zudem gezeigt ist die Differenzierung in CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten. (C) Anteil an CD11c⁺/F4/80⁺ Makrophagen und CD11c⁺ DCs an allen renalen Zellen in %. Zudem gezeigt ist die Differenzierung in CD11c⁺/F4/80⁺ und CD11c⁺/F4/80⁻ DCs. (n=7-8 je Gruppe, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

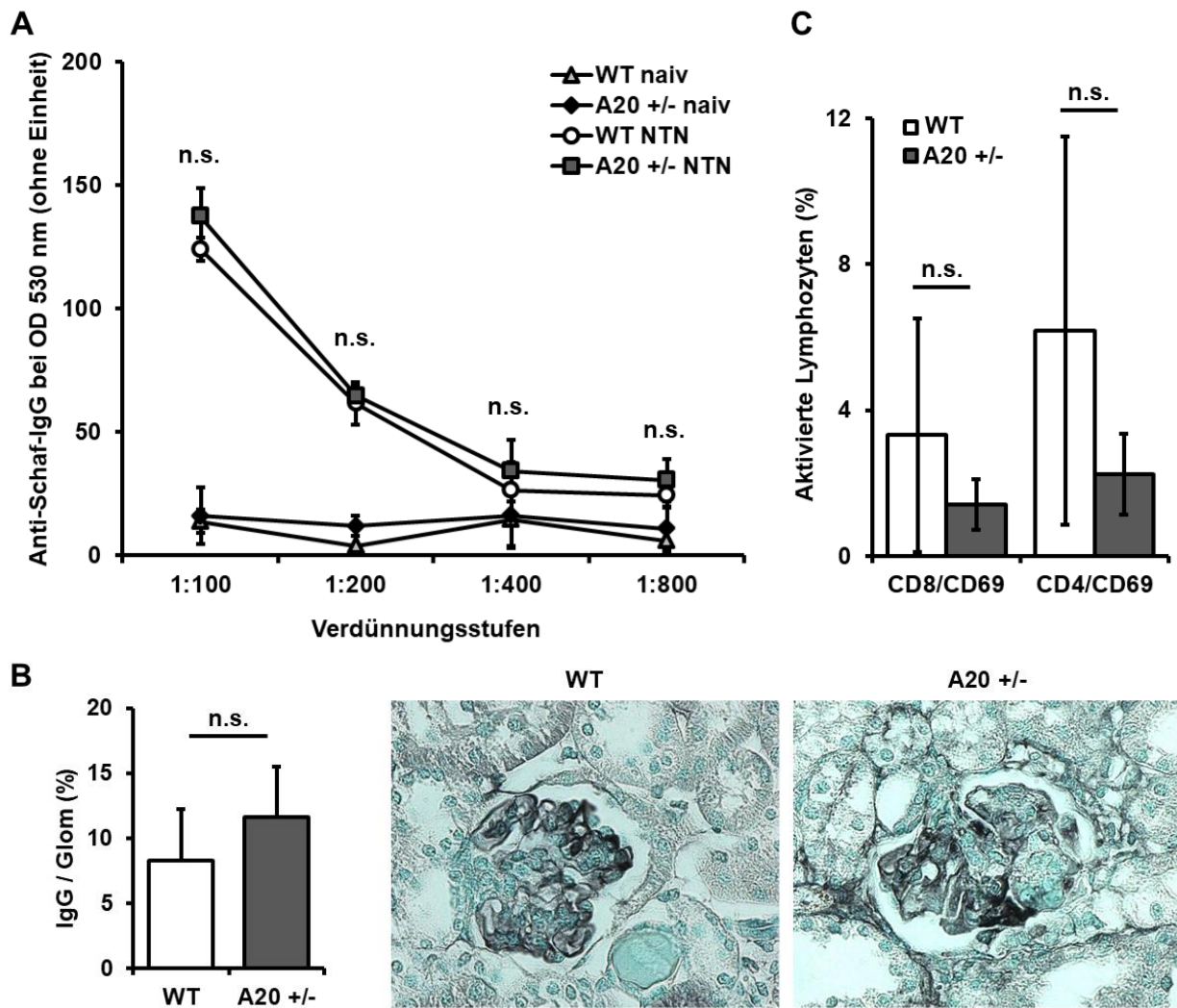


Abbildung 28: Systemische Inflammation nach NTN-Induktion in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 14.

(A) Anti-Schaf-IgG im Serum, semiquantifiziert anhand der optischen Dichte (530 nm). Es sind Titer für verschiedene Verdünnungsstufen gezeigt. (B) Anteil IgG-Färbung pro Glomerulus in % (400x Vergrößerung). (C) CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozytenaktivität in der Milz, gemessen anhand des Oberflächenmarkers CD69. (n=6 je Gruppe, n.s. p>0,05)

3.9 Ausmaß des renalen Zelltodes in vivo

Neben dem Ausmaß der renalen Entzündungsreaktion trägt der Untergang renaler Parenchymzellen im Verlauf der NTN zum Nierenschaden bei. An diesem Prozess der Nekroinflammation sind Formen des regulierten Zelltods wie Apoptose oder Nekroptose entscheidend beteiligt [111]. Da A20 nicht nur entzündungsbegrenzend, sondern durch vermehrten Abbau des intrazellulären RIP1-Moleküls und durch Hemmung der RIP1-RIP3-Komplexformation auch Nekroptose-inhibierend wirkt [110, 131], wurde das Ausmaß von Zelltod in WT- und A20 +/- Mäusen am Tag 14 des autologen NTN-Modells untersucht. Zelltod wurde mittels TUNEL-Immunfluoreszenzfärbung der nephritischen Nieren quantifiziert (siehe Kapitel 2.7.3). Dabei zeigten A20 +/- Nieren mehr TUNEL⁺ Zellen pro GF im Vergleich zu WT-Mäusen (Abbildung 29). Insgesamt zeigten sich die meisten TUNEL⁺ Zellen im Tubulointerstitium und bei beiden Genotypen nur wenige in den Glomeruli lokalisiert, jedoch war auch die Anzahl der TUNEL⁺ Zellen in den A20-defizienten Glomeruli signifikant größer als in den WT-Glomeruli (Abbildung 29). Mittels WT1/TUNEL-Doppelfärbung wurde zudem das Ausmaß an Zelltod in glomerulären Zellen, insbesondere WT1-positiven Podozyten, untersucht. Hier zeigte sich, dass in A20 +/- Nieren signifikant mehr WT1⁺/TUNEL⁺ glomeruläre Zellen vorlagen als im WT, was auf einen vermehrten Zelltod in A20 +/- Podozyten am Tag 14 der NTN hinweist (Abbildung 29). Diese Ergebnisse zeigen, dass vermehrter Zelltod eine Rolle in der Ausbildung des A20-defizienten Phänotyps spielt. Allerdings blieb zu klären, inwieweit Formen des regulierten Zelltods wie z.B. Apoptose oder Nekroptose in A20-defizienten Mäusen mit NTN verstärkt ablaufen. Daher

wurden zur weiteren Untersuchung Proteinanalysen mittels Western Blot am nephritischen Nierengewebe durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.3). Hier zeigte sich überraschenderweise eine signifikant verminderte renale Proteinexpression des Apoptosemarkers Cleaved Caspase-3 in den A20 +/- Mäusen am Tag 14 der NTN im Vergleich zum WT. Diese Daten wiesen darauf hin, dass nicht eine vermehrte Apoptose verantwortlich für die verstärkte TUNEL-Positivität in den A20 +/- Mäusen ist. Passend hierfür war wie bei verminderter RIP1-degradierender Aktivität bei A20-Defizienz zu erwarten das pronekroptotische Protein RIP1 signifikant in den Nieren der A20-defizienten Mäuse erhöht (Abbildung 30). Hingegen war das pronekroptotische Protein RIP3 in den A20 +/- Nieren erniedrigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass A20-Defizienz nicht-apoptotischen TUNEL-positiven regulierten Zelltod begünstigt. Der vermehrte renale RIP1-Gehalt in A20-defizienten Nieren kann die vermehrt ablaufende Nekroptose in A20 +/- Nieren begünstigen, während der RIP3-Verlust möglicherweise Zeichen des Verbrauchs bei ablaufender Nekroptose darstellt. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass bei A20-Defizienz der Verlauf der NTN nicht nur durch eine verstärkte renale Entzündungsreaktion, sondern auch durch vermehrten renalen Zelltod, z.B. in Form vermehrt ablaufender Nekroptose verschlechtert wird.

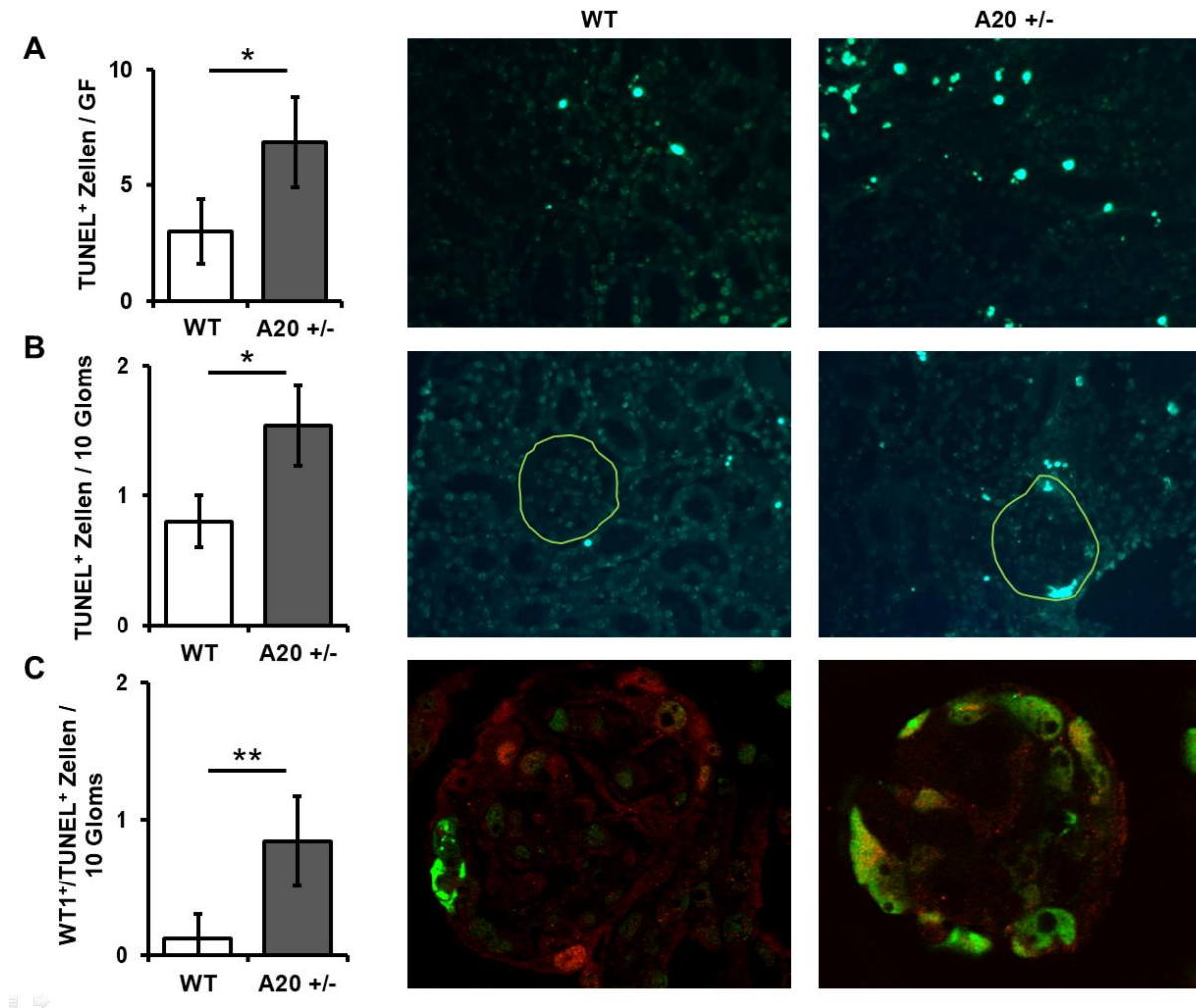


Abbildung 29: Ausmaß des regulierten Zelltods in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 14 nach NTN-Induktion (Immunfluoreszenzfärbung).

(A) TUNEL-Färbung zur Quantifizierung von reguliertem Zelltod im Nierengewebe (200x Vergrößerung). Dabei entsprechen die grün-fluoreszierenden Areale einer sterbenden Zelle. (B) TUNEL-Färbung zur Quantifizierung von reguliertem Zelltod in den Glomeruli (Kontur mit grüner Linie verdeutlicht). (C) WT1/TUNEL-Doppelfärbung zur Quantifizierung von reguliertem Zelltod in glomerulären Zellen, insbesondere vollentwickelten Podozyten. (n=3-5 je Gruppe, * p<0,05, ** p<0,01)

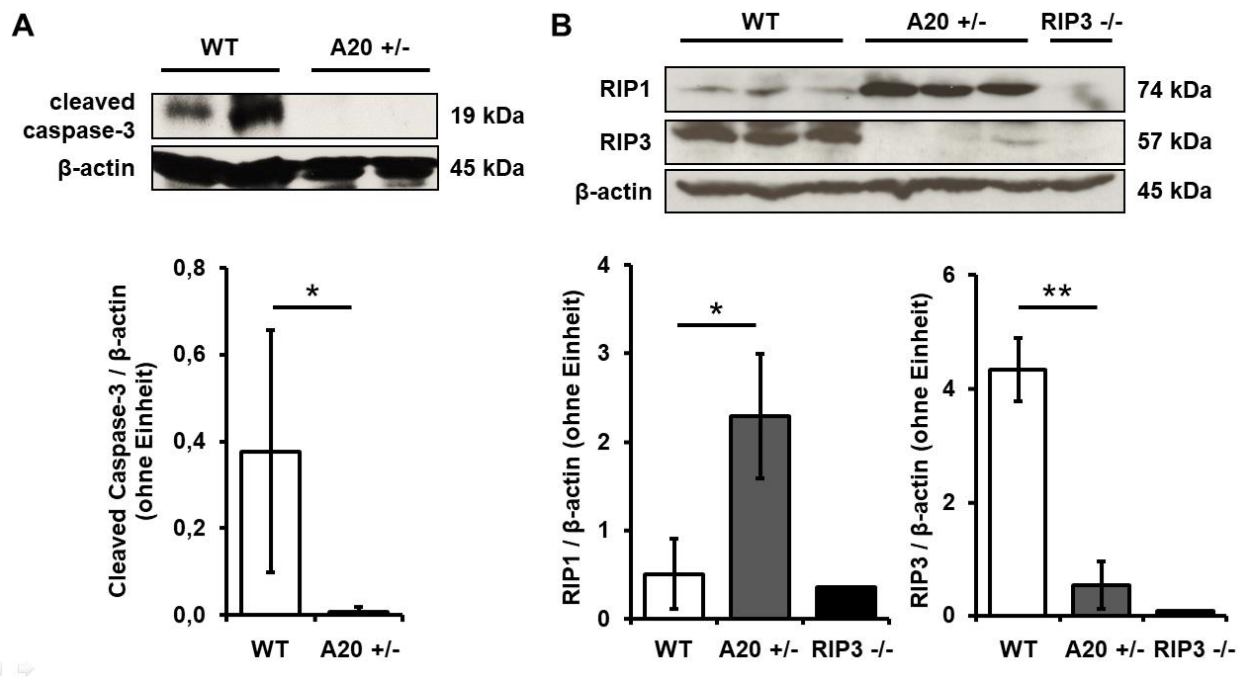


Abbildung 30: Ausmaß des regulierten Zelltods im Nierengewebe in WT- und A20 +/- Mäusen an Tag 14 nach NTN-Induktion (Western Blot).

(A) Proteinquantifizierung mittels Western Blot für Cleaved Caspase-3, normalisiert mit β -actin. (B) Proteinquantifizierung mittels Westernblot für RIP1 und RIP3, normalisiert mit β -actin. In der rechten Spur ist Nierengewebe einer RIP3 -/- Maus aufgetragen als Negativkontrolle der RIP3-Bande bei 57 kDa. (n=2-3 je Gruppe, * p<0,05, ** p<0,01)

3.10 Charakteristika des glomerulären Zelltods in vitro

In ergänzenden in vitro-Untersuchungen an einer immortalisierten murinen WT-Mesangialzelllinie (mMC) [132] wurde Zelltod durch Inkubation mit 300 ng/ml TNF und dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD induziert. Zur Nekroptose-Inhibition wurde der spezifische RIP1-Inhibitor Necrostatin-1s (Nec-1s) verwendet. Im MTT-Assay (siehe Kapitel 2.6.3) führte Nec-1s zu einem signifikant höherem Zellüberleben, was den durch TNF und Z-VAD

induzierten Zelltod als Nekroptose charakterisiert (Abbildung 31). Zur weiteren Untersuchung des Nekroptose-Signalweges in den TNF-stimulierten mMCs wurden Proteinanalysen für RIP1 und RIP3 mittels Western Blot durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.3). Hier zeigte sich ein Verlust an RIP1 und RIP3 in der Nekroptose-induzierten Gruppe (TNF + Z-VAD). Hingegen lag die Proteinexpression von RIP1 und RIP3 in der Nekroptose-blockierten Gruppe (TNF α + Z-VAD + Nec-1s) höher und fast auf dem Niveau der Kontrollzellen (Abbildung 31). In der Zusammenschau zeigte sich in diesen in vitro-Experimenten, analog zu den in vivo-Ergebnissen in A20 +/- Nieren, ein RIP3-Verlust bei verstärkt ablaufender Nekroptose. RIP1 hingegen zeigte sich in vitro nach Nekroptose-Induktion ebenfalls erniedrigt, während es in vivo in A20 +/- Nieren übereinstimmend mit der RIP1-degradierenden Funktion von A20 vermehrt nachweisbar war. Zusammenfassend weisen diese in vivo- und in vitro-Daten darauf hin, dass A20-Defizienz vermehrten renalen Schaden im Verlauf der NTN durch eine verstärkte Entzündungsreaktion, aber auch vermehrte renale Nekroptose bewirkt.

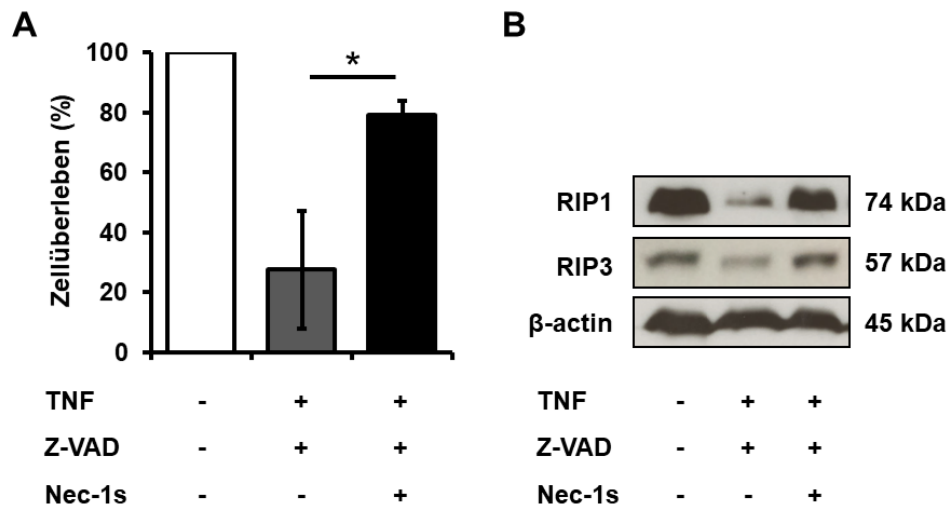


Abbildung 31: Zelltodinduktion in mMCs in vitro.

Zelltodinduktion durch Stimulation mit TNF (300 ng/ml) und dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD in mMCs in vitro. Zusätzliche Inkubation mit Nec-1s zur Nekroptose-Inhibition. Als Kontrolle wurden unbehandelte mMCs verwendet. (A) MTT-Assay zur Quantifizierung des Zellüberlebens, dargestellt in % im Vergleich der unbehandelten Kontrollgruppe. (n=3, * $p<0,05$) (B) Westernblot für RIP1 und RIP3 und β -actin als Ladekontrolle.

4 Diskussion

4.1 Nierenfunktion und Schaden bei A20-Defizienz

Das antiinflammatorische Protein A20 besitzt eine Schlüsselfunktion für die Inhibition von NF- κ B-Signalwegen. Bei Funktionsverlust ist die Entstehung diverser Autoimmunerkrankungen und inflammatorischer Prozesse begünstigt [45]. Im Menschen wurde beschrieben, dass autoinflammatorische Erkrankungen, einhergehend mit Insulin-abhängigen Diabetes, Zytopenie, Hepatitis, Enteropathie und interstitieller Lungenerkrankung, durch eine heterozygote A20-Loss-of-Function-Mutation hervorgerufen werden können [133-135]. Auch können Polymorphismen im A20-Gen die Ausbildung eines systemischen Lupus erythematodes begünstigen [57, 136]. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass eine heterozygote Deletion im A20-Gen der Maus ausreicht, um die Ausprägung einer Immunkomplex-GN zu verstärken.

Die erarbeiteten Daten weisen nach, dass im Verlauf der autologen NTN eine Verschlechterung der Nierenfunktionsparameter in WT- und A20 +/- Mäusen auftritt, jedoch die Erhöhung von Serumkreatinin, Serumharnstoff und Serumcholesterin sowie das Ausmaß der Albuminurie in den heterozygoten A20-defizienten Mäusen signifikant verstärkt ist (Abbildung 17 und Abbildung 18). Es bestand die Konstellation an laborchemischen Veränderungen, die auf einen ausgedehnten Schaden an der glomerulären Filtrationsbarriere hinwiesen. Passend zur Verschlechterung der funktionellen Parameter konnte histologisch in den A20 +/- Mäusen in der PAS-Färbung ein vermehrter glomerulärer Schaden im Sinne einer glomerulären Sklerose

nachgewiesen werden (Abbildung 19). Dieser strukturelle Umbau des Nierengewebes ist als Zeichen des chronischen Nierenschadens zu werten [137]. Zudem konnte durch den Nachweis eines verstärkten Podozytenverlusts in den A20 +/- Mäusen mittels der WT1/Nephrin-Immunfluoreszenzdoppelfärbung ein stärkerer struktureller Schaden der glomerulären Filtrationsbarriere aufgezeigt werden (Abbildung 19). Des Weiteren zeigten sich die einzelnen Podozyten in den A20 +/- Tieren Nephrin-depletiert. Dies spricht für einen Funktionsverlust der noch vorhandenen Podozyten, da Nephrin ein integraler Bestandteil der Schlitzmembran ist [130]. Somit zeigte sich in den A20 +/- Mäusen im Verlauf der NTN eine verstärkte glomeruläre Schädigung mit vermehrter Glomerulosklerose und ausgeprägtem Podozytenverlust, einhergehend mit einer verstärkten Albuminurie.

Wie bei der chronischen Immunkomplex-GN des Menschen zeigte sich nach autologer NTN-Induktion nicht nur Schaden in den Glomeruli, sondern auch eine sekundäre Schädigung im Tubulointerstitium. Glomerulärer Schaden verursacht vermehrte Albuminurie und Chemokinausschüttung, was zur Stimulation von Tubulusepithelzellen und zur weiteren Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren führt [138]. Dies resultiert in vermehrter tubulointerstitieller Leukozyteninfiltration, Fibroblastenproliferation und Matrixvermehrung und infolgedessen zur Volumenzunahme des Interstitiums. Die räumliche Verdrängung des peritubulären Kapillarnetzes im Nierengewebe ruft letztendlich ischämischen Schaden hervor, ein Reiz, der zu weiterer Chemokinausschüttung führt und somit die Tubulusschädigung weiter vorantreibt [138]. Passend hierzu zeigten A20-defiziente Mäuse neben der vermehrten glomerulären Schädigung auch signifikant vermehrten tubulären

Schaden im Vergleich zum WT (Abbildung 20). Der verstärkte glomeruläre Schaden in A20 +/- Mäusen mit vermehrter Glomerulosklerose und Proteinurie könnte somit direkt über verstärkten Proteinurie-vermittelten Tubulusstress und tubulointerstitielle Ischämie zum vermehrten sekundären Tubulusschaden beitragen, wie er histologisch durch hyaline intratubuläre Zylinder und tubulärer Atrophie nachweisbar war.

In der Zusammenschau zeigte sich, dass A20-Defizienz zu einem verstärkten glomerulären Schaden mit verschlechterter Proteinurie und Nierenfunktion, sowie vermehrtem tubulären Schaden im Modell der autologen NTN führt. Im Umkehrschluss ist davon auszugehen, dass A20-Expression die renale Schädigung begrenzt. Übereinstimmend hierzu konnte im renalen Ischämie/Reperfusions-Modell der Ratte durch die Überexpression von A20 nach Adenovirus-Transfektion eine Verringerung des Nierenschadens beobachtet werden [67]. Außerdem konnte in diesem Modell gezeigt werden, dass A20 durch seine protektive Funktion die physiologische Balance zwischen Pro- und Antiinflammation nach Ischämie/Reperfusions-Stress aufrecht erhält [67]. Analog hierzu schützt A20 vor Podozytenschaden in der Lupus-Nephritis, indem das deubiquitinierende Protein Ubiquitin-Carboxy-Terminal-Hydrolase-L1 durch A20-vermittelte Inhibierung des NF- κ B-Signalwegs herunterreguliert wird [139]. Im MRL/lpr-Lupusnephritis-Modell der Maus konnte zudem gezeigt werden, dass renale NF- κ B-vermittelte Entzündung mit einer reduzierten A20-Expression einhergeht und A20-defiziente Podozyten anfälliger gegenüber TNF-induziertem Schaden sind [140]. Inwieweit der protektiven Rolle von A20 eine Begrenzung der renalen Inflammation bei der Immunkomplex GN zugrunde liegt wird in den folgenden Kapiteln diskutiert. Ferner weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass A20 das Ausmaß von

programmiertem Zelltod im Verlauf der Immunkomplex-GN begrenzt. Auch hierauf wird in späteren Kapiteln eingegangen.

4.2 Renale Inflammation bei A20-Defizienz

Die Charakterisierung von Mäusen mit heterozygoter A20-Depletion im Verlauf der autologen NTN ermöglichte entzündungsbegrenzende Funktionen des A20-Proteins bei der Immunkomplex-GN zu untersuchen. Es trat eine signifikant stärkere renale Leukozyteninfiltration und eine vermehrte Entzündungsreaktion in den A20 +/- Mäusen im Vergleich zum WT auf. Diese korrelierte mit einer verstärkten Nierenfunktionsverschlechterung und vergrößertem renalen Schaden in den A20 +/- Mäusen (siehe Kapitel 4.1). Die verstärkte Infiltration inflammatorischer Zellen in das Nierengewebe wiederum korrelierte mit der vermehrten renalen Expression zahlreicher Entzündungsmediatoren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit A20-Defizienz am Tag 14 der autologen NTN eine erhöhte renale Expression proinflammatorischer Chemokine, Zytokine und anderer Mediatoren aufwiesen.

4.2.1 CCL2-induzierte renale Leukozyteninfiltration bei A20-Defizienz

Die Expression des proinflammatorischen Chemokins CCL2 war in A20-defizienten Mäusen am Tag 14 der NTN im Vergleich zum WT erhöht (Abbildung 23). CCL2 ist ein durch NF- κ B induzierbares Chemokin, welches die

Rekrutierung einer Reihe unterschiedlicher Leukozytenpopulationen in entzündetes Gewebe vermittelt [141, 142]. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in A20 +/- Mäusen am Tag 14 der NTN signifikant mehr Leukozyten in die Niere infiltrierten als im WT (Abbildung 21 und Abbildung 22). Dies galt sowohl für CD3⁺ T-Lymphozyten als auch für Makrophagen und DCs. Somit liegt es nahe, dass CCL2 auch im Modell der NTN bei A20-Defizienz eine Rolle in der Chemotaxis von Leukozyten spielt. Analog zu den Daten der vorliegenden Studie konnte bereits im Rattenmodell der NTN gezeigt werden, dass glomerulär infiltrierende Monozyten und Endothelzellen verstärkt Chemokine und Zytokine wie CCL2 und IL-1 β am Tag 6 der NTN exprimieren und somit zur Orchestrierung der inflammatorischen Antwort beitragen [143]. Entsprechend wurde auch eine wichtige Rolle für CCL2 in der inflammatorischen Phase der rapid progressiven GN beschrieben [141]. Zudem wurde gezeigt, dass die Monozyteninfiltration in das Nierengewebe und deren Aktivierung zur Schadensentstehung der NTN beitragen [143]. Dabei ist CCL2 nicht nur ein wichtiges Chemokin für die Zellinfiltration von Monozyten sondern auch für Lymphozyten [144, 145]. Des Weiteren haben Vorarbeiten gezeigt, dass CCL2-depletierte Mäuse weniger Makrophagen-abhängigen tubulären Schaden nach NTN-Induktion zeigen als WT-Tiere, wobei sich in der gleichen Studie der glomeruläre Schaden als CCL2 unabhängig erwies [146]. Weitere Studien haben zeigen können, dass CCL2 eine wichtige Rolle für die Infiltration von Makrophagen in den Glomerulus und somit für die Pathogenese der GN hat [147, 148]. Eine übermäßige CCL2-Expression spielt nicht nur eine Rolle in der Ausbildung einer GN, sondern wird mit der Entstehung unterschiedlicher Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass CCL2 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der

rheumatoiden Arthritis spielt [149]. Die vorliegende Studie zeigt, dass Defizienz des NF- κ B-Inhibitors A20 unter inflammatorischen Bedingungen zu einer renalen Überexpression von CCL2 führt. Dabei konnte ergänzend zu den in vivo-Versuchen auch in vitro gezeigt werden, dass sowohl isolierte Glomeruli als auch tubulointerstitielle Zellen von A20-defizienten Mäusen nach TNF-Gabe vermehrt CCL2 sezernieren (Abbildung 24). Dies korrelierte mit einer tendenziell verstärkten CCL2-mRNA-Expression in TNF-stimulierten A20-defizienten Glomeruli sowie signifikant vermehrter Expression im Tubulointerstitium (Abbildung 25). Somit ist von folgendem Mechanismus auszugehen: Primär führt die renale Immunkomplexablagerung nach Injektion des nephrotoxischen Serums zur lokalen Schädigung mit verstärkter CCL2-Expression in renalen Zellen und residenten Leukozyten der A20-defizienten Mäuse. Anschließend vermittelt CCL2 durch seine chemotaktische Funktion die vermehrte Infiltration von CD3⁺ T-Zellen, Makrophagen und DCs in das Nierengewebe. Aufgrund der hohen Leukozytenzahl im Nierengewebe steigt die CCL2-Expression weiter an, was zu einer zusätzlichen Leukozyteninfiltration und Leukozytenaktivierung führt. Die verstärkte Immunantwort wiederum führt zu einer übermäßigen Zelldestruktion mit anschließender Fibrosierung im Sinne einer progredienten GN mit anschließender Sklerosierung, was mit einem zunehmenden renalen Funktionsverlust einhergeht (siehe Kapitel 4.1). Dieser Mechanismus wird durch mangelnde NF- κ B-Inhibition in A20-defizienten Mäusen unzureichend gehemmt.

4.2.2 Expression weiterer Chemokine bei A20-Defizienz

Auch die Expression anderer Chemokine wie CCL5, CXCL5 und CXCL9 war in A20 +/- Mäusen am Tag 14 der autologen NTN verstärkt im Vergleich zum WT (Abbildung 23).

Ähnlich wie CCL2 ist CCL5 ein durch NF- κ B induzierbares Chemokin, welches eine wichtige Rolle in der inflammatorischen Phase einer rapid progressiven GN spielt [141]. CCL5 wird unter anderem von CD8⁺ T-Zellen, aber auch in Podozyten nach TNF-Induktion exprimiert [150, 151]. In der vorliegenden Arbeit war die CCL5-mRNA-Expression in vivo im renalen Gewebe am Tag 14 der NTN in A20-defizienten Tieren im Vergleich zum WT erhöht. In vitro zeigte sich jedoch die CCL5-Sekretion, sowohl in den Glomeruli als auch im Tubulointerstitium, bei beiden Genotypen nach Stimulation mit TNF gleichstark vermehrt, allerdings bei glomerulär gesteigerter CCL5-mRNA-Expression in A20 +/- Mäusen. Diese Daten legen nahe, dass eine vermehrte Expression von CCL5 insbesondere in tubulointerstitiellen Zellen eine untergeordnete Rolle in der Entstehung des A20-defizienten Phänotyps spielt, sondern vielmehr im Verlauf der NTN renal infiltrierte Leukozyten für die erhöhte CCL5-Expression verantwortlich sind. Entsprechend wurde mittels Durchflusszytometrie und Histologie eine signifikant verstärkte Infiltration von Leukozyten, einschließlich der typischerweise CCL5-exprimierenden CD8⁺ Lymphozyten am Tag 14 der NTN in A20-defiziente Mäusen im Vergleich zum WT nachgewiesen (Abbildung 21 und Abbildung 22).

Auch die renale mRNA-Expression der Chemokine CXCL5 und CXCL9 war in A20-defizienten Mäusen mit NTN erhöht. CXCL5 vermittelt die Infiltration von Neutrophilen [152], CXCL9 wird von Makrophagen sezerniert und führt zur

T-Lymphozyten-Aktivierung [153]. Korrelierend hierzu zeigte sich in A20-defizienten Mäusen am Tag 14 der autologen NTN sowohl eine verstärkte renale Infiltration von Makrophagen als auch CD3⁺ T-Lymphozyten (Abbildung 21 und Abbildung 22). Eine Erhöhung der CXCL5-Expression wird direkt durch TNF und IL-1 β stimuliert [154]. Auch in der vorliegenden Arbeit war die renale Expression von TNF in A20 +/- Mäusen am Tag 14 der NTN signifikant erhöht. Die Expression von IL-1 β hingegen zeigte keinen signifikanten Unterschied, war jedoch tendenziell ebenfalls in A20-defizienten Mäusen erhöht. Diese Daten legen nahe, dass CXCL5 und CXCL9 zur Orchestrierung der Leukozyteninfiltration bei A20-Defizienz im Modell der NTN beitragen. Analog hierzu konnte eine Rolle von CXCL5 im Modell der MPO-ANCA-Vaskulitis der Maus beschrieben werden [155]. Aber auch in anderen Organsystemen führt eine verstärkte CXCL5-Expression zur vermehrten Leukozyteninfiltration, beispielsweise wird CXCL5 eine wichtige Rolle für die Neutrophilen-Inflammation in der Lungentuberkulose zugeschrieben [152].

4.2.3 Expression weiterer pro- und antiinflammatorischer Mediatoren bei A20-Defizienz

Analog zu der verstärkten renalen Chemokinexpression in A20 +/- Mäusen am Tag 14 der NTN wurden auch die proinflammatorischen Mediatoren TNF und iNOS signifikant vermehrt im Vergleich zum WT exprimiert. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und IL-6 fielen ebenfalls mit einer

tendenziellen Erhöhung auf, das antiinflammatorische Zytokin IL-10 war wiederum signifikant vermehrt exprimiert (Abbildung 23).

Durch die Bindung von TNF an den TNF-Rezeptor-1 wird die Bildung des TNF-Rezeptor-Komplexes eingeleitet und der NF- κ B-Signalweg aktiviert [70]. Die Expression von TNF wird wiederum NF- κ B-abhängig induziert, jedoch inhibiert A20 TNF-abhängige NF- κ B-Signalwege und führt mittels vielfältiger Proteinubiquitination von Schlüsselproteinen zur Terminierung der NF- κ B-Aktivierung [42]. Somit könnte die verstärkte TNF-Expression in A20-defizienten Mäusen am Tag 14 der NTN eine direkte Folge der fehlenden NF- κ B-inhibierenden Wirkung von A20 sein. Die proinflammatorische Rolle von TNF in der Schadensentstehung diverser Nierenerkrankungen und spezifisch für einzelne Nierenkompartimente wurde bereits in vielen Vorarbeiten untersucht, beispielsweise für die IgA-Nephropathie, für die membranöse Glomerulonephritis sowie in Tubulusepithelzellen [156-158]. Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass die Ausschüttung von TNF durch T-Lymphozyten NTN-induzierten Nierenschaden und Fibrosierung durch Inhibition renaler Th17-Helferzellen und der von Ihnen vermittelten Neutrophileninfiltration hemmt [159]. In der vorliegenden Arbeit ist aufgrund der gesteigerten Inflammation und renalen Schädigung in A20-defizienten Mäusen am Tag 14 der NTN im Vergleich zum WT von einer gesteigerten Proinflammation durch erhöhte TNF-Spiegel auszugehen. Analog hierzu war die zytotoxische iNOS ebenfalls in A20-defizienten Mäusen vermehrt exprimiert, deren Bildung in Makrophagen durch TNF stimuliert wird [160]. Entsprechend dieser Daten konnte bereits in einer anderen in vivo-Studie gezeigt werden, dass die iNOS-Expression in der Immunkomplex-GN im Rattenmodell induziert wird [161].

Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und IL-6 fielen mit einer tendenziell, jedoch nicht signifikant erhöhten Expression in A20-defizienten Mäusen am Tag 14 der NTN auf (Abbildung 23). In Vorarbeiten konnte in A20-defizienten Makrophagen gezeigt werden, dass A20 die Ubiquitinierung von pro-IL-1 β und dessen Bindung an RIP3 stört, was zu einer gebremsten Aktivität des NLRP3-Inflammasom führt [81]. Zudem ist gezeigt worden, dass A20 die TNF-induzierte IL-6- und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF)-Genexpression inhibiert [77]. Dieser Effekt von A20 ist auf seine inhibierende Wirkung auf NF- κ B-Signalwege zurückzuführen, da sowohl die Expression von IL-6 als auch von GM-CSF NF- κ B-abhängig ist [162, 163]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass A20-defiziente DCs regulatorische T-Zellen inhibieren, jedoch Tumor-infiltrierende zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen aktivieren, welche IL-6 und TNF produzieren [84]. Somit ist davon auszugehen, dass auch im Modell der autologen NTN die vermehrte Expression bzw. Aktivierung von IL-1 β und IL-6 zur verstärkten Inflammation bei A20-Defizienz beitragen können.

Auch die RNA-Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 war in den A20 +/- Mäusen erhöht. IL-10 wurde bereits mehrfach als wichtiger Regulator inflammatorischer Reaktionen in unterschiedlichen Organsystemen beschrieben. IL-10 dämpft beispielsweise Inflammation in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Fibrosierung bei chronischer Niereninsuffizienz [164, 165]. Da IL-10 unter anderem über NF- κ B-Signalwege aktiviert wird [166], ist es plausibel, dass ein Mangel des NF- κ B-Inhibitors A20 auch zu einer verstärkten Expression von IL-10 führt. Allerdings scheint bei gleichzeitig vermehrter Expression proinflammatorischer Mediatoren die

verstärkte IL-10-Expression bei A20-Defizienz die renale Entzündung im Verlauf der NTN nicht begrenzen zu können.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die vermehrte renale Infiltration von T-Zellen, Makrophagen und DCs in A20-defizienten Mäusen nach NTN-Induktion auf eine verstärkte Ausschüttung proinflammatorische Chemokine und Mediatoren beruht. Bei fehlender NF- κ B-Inhibition durch A20 ist anzunehmen, dass NF- κ B-induzierbare proinflammatorische Gene, wie CCL2, CCL5, CXCL5, CXCL9, TNF und iNOS in den renalen Parenchymzellen und/oder infiltrierenden Leukozyten induziert werden. Die infolgedessen vermehrte renale Chemokin-Ausschüttung kann zu vermehrter renaler Leukozyteninfiltration führen. Die renale Akkumulation von Leukozyten führt zur weiteren parakrinen Ausschüttung proinflammatorischer Stimuli, was im Sinne eines Circulus vitiosus wiederum die inflammatorische Antwort in A20-defizienten Mäusen verstärkt. Gleichzeitig werden antiinflammatorische Mediatoren wie IL-10 induziert, um der überschießenden Inflammation entgegenzuwirken. Jedoch führt dies aufgrund der antiinflammatorischen Schlüsselrolle von A20 nicht zu einer Reduzierung der renalen Entzündung. Diese Imbalance inflammatorischer Prozesse führt über die Aktivierung leukozytärer Effektorfunktionen und zytotoxischer Mediatoren zu vermehrtem renalen Gewebeschaden und fibrotischen Umbauprozessen und damit letztendlich zur Nierenfunktionsverschlechterung.

4.3 Bedeutung der lokalen und systemischen Inflammation für den verschlechterten Verlauf der NTN bei A20-Defizienz

Die verstärkte Expression von Entzündungsmediatoren in nephritischen A20 +/- Nieren könnte sowohl durch vermehrte Expression in A20-defizienten renalen Parenchymzellen als auch durch gesteigerte renale Leukozyten-infiltration verursacht werden. Um die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren durch renale Parenchymzellen unabhängig von infiltrierenden Leukozyten gesondert zu untersuchen wurden in vitro-Versuche an isolierten Glomeruli von WT- und A20-defizienten Mäusen durchgeführt. Auch in vitro zeigte sich die Inflammation unabhängig vom Ausmaß der renalen Leukozyteninfiltration in vivo unter A20-defizienten Bedingungen verstärkt. Die Glomeruli von TNF-stimulierten homozygoten A20-Knock-out-Mäusen zeigten eine signifikant erhöhte CCL2-Proteinsekretion und CCL5-Genexpression als WT-Glomeruli. Im Tubulointerstitium zeigte sich die CCL2 und CXCL10-Proteinsekretion und die CCL2-Genexpression erhöht (Abbildung 24 und Abbildung 25). Da diese Chemokine alle durch NF- κ B-induzierbar sind, ist davon auszugehen, dass eine Defizienz des NF- κ B-Inhibitors A20 in renalen Parenchymzellen erheblich zu ihrer erhöhten Expression und Sekretion in nephritischen NTN-Nieren beiträgt und eine verstärkte renale Leukozytenakkumulation auslöst. Ähnliche Beobachtungen konnten in vitro ebenfalls für andere Zellreihen und Organsysteme gezeigt werden. Eine ophthalmologische Studie beispielsweise demonstrierte, dass mittels A20-siRNA eine NF- κ B-Aktivierung in primären humanen retinalen Pigmentepithelzellen in vitro induziert werden kann [167]. Eine weitere Studie zur Untersuchung von A20-Mutationen in Patienten mit

atypischen Inflammationssyndromen konnte zeigen, dass in A20-defizienten menschlichen embryonalen Nierenzellen nach Stimulation mit TNF der inhibitorische Effekt auf die NF- κ B-Reportergenaktivität signifikant reduziert war [134].

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass A20-Defizienz nach Induktion der NTN zu einer verstärkten Expression von Entzündungsmediatoren in renalen Parenchymzellen führen kann, mit nachfolgend verstärkter renaler Leukozyteninfiltration, entzündlicher Gewebeschädigung und renalem Funktionsverlust.

Neben dieser verstärkten renalen Entzündungsreaktion in A20-defizienten Mäusen könnte auch eine verstärkte systemische Immunantwort in der autologen Phase der NTN zu verstärkter renalen Entzündung und Organschädigung beitragen. Eleganterweise können im NTN-Modell die zwei Phasen des Entzündungsprozesses, die heterologe und die autologe Phase getrennt untersucht werden. In der heterologen Phase binden heterologe Antikörper des nephrotoxischen Serums aus dem Spendertier an glomeruläre Strukturen, was eine Immunkomplex-vermittelte lokale Inflammation mit Effektoren des angeborenen Immunsystems auslöst. In der nachfolgenden autologen Phase werden körpereigene autologe Antikörper sowie spezifische Helfer- und Effektor-T-Zellen gebildet, die gegen die Spenderantikörper der heterologen Phase gerichtet sind und die Immunkomplexbildung verstärken sowie eine adaptive Immunantwort im Nierenparenchym induzieren [26]. Somit kann im NTN-Modell sowohl die lokale Entzündungsreaktion als auch die adaptive systemische Immunantwort untersucht werden.

Zur näheren Charakterisierung der entzündungsbegrenzenden Funktion von A20 im Verlauf der NTN wurde daher in WT- und A20 +/- Mäusen ein verkürzter NTN-Versuch über 5 Tage mit Fokus auf die heterologe Phase durchgeführt. Analog zu den Ergebnissen in der autologen NTN zeigte sich auch in dieser heterologen NTN unabhängig vom Ausmaß einer adaptiven systemischen Immunantwort eine signifikant verschlechterte Nephritis in den A20 +/- Tieren im Vergleich zum WT. Dabei zeigte sich durchflusszytometrisch eine vermehrte renale Leukozyteninfiltration, einschließlich T-Lymphozyten, Makrophagen und DCs im Nierengewebe von A20 +/- Mäusen (Abbildung 27). Somit führte A20-Depletion unabhängig von der adaptiven systemischen Immunantwort zu einem verstärkten lokalen Inflamationsprozesses in der Niere.

Um zu charakterisieren, inwieweit neben der verstärkten lokalen Entzündungsreaktion in A20-defizienten Parenchymzellen auch eine gesteigerte systemische Immunantwort zur verschlechterten NTN in A20-defizienten Mäusen beiträgt wurden Messungen der autologen Antikörperproduktion am Tag 14 der autologen NTN durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Menge an autologen murinen Antikörpern gegen das nephrotoxische Schafserum in den A20 +/- und WT-Mäusen gleiche Titer aufwiesen (Abbildung 28). Ergänzend wurde immunhistochemisch die Menge an glomerulär abgelagertem autologen Maus-IgG als Maß für die lokale Immunkomplexbildung untersucht. Hier zeigte sich zwischen A20 +/- und WT-Mäusen am Tag 14 der NTN kein Unterschied (Abbildung 28). Diese Ergebnisse sprechen für eine vergleichbar starke systemische Immunantwort in beiden Genotypen. Zur Bestätigung isolierten wir Splenozyten am Tag 14 der NTN aus WT und A20 +/- Mäuse. Die dabei gewonnen T-Zellen wurden

durchflusszytometrisch auf ihren Aktivitätsgrad untersucht. Es zeigte sich, dass der T-Zell-Aktivitätsmarker CD69 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beider Genotypen nicht signifikant unterschiedlich und tendenziell in A20-defizienten Mäusen eher geringer exprimiert war (Abbildung 28). Diese Daten waren insbesondere überraschend, da A20 eine wichtige Rolle für die Kontrolle der T-Zell-Aktivität zugeschrieben und es sogar in Ruhe in T-Zellen exprimiert wird [45, 52].

Somit wird die T-Zellinfiltration in das Nierengewebe durch A20-Defizienz verstärkt, jedoch die T-Zell-Aktivierung in der Milz und die systemische Antikörperproduktion durch A20-Depletion nicht signifikant beeinflusst. Dagegen zeigten sich in Tnfaip3^{CD19-KO} konditionalen Knock-out-Mäusen mit zellspezifischer A20-Depletion in B-Lymphozyten vermehrte autoreaktive Immunglobuline und glomeruläre Immunglobulindeposition [108]. Auch in vitro konnte gezeigt werden, dass A20-defiziente B-Zellen eine erhöhte Aktivität aufweisen [108, 168, 169]. Diese konträren Ergebnisse sind möglicherweise auf Unterschiede der verwendeten Modelle zurückzuführen. Zum einen wurden stets konditionale B-Zell-spezifische A20-Knock-outs verwandt im Vergleich zu dem globalen heterologen Knock-out-Modell der vorliegenden Studie, zum anderen wurden den Tieren stets systemische Stimuli verabreicht, wie zum Beispiel Schlitzschnecken-Hämocyanin als Immunstimulator oder CpG-Oligonukleotid als Toll-like-Rezeptor-Agonist [108]. Das nephrotoxische Serum hingegen ist ein nierenspezifischer Stimulus [26].

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass A20-Depletion keinen signifikanten Einfluss auf die systemische Immunantwort im NTN-Modell hat und der verschlechterten Nephritis in A20 +/- Mäusen eine

verstärkte renale Entzündungsreaktion mit vermehrter Expression von inflammatorischen Mediatoren im Nierengewebe zugrunde liegt.

4.4 Regulierter Zelltod bei A20-Defizienz

Neben der verstärkten Entzündungsreaktion ließ sich in den A20-defizienten Nieren im Verlauf der NTN auch vermehrter Zelltod nachweisen. Lokale Entzündung kann Formen des regulierten Zelltods induzieren und durch diesen wiederum verstärkt werden, ein Prozess, der als Nekroinflammation bezeichnet wird [131, 170]. Neben der entzündungsbegrenzenden Funktion von A20 könnte das Protein auch direkt das Ausmaß regulierten Zelltods in nephritischen Nieren vermindern.

Der direkte Einfluss von A20 auf Zellüberleben und Zelltod-Signalwege wurde bereits mehrfach untersucht. Zytoprotektion war tatsächlich sogar die erste beschriebene Funktion von A20 [69]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine mittels rekombinierter Adenovirus-Transfektion verstärkte A20-Genexpression in Nager-Inselzellen gegen Zytokin-vermittelter Apoptose schützt [63]. Umgekehrt zeigten konditionale Knock-out-Mäuse für A20 ($A20^{\text{flox/flox}}$ MxCre⁺) spontane myeloische Proliferation, B-Zell-Apoptose, Anämie und eine verstärkte Ausschüttung an proinflammatorischen Zytokinen [171]. Insbesondere wurde die Rolle von A20 im TNF-abhängigen Zelltod untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass A20 Thymozyten vor TNF-induziertem programmierten Zelltod schützt [53]. Entsprechend waren A20-depletierte intestinale Epithelzellen hypersensibel auf TNF-induzierte TUNEL-positive Apoptose [106]. Die Zytoprotektion erreicht A20 in TNF-abhängigen

Apoptose-Signalwegen durch die proteolytische Spaltung von Caspase 2, 3, 6 und 8 sowie der Inhibierung von Bid und Cytochrome c [79].

Auch im Modell der autologen NTN konnte vermehrt renale TUNEL-Positivität in den heterozygot A20-defizienten Mäusen im Vergleich zum WT beobachtet werden (Abbildung 29). Jedoch zeigte sich ein signifikant geringerer Proteingehalt des Apoptose-Markers Cleaved Caspase-3 in den A20 +/- Nieren (Abbildung 30), was trotz vermehrten TUNEL-positivem Zelltod für eine vermindert ablaufende Apoptose in nephritischen A20-defizienten Nieren spricht. Sowohl unter basalen als auch inflammatorischen Bedingungen und im Rahmen der Krebsentstehung konnte in unterschiedlichen Geweben einer NF- κ B-Aktivierung zytoprotektive Apoptose-begrenzende Eigenschaften zugeschrieben werden. Beispielsweise wurde in Oligodendrozyten eine Apoptose-Protektion durch NF- κ B-Aktivierung im Modell der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis beschrieben [172]. Zudem wirkt NF- κ B initial zytoprotektiv bei Ischämie, jedoch aufgrund der übermäßigen Inflammation bei Reperfusion meist destruktiv in Modellen des Ischämie-Reperfusionsschadens [173]. Desweiteren wird nicht nur die mukosale Homöostase im Darm durch die zytoprotektiven Eigenschaften von NF- κ B aufrechtgehalten, sondern auch maligne Erkrankungen wie das Multiple Myelom erst durch chronische NF- κ B-Zielgen-Expression lebensfähig [174, 175]. Dieser Effekt wird durch die Cellular Inhibitor of Apoptosis-Proteine (cIAP)1 und cIAP2 und dem X-linked IAP (XIAP) unterstützt [176]. Dabei aktiviert XIAP im Komplex mit Survivin NF- κ B und inhibiert die Caspasen 3, 7 und 9, was Apoptose verhindert [176-178]. Daher ist es bemerkenswert, dass der NF- κ B-Inhibitor A20 über die oben genannten antiapoptotischen Eigenschaften verfügt. Im Kontext der NF- κ B-abhängigen Zytoprotektion wäre vermehrtes Zellüberleben im

NTN-Modell nach A20-Depletion durchaus plausibel gewesen, erklärt aber zumindest die vermindert ablaufende Apoptose in nephritischen A20 +/- Nieren, was durch den geringeren Nachweis der Cleaved Caspase-3 gezeigt wurde. Zudem führt A20-Defizienz zu vermindertem Abbau von RIP1. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass RIP1 auch unabhängig von einer NF- κ B-Aktivierung intestinale Epithelzellen vor Apoptose schützt [179]. Vermehrte NF- κ B-Aktivierung und erhöhte RIP1-Spiegel könnten daher Mechanismen sein, die in A20-defizienten Nieren Apoptose inhibieren.

Die TUNEL-Färbung ermöglicht es, Zellkerne mit DNA-Strangbrüchen und somit regulierten Zelltod zu detektieren, jedoch ermöglicht es keine spezielle Unterscheidung zwischen regulierten Zelltodformen. Da Cleaved Caspase-3 ein entscheidender Mediator für Apoptose ist, legen die vorliegenden Ergebnisse es nahe, dass A20-Depletion im autologen NTN-Modell zu verminderter Apoptose, aber vermehrtem nicht-apoptotischen regulierten Zelltod führt [180]. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass A20 nicht nur eine Rolle in der Regulation von Apoptose, sondern auch eine Funktion in der negativen Regulation von Nekroptose durch RIP3-Inhibition spielt [110]. Anders als die von Effektor-Caspasen abhängige Apoptose ist Nekroptose ein RIP3-abhängig regulierter Zelltod [90]. Dabei stabilisiert die Phosphorylierung von RIP1 und RIP3 die Assoziation des pronekroptotischen RIP1-RIP3-Komplexes, welcher wiederum durch seine Kinaseaktivität mit Hilfe des Adaptermoleküls MLKL Nekroptose induziert [89]. Es ist wahrscheinlich, dass die Oligomerisation von RIP3, angetrieben durch die RHIM-Domäne von RIP1 und RIP3 zur RIP3 Autoaktivierung führt [181].

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass nach autologer NTN-Induktion die RIP1-Proteinexpression in A20 +/- Mausnieren im Vergleich

zum WT signifikant erhöht ist. Hingegen zeigte sich die renale RIP3-Proteinexpression in den A20-depletierten Mäusen reduziert (Abbildung 30). RIP1 wird direkt durch die Ubiquitin-modulierende Funktion von A20 inhibiert. So führt unter anderem A20-vermittelte K48-Ubiquitinierung zu einer vermehrten proteasomalen Degradation von RIP1 [42, 45], was den vermehrten RIP1-Proteingehalt in nephritischen A20 +/- Nieren gut erklärt. Desweiteren verhindert A20 in humanen embryonalen Nierenzellen die K63-verkettete Ubiquitinierung von RIP3, eine Form der Ubiquitinierung, die Proteine stabilisiert, vor proteasomaler Degradation schützt und die Bildung von Proteinkomplexen zur Signaltransduktion fördert [110, 182]. Diese Form steht im Gegensatz zur K48-verketteten Ubiquitinierung, die durch A20 gefördert wird und eine proteasomale Degradation begünstigt [42, 79]. Es konnte gezeigt werden, dass die K63-verkettete Ubiquitinierung von RIP3 die Formation des RIP1-RIP3-Komplexes in nekroptotischen Zellen begünstigt und A20 diesen Mechanismus wirksam inhibiert [110]. Somit inhibiert A20 über mindestens 2 Mechanismen die Nekroptose, mittels Degradation von RIP1 und mittels Destabilisierung des RIP1-RIP3-Komplexes. Die proteasomale Degradation von RIP3 hingegen ist nach aktuellem Wissensstand nicht durch A20 beeinflusst. Möglicherweise ist der RIP3-Verlust in den A20-depletierten Nieren ein Zeichen des Verbrauchs bei anhaltend gesteigert ablaufender Nekroptose. Tatsächlich zeigen mehrere publizierte Arbeiten zur RIP1/RIP3-induzierten Nekroptose in entsprechenden Western-Blots einen Verbrauch von RIP3 bei prolongiert ablaufender Nekroptose, ohne dass dieses Phänomen in den Publikationen näher diskutiert wird [90, 183, 184].

Zur Bestätigung unserer Ergebnisse aus den Tierversuchen induzierten wir daher Nekroptose in vitro in einer murinen Mesangialzelllinie. Hierbei

zeigte sich eine geringere RIP1- und RIP3-Proteinexpression in der Nekroptose-Gruppe im Vergleich zu der Nekroptose-blockierten Gruppe unter Behandlung mit Necrostatin-1s (Abbildung 31). Somit ergab sich analog zu den in vivo Daten das Bild des RIP3-Verlustes nach Nekroptose-Induktion. Entgegengesetzt zu unseren in vivo Ergebnissen in den A20+/- Nieren war auch RIP1 nach Nekroptose-Induktion erniedrigt. Dieser Unterschied lässt sich auf die Funktion von A20 als RIP1-Inhibitor zurückführen, der in vivo zu einem vermehrten RIP1-Gehalt in A20+/- Nieren im Vergleich zum WT führt. Es ist davon auszugehen, dass in den A20-depletierten Mäusen nach autologer NTN-Induktion weniger proteosomale Degradation von RIP1 stattfindet. Dies ist ein Nekroptose-unabhängiger Prozess, der jedoch in A20-defizienten Nieren Apoptose inhibiert, jedoch zu vermehrter Nekroptose prädisponiert.

Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass A20-Defizienz den Verlauf der NTN sowohl durch verminderte Hemmung von renaler Entzündung als auch durch geringere Blockierung regulierter Nekrose in Form von Nekroptose verschlechtert.

4.5 Limitationen der Arbeit, Ausblick und therapeutische Relevanz

4.5.1 Limitationen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit identifizierte eine protektive Rolle von A20 bei der GN, jedoch bestehen einige Limitationen. Es konnte keine genauere Aussage über

die spezifische Funktion von A20 in verschiedenen Nierenkompartimenten und Zellpopulationen gemacht werden. Zwar erfolgten in vitro-Versuche mit isolierten Glomeruli, um lokale Entzündungsprozesse unabhängig von systemischer Inflammation zu untersuchen, jedoch wären zellspezifische A20-Knockouts notwendig gewesen, um eine gezielte Aussage über die Funktion von A20 in verschiedenen Zellpopulationen, beispielsweise Podozyten oder Mesangialzellen, zu treffen. Speziell zur Untersuchung einer entzündungsbegrenzenden Funktion von A20 in Leukozyten wären in vivo-Versuche mit Mauschimären nach Knochenmarktransplantation sinnvoll gewesen. Des Weiteren ist die Arbeit durch das verwendete Mausmodell limitiert. Die NTN ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung der Immunkomplex-GN [26], jedoch ist die Übertragbarkeit auf andere Nierenerkrankungen begrenzt. Außerdem ist die Translation von Mausmodellen auf den Menschen grundsätzlich limitiert [185]. Auch bleibt unklar, in welchem Maße der verschlechterte NTN-Verlauf in A20-defizienten Mäusen durch vermehrte renale Inflammation oder gesteigerten regulierten Zelltod bedingt ist. Hierfür könnten zukünftig Untersuchungen an transgenen Mäusen ohne RIP1- oder RIP3-Kinaseaktivität weitere Erkenntnisse liefern (siehe Ausblick).

4.5.2 Ausblick

Die erarbeiteten Ergebnisse zeigen, dass selbst der Verlust nur eines A20-Allels unter inflammatorischen Bedingungen aufgrund mangelnder NF- κ B-Inhibition zur verstärkten Expression proinflammatorischer Mediatoren und daraus resultierender vermehrter Leukozyteninfiltration in geschädigtes

Nierengewebe führt, sowie Nekroptose als RIP1/RIP3-abhängigen regulierten Zelltod begünstigt wird. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von A20 auf ablaufende Nekroptose bei der Immunkomplex-GN kann in transgenen Mäusen mit fehlender Kinasaktivität von RIP1 und RIP3 das Modell der autologen NTN im Vergleich zum WT untersucht werden [186, 187]. Bei fehlender RIP1- oder RIP3-Kinaseaktivität wäre verminderte Nekroptose und somit ein verbesserter Verlauf der GN zu erwarten. Entsprechend sollte auch in A20-defizienten Mäusen eine zusätzlich fehlende RIP1- oder RIP3-Kinaseaktivität zu einer Abschwächung des verschlechterten NTN-Phänotyps führen. Zur Untersuchung dieser Hypothesen ist die Einkreuzung der A20-defizienten Mäuse mit Mäusen, die entweder eine fehlende RIP1- oder RIP3- Kinaseaktivität haben, geplant. Diese Untersuchungen könnten die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über den Einfluss von A20 auf die Nekroptose weiter vertiefen.

4.5.3 Therapeutische Relevanz

Die Entstehung unterschiedlicher Autoimmunerkrankungen bei A20-Defizienz konnte bereits mehrfach gezeigt werden [56-60]. Jedoch blieb bisher offen, welche Rolle das antiinflammatorische Protein A20 in der Immunkomplex-GN spielt. Die Daten der vorgelegten Arbeit zeigen, dass A20 den Krankheitsverlauf der GN abschwächt. In nephritischen Nieren inhibiert A20 nicht nur proinflammatorische NF- κ B-Signalwege, sondern vermindert auch regulierter Zelltod vom Typ der Nekroptose. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass A20 vor allem einen Einfluss auf die Ausbildung der lokalen Entzündungsreaktion und weniger auf die Ausbildung der systemischen

Immunantwort hat. Diese Erkenntnisse verbessern nicht nur das Verständnis über die pathophysiologische Rolle von A20 bei entzündlichen Nierenerkrankungen, sondern liefern auch Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Therapiestrategien. So können durch diese murinen Studienergebnisse translational neue A20-basierte Therapieansätze für die Behandlung von Immunkomplex-Glomerulonephritiden des Menschen entwickelt werden. Hierbei erscheint A20 als ein mögliches therapeutisches Zielmolekül zur Suppression von inflammatorischen Prozessen und Zelltod in der Niere. Die vorliegenden Daten sprechen dafür, dass eine lokale, auf die Nieren beschränkte Therapiestrategie ausreichend sein sollte, ohne Beeinflussung der systemischen Immunantwort. Ein solches Therapeutikum könnte bestehende Therapieregime erweitern bzw. ersetzen. Zu lösen bleibt jedoch, wie A20 im Menschen lokal im Nierengewebe effektiv und nebenwirkungsfrei überstimuliert werden kann. Diese Frage in zukünftigen Studien zu beantworten ist für den therapeutischen Einsatz A20-basierter Behandlungsstrategien von herausragender Bedeutung.

5 Literaturverzeichnis

1. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements*. 2013;3(1).
2. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FDR. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 2016;11(7):e0158765.
3. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY-M, Yang C-W. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *The Lancet*. 2013;382(9888):260-72.
4. Collaborators GDaH. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*. 2016;388(10053):1603-58.
5. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, AlMazroa MA, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Abdulhak AB, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FGR, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo J-P, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Memish ZA, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KMV, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh P-H, Yip P, Zabetian A, Zheng Z-J, Lopez AD, Murray CJL. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2012;380(9859):2095-128.

6. Heerspink HJL, Stefánsson BV, Correa-Rotter R, Chertow GM, Greene T, Hou F-F, Mann JFE, McMurray JJV, Lindberg M, Rossing P, Sjöström CD, Toto RD, Langkilde A-M, Wheeler DC. Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(15):1436-46.
7. Wheeler DC, Toto RD, Stefánsson BV, Jongs N, Chertow GM, Greene T, Hou FF, McMurray JJV, Pecoits-Filho R, Correa-Rotter R, Rossing P, Sjöström CD, Umanath K, Langkilde AM, Heerspink HJL. A pre-specified analysis of the DAPA-CKD trial demonstrates the effects of dapagliflozin on major adverse kidney events in patients with IgA nephropathy. *Kidney International*. 2021;100(1):215-24.
8. Hoenig MP, Hladik GA. Overview of Kidney Structure and Function. In: Gilbert SJ, Weiner DE, Bomback AS, Perazella MA, Tonelli M, editors. *National Kidney Foundation's Primer on Kidney Diseases*. 7th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier; 2018. p. 2-18.
9. Schweda F, Segerer K, Wanner C. Anatomie und Physiologie der Niere. In: Lüscher TF, Steffel J, editors. *Niere und Ableitende Harnwege*: Springer; 2014. p. 3-14.
10. Schünke M, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Nierenbecken und Harntransport. *Prometheus LernAtlas - Innere Organe*. 4. Auflage: Thieme; 2015.
11. Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, Massy Z, Wanner C, Anders H-J. Chronic kidney disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3:17088.
12. Inker LA, Levey AS. Assessment of Kidney Function in Acute and Chronic Settings. In: Gilbert SJ, Weiner DE, Bomback AS, Perazella MA, Tonelli M, editors. *National Kidney Foundation's Primer on Kidney Diseases*. 7th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier; 2018. p. 26-32.
13. Lüllmann-Rauch R. Nephron im Nierenparenchym. *Taschenlehrbuch Histologie*: Thieme; 2012.
14. Faller A, Schünke M. Nierenkörperchen. *Der Körper des Menschen*: Thieme; 2008.
15. Renal Corpuscle (Glomerulus): American Urological Association; [Available from: [http://www.auanet.org/education/auauniversity/education-products-and-resources/pathology-for-urologists/normal-histology-and-important-histo-anatomic-structures/kidney-renal-corpuscle-\(glomerulus\)](http://www.auanet.org/education/auauniversity/education-products-and-resources/pathology-for-urologists/normal-histology-and-important-histo-anatomic-structures/kidney-renal-corpuscle-(glomerulus))].
16. Bolton WK, Innes DJ, Sturgill BC, Kaiser DL. T-cells and macrophages in rapidly progressive glomerulonephritis: Clinicopathologic correlations. *Kidney International*. 1987;32(6):869-76.
17. Jennette JC, Falk RJ. Glomerular Clinicopathologic Syndromes. In: Gilbert SJ, Weiner DE, Bomback AS, Perazella MA, Tonelli M, editors. *National Kidney Foundation's Primer on Kidney Diseases*. 7th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier; 2018. p. 162-74.

18. Dad T, Gilbert SJ. Hematuria and Proteinuria. In: Gilbert SJ, Weiner DE, Bomback AS, Perazella MA, Tonelli M, editors. National Kidney Foundation's Primer on Kidney Diseases. 7th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier; 2018. p. 42-50.
19. Floege J, Amann K. Primary glomerulonephritides. The Lancet. 2016;387(10032):2036-48.
20. Bonert M. Rapid progressive GN bei Goodpasture-Syndrom, PAS. In: mag.jpg Cg-vh, editor.: Copyright © 2011 Michael Bonert, MD, FRCPC (<https://commons.wikimedia.org/wiki/User:Nephron/> https://fhs.mcmaster.ca/pathology/contact_us/faculty/faculty_bios/Bonert.html); 2011. p. You are free to share and adapt this image as per the CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode>).
21. Unanue ER, Dixon FJ. Experimental glomerulonephritis: immunologic events and pathogenic mechanisms. Advances in Immunology. 1967;6:1-90.
22. Dixon FJ, Wilson CB. The Development of Immunopathologic Investigation of Kidney Disease. American Journal of Kidney Diseases. 1990;16(6):574-8.
23. Smadel JE. Experimental Nephritis in Rats Induced by Injection of Anti-Kidney Serum III. Pathological Studies of the Acute and Chronic Disease. The Journal of Experimental Medicine. 1936;65:541-55.
24. Unanue ER, Dixon FJ. Experimental glomerulonephritis. VI. The autologous phase of nephrotoxic serum nephritis. Journal of Experimental Medicine. 1965;121:715-25.
25. Chugh S, Yuan H, Topham PS, Haydar SA, Mittal V, Taylor GA, Kalluri R, Salant DJ. Aminopeptidase A: A nephritogenic target antigen of nephrotoxic serum. Kidney International. 2001;59(2):601-13.
26. Hoppe J, Vielhauer V. Induction and Analysis of Nephrotoxic Serum Nephritis in Mice. In: Anders H-J, Migliorini A, editors. Innate DNA and RNA Recognition. Methods in Molecular Biology. 1169: Springer New York; 2014. p. 159-74.
27. Shirato I, Sakai T, Kimura K, Tomino Y, Kriz W. Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis. The American Journal of Pathology. 1996;148(4):1283-96.
28. Hammer DK, Dixon FJ. EXPERIMENTAL GLOMERULONEPHRITIS. The Journal of Experimental Medicine. 1963;117(6):1019-34.
29. Sheerin NS, Springall T, Carroll MC, Hartley B, Sacks SH. Protection against anti-glomerular basement membrane (GBM)-mediated nephritis in C3- and C4-deficient mice. Clinical and Experimental Immunology. 1997;110(3):403-9.
30. Hebert MJ, Takano T, Papayianni A, Rennke HG, Minto A, Salant DJ, Carroll MC, Brady HR. Acute nephrotoxic serum nephritis in complement knockout mice: relative roles of the classical and alternate pathways in neutrophil recruitment and proteinuria. Nephrology Dialysis Transplantation. 1998;13(11):2799-803.
31. Schrijver G, Bogman MJJT, Assmann KJM, de Waal RMW, Robben HCM, Gasteren Hv, Koene RAP. Anti-GBM nephritis in the mouse: Role of granulocytes in the heterologous phase. Kidney International. 1990;38(1):86-95.

32. Quigg RJ. Complement and autoimmune glomerular diseases. *Current Directions in Autoimmunity*. 2004;7:165-80.
33. Alexander JJ, Chaves L, Chang A, Quigg RJ. The C5a receptor has a key role in immune complex glomerulonephritis in complement factor H-deficient mice. *Kidney International*. 2012;82(9):961-8.
34. Couser WG, Stilmant MM, Jermanovich NB. Complement-independent nephrotoxic nephritis in the guinea pig. *Kidney International*. 1977;11(3):170-80.
35. Fu Y, Xie C, Chen J, Zhu J, Zhou H, Thomas J, Zhou XJ, Mohan C. Innate Stimuli Accentuate End-Organ Damage by Nephrotoxic Antibodies via Fc Receptor and TLR Stimulation and IL-1/TNF- α Production. *The Journal of Immunology*. 2006;176(1):632.
36. Brown HJ, Lock HR, Sacks SH, Robson MG. TLR2 Stimulation of Intrinsic Renal Cells in the Induction of Immune-Mediated Glomerulonephritis. *The Journal of Immunology*. 2006;177(3):1925.
37. Tipping PG, Holdsworth SR. T Cells in Crescentic Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(5):1253-63.
38. Paust H-J, Turner J-E, Steinmetz OM, Peters A, Heymann F, Hölscher C, Wolf G, Kurts C, Mittrücker H-W, Stahl RAK, Panzer U. The IL-23/Th17 Axis Contributes to Renal Injury in Experimental Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2009;20(5):969-79.
39. Hochheiser K, Engel DR, Hammerich L, Heymann F, Knolle PA, Panzer U, Kurts C. Kidney Dendritic Cells Become Pathogenic during Crescentic Glomerulonephritis with Proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(2):306-16.
40. Dixit VM, Green S, Sarma V, Holzman LB, Wolf FW, O'Rourke K, Ward PA, Prochownik EV, Marks RM. Tumor necrosis factor- α induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(5):2973-8.
41. Opipari AW, Boguski MS, Dixit VM. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor α encodes a novel type of zinc finger protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(25):14705-8.
42. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- κ B signalling. *Nature*. 2004;430(7000):694-9.
43. Tokunaga F, Nishimasu H, Ishitani R, Goto E, Noguchi T, Mio K, Kamei K, Ma A, Iwai K, Nureki O. Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- κ B regulation. *The EMBO Journal*. 2012;31(19):3856-70.
44. Verhelst K, Carpentier I, Kreike M, Meloni L, Verstrepen L, Kensche T, Dikic I, Beyaert R. A20 inhibits LUBAC-mediated NF- κ B activation by binding linear polyubiquitin chains via its zinc finger 7. *The EMBO Journal*. 2012;31(19):3845-55.

45. Das T, Chen Z, Hendriks RW, Kool M. A20/Tumor Necrosis Factor α -Induced Protein 3 in Immune Cells Controls Development of Autoinflammation and Autoimmunity: Lessons from Mouse Models. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(104).
46. Laherty CD, Hu HM, Opipari AW, Wang F, Dixit VM. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(34):24157-60.
47. Laherty CD, Perkins ND, Dixit VM. Human T cell leukemia virus type I Tax and phorbol 12-myristate 13-acetate induce expression of the A20 zinc finger protein by distinct mechanisms involving nuclear factor kappa B. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(7):5032-9.
48. Sarma V, Lin Z, Clark L, Rust BM, Tewari M, Noelle RJ, Dixit VM. Activation of the B-cell Surface Receptor CD40 Induces A20, a Novel Zinc Finger Protein That Inhibits Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(21):12343-6.
49. Yurochko AD, Liu DY, Eierman D, Haskill S. Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(19):9034.
50. Krikos A, Laherty CD, Dixit VM. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(25):17971-6.
51. Verstrepen L, Verhelst K, van Loo G, Carpentier I, Ley SC, Beyaert R. Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). *Biochemical Pharmacology*. 2010;80(12):2009-20.
52. Tewari M, Wolf FW, Seldin MF, Shea KS, Dixit VM, Turka LA. Lymphoid expression and regulation of A20, an inhibitor of programmed cell death. *The Journal of Immunology*. 1995;154(4):1699.
53. Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A. Failure to Regulate TNF-Induced NF- κ B and Cell Death Responses in A20-Deficient Mice. *Science*. 2000;289(5488):2350-4.
54. Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Research*. 2011;21(2):223-44.
55. Turer EE, Tavares RM, Mortier E, Hitotsumatsu O, Advincula R, Lee B, Shifrin N, Malynn BA, Ma A. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(2):451-64.
56. Graham RR, Cotsapas C, Davies L, Hackett R, Lessard CJ, Leon JM, Burt NP, Guiducci C, Parkin M, Gates C, Plenge RM, Behrens TW, Wither JE, Rioux JD, Fortin PR, Graham DC, Wong AK, Vyse TJ, Daly MJ, Altshuler D, Moser KL, Gaffney PM. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics*. 2008;40(9):1059-61.

57. Musone SL, Taylor KE, Lu TT, Nititham J, Ferreira RC, Ortmann W, Shifrin N, Petri MA, Kamboh MI, Manzi S, Seldin MF, Gregersen PK, Behrens TW, Ma A, Kwok P-Y, Criswell LA. Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics*. 2008;40(9):1062-4.
58. Fung EYMG, Smyth DJ, Howson JMM, Cooper JD, Walker NM, Stevens H, Wicker LS, Todd JA. Analysis of 17 autoimmune disease-associated variants in type 1 diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility locus. *Genes And Immunity*. 2008;10:188.
59. Musone SL, Taylor KE, Nititham J, Chu C, Poon A, Liao W, Lam ET, Ma A, Kwok P-Y, Criswell LA. Sequencing of TNFAIP3 and Association of Variants with Multiple Autoimmune Diseases. *Genes and Immunity*. 2011;12(3):176-82.
60. Dieguez-Gonzalez R, Calaza M, Perez-Pampin E, Balsa A, Blanco FJ, Cañete JD, Caliz R, Carreño L, de la Serna AR, Fernandez-Gutierrez B, Ortiz AM, Herrero-Beaumont G, Pablos JL, Narvaez J, Navarro F, Marengo JL, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Analysis of TNFAIP3, a feedback inhibitor of nuclear factor- κ B and the neighbor intergenic 6q23 region in rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Research and Therapy*. 2009;11(2):R42-R.
61. Yoon HK, Byun HS, Lee H, Jeon J, Lee Y, Li Y, Jin EH, Kim J, Hong JH, Kim JH, Seok JH, Kang SW, Lee WH, Hur GM. Intron-derived aberrant splicing of A20 transcript in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52(3):427-37.
62. Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Jacques P, Fossoul A, Verheugen E, Vogel P, Beyaert R, Elewaut D, Kanneganti TD, van Loo G, Lamkanfi M. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature*. 2014;512(7512):69-73.
63. Grey ST, Arvelo MB, Hasenkamp W, Bach FH, Ferran C. A20 Inhibits Cytokine-Induced Apoptosis and Nuclear Factor κ B–Dependent Gene Activation in Islets. *The Journal of Experimental Medicine*. 1999;190(8):1135-46.
64. Zhou Q, Wang H, Schwartz DM, Stoffels M, Park YH, Zhang Y, Yang D, Demirkaya E, Takeuchi M, Tsai WL, Lyons JJ, Yu X, Ouyang C, Chen C, Chin DT, Zaal K, Chandrasekharappa SC, Hanson EP, Yu Z, Mullikin JC, Hasni SA, Wertz I, Ombrello AK, Stone DL, Hoffmann P, Jones A, Barham BK, Leavis HL, van Royen-Kerkof A, Sibley C, Batu ED, Gül A, Siegel RM, Boehm M, Milner JD, Ozen S, Gadina M, Chae J, Laxer RM, Kastner DL, Aksentijevich I. Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early onset autoinflammatory syndrome. *Nature Genetics*. 2016;48(1):67-73.
65. Giulino L, Mathew S, Ballon G, Chadburn A, Barouk S, Antonicelli G, Leoncini L, Liu YF, Gogineni S, Tam W, Cesarman E. A20 (TNFAIP3) genetic alterations in EBV-associated AIDS-related lymphoma. *Blood*. 2011;117(18):4852-4.
66. Kunter U, Daniel S, Arvelo MB, Choi J, Shukri T, Patel VI, Longo CR, Scali ST, Shrikhande G, Rocha E, Czismadia E, Mottley C, Grey ST, Floege J, Ferran C. Combined expression of A1 and A20 achieves optimal protection of renal proximal tubular epithelial cells. *Kidney International*. 2005;68(4):1520-32.

67. Lutz J, Luong le A, Strobl M, Deng M, Huang H, Anton M, Zakkar M, Enesa K, Chaudhury H, Haskard DO, Baumann M, Boyle J, Harten S, Maxwell PH, Pusey C, Heemann U, Evans PC. The A20 gene protects kidneys from ischaemia/reperfusion injury by suppressing pro-inflammatory activation. *Journal of Molecular Medicine*. 2008;86(12):1329-39.
68. Beutler B, Cerami A. Tumor Necrosis, Cachexia, Shock, and Inflammation: A Common Mediator. *Annual Review of Biochemistry*. 1988;57(1):505-18.
69. Opipari AW, Hu HM, Yabkowitz R, Dixit VM. The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(18):12424-7.
70. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15:362.
71. Shembade N, Harhaj EW. Regulation of NF-kappaB signaling by the A20 deubiquitinase. *Cellular and Molecular Immunology*. 2012;9(2):123-30.
72. Tokunaga F. Linear ubiquitination-mediated NF-kB regulation and its related disorders. *The Journal of Biochemistry*. 2013;154(4):313-23.
73. Tokunaga F, Sakata S-i, Saeki Y, Satomi Y, Kirisako T, Kamei K, Nakagawa T, Kato M, Murata S, Yamaoka S, Yamamoto M, Akira S, Takao T, Tanaka K, Iwai K. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kB activation. *Nature Cell Biology*. 2009;11:123.
74. Hershko A, Ciechanover A. The Ubiquitin System. *Annual Review of Biochemistry*. 1998;67(1):425-79.
75. Song HY, Rothe M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(13):6721-5.
76. Zhang SQ, Kovalenko A, Cantarella G, Wallach D. Recruitment of the IKK Signalingosome to the p55 TNF Receptor: RIP and A20 Bind to NEMO (IKK γ) upon Receptor Stimulation. *Immunity*. 2000;12(3):301-11.
77. Heyninck K, De Valck D, Berghe WV, Van Crielinge W, Contreras R, Fiers W, Haegeman G, Beyaert R. The zinc finger protein A20 inhibits TNF-induced NF-kB-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF2-mediated transactivation signal and directly binds to a novel NF-kB-inhibiting protein ABIN. *The Journal of Cell Biology*. 1999;145(7):1471.
78. Newton K, Dugger DL, Maltzman A, Greve JM, Hedehus M, Martin-McNulty B, Carano RAD, Cao TC, van Bruggen N, Bernstein L, Lee WP, Wu X, DeVoss J, Zhang J, Jeet S, Peng I, McKenzie BS, Roose-Girma M, Caplazi P, Diehl L, Webster JD, Vucic D. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury. *Cell Death and Differentiation*. 2016;23(9):1565-76.
79. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O, McNally E, Pickart C, Ma A. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nature Immunology*. 2004;5(10):1052-60.

80. Oshima N, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MM, Mishima Y, Kadota C, Moriyama I, Ishimura N, Amano Y, Kinoshita Y. A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signalling in intestinal epithelial cells during inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*. 2010;159(2):185-98.
81. Duong BH, Onizawa M, Osés-Prieto JA, Advincula R, Burlingame A, Malynn BA, Ma A. A20 restricts ubiquitination of pro-interleukin-1 β protein complexes and suppresses NLRP3 inflammasome activity. *Immunity*. 2015;42(1):55-67.
82. Kolodziej LE, Lodolce JP, Chang JE, Schneider JR, Grimm WA, Bartulis SJ, Zhu X, Messer JS, Murphy SF, Reddy N, Turner JR, Boone DL. TNFAIP3 maintains intestinal barrier function and supports epithelial cell tight junctions. *PLOS One*. 2011;6(10):e26352.
83. Maelfait J, Roose K, Bogaert P, Sze M, Saelens X, Pasparakis M, Carpentier I, van Loo G, Beyaert R. A20 (Tnfaip3) deficiency in myeloid cells protects against influenza A virus infection. *PLOS Pathogens*. 2012;8(3):e1002570.
84. Song XT, Evel-Kabler K, Shen L, Rollins L, Huang XF, Chen SY. A20 is an antigen presentation attenuator, and its inhibition overcomes regulatory T cell-mediated suppression. *Nature Medicine*. 2008;14(3):258-65.
85. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014;15(2):135-47.
86. Degterev A, Hitomi J, Gernscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*. 2008;4(5):313-21.
87. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, Wang L, Yan J, Liu W, Lei X, Wang X. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*. 2012;148(1-2):213-27.
88. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*. 2012;19(1):107-20.
89. Cho Y, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK-M. Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell*. 2009;137(6):1112-23.
90. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell*. 2009;137(6):1100-11.
91. Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*. 2009;325(5938):332-6.

92. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010;11(10):700-14.
93. Newton K, Sun X, Dixit VM. Kinase RIP3 Is Dispensable for Normal NF- κ Bs, Signaling by the B-Cell and T-Cell Receptors, Tumor Necrosis Factor Receptor 1, and Toll-Like Receptors 2 and 4. *Molecular and Cellular Biology*. 2004;24(4):1464-9.
94. Kaiser WJ, Upton JW, Mocarski ES. Viral modulation of programmed necrosis. *Current Opinion in Virology*. 2013;3(3):296-306.
95. Cho Y, McQuade T, Zhang H, Zhang J, Chan FK. RIP1-dependent and independent effects of necrostatin-1 in necrosis and T cell activation. *PLoS One*. 2011;6(8):e23209.
96. Smith CCT, Davidson SM, Lim SY, Simpkin JC, Hothersall JS, Yellon DM. Necrostatin: A Potentially Novel Cardioprotective Agent? *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2007;21(4):227-33.
97. Lin J, Li H, Yang M, Ren J, Huang Z, Han F, Huang J, Ma J, Zhang D, Zhang Z, Wu J, Huang D, Qiao M, Jin G, Wu Q, Huang Y, Du J, Han J. A Role of RIP3-Mediated Macrophage Necrosis in Atherosclerosis Development. *Cell Reports*. 2013;3(1):200-10.
98. Linkermann A, Bräsen JH, Himmerkus N, Liu S, Huber TB, Kunzendorf U, Krautwald S. Rip1 (Receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney International*. 2012;81(8):751-61.
99. Oerlemans MIFJ, Liu J, Arslan F, den Ouden K, van Middelaar BJ, Doevendans PA, Sluijter JPG. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia–reperfusion in vivo. *Basic Research in Cardiology*. 2012;107(4):270.
100. Wu J, Huang Z, Ren J, Zhang Z, He P, Li Y, Ma J, Chen W, Zhang Y, Zhou X, Yang Z, Wu S-Q, Chen L, Han J. Mkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mkl in necroptosis. *Cell Research*. 2013;23:994.
101. Günther C, Martini E, Wittkopf N, Amann K, Weigmann B, Neumann H, Waldner MJ, Hedrick SM, Tenzer S, Neurath MF, Becker C. Caspase-8 regulates TNF- α -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*. 2011;477:335.
102. Welz P-S, Wullaert A, Vlantis K, Kondylis V, Fernández-Majada V, Ermolaeva M, Kirsch P, Sterner-Kock A, van Loo G, Pasparakis M. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature*. 2011;477:330.
103. Linkermann A, Heller JO, Prokai A, Weinberg JM, De Zen F, Himmerkus N, Szabo AJ, Brasen JH, Kunzendorf U, Krautwald S. The RIP1-kinase inhibitor necrostatin-1 prevents osmotic nephrosis and contrast-induced AKI in mice. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013;24(10):1545-57.

104. Linkermann A, Bräsen JH, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller J-O, De Zen F, Weinlich R, Ortiz A, Walczak H, Weinberg JM, Green DR, Kunzendorf U, Krautwald S. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia–reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(29):12024-9.
105. Martin-Sanchez D, Fontecha-Barriuso M, Carrasco S, Sanchez-Niño MD, Mässenhausen Av, Linkermann A, Cannata-Ortiz P, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Sanz AB. TWEAK and RIPK1 mediate a second wave of cell death during AKI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(16):4182.
106. Vereecke L, Sze M, Mc Guire C, Rogiers B, Chu Y, Schmidt-Supprian M, Pasparakis M, Beyaert R, van Loo G. Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(7):1513-23.
107. Daniel S, Arvelo MB, Patel VI, Longo CR, Shrikhande G, Shukri T, Mahiou J, Sun DW, Mottley C, Grey ST, Ferran C. A20 protects endothelial cells from TNF-, Fas-, and NK-mediated cell death by inhibiting caspase 8 activation. *Blood*. 2004;104(8):2376-84.
108. Tavares RM, Turer EE, Liu CL, Advincula R, Scapini P, Rhee L, Barrera J, Lowell CA, Utz PJ, Malynn BA, Ma A. The ubiquitin modifying enzyme A20 restricts B cell survival and prevents autoimmunity. *Immunity*. 2010;33(2):181-91.
109. Malynn BA, Ma A. Ubiquitin makes its mark on immune regulation. *Immunity*. 2010;33(6):843-52.
110. Onizawa M, Oshima S, Schulze-Topphoff U, Osés-Prieto JA, Lu T, Tavares R, Prodhomme T, Duong B, Whang MI, Advincula R, Agelidis A, Barrera J, Wu H, Burlingame A, Malynn BA, Zamvil SS, Ma A. The ubiquitin-modifying enzyme A20 restricts ubiquitination of the kinase RIPK3 and protects cells from necroptosis. *Nature Immunology*. 2015;16(6):618-27.
111. Silke J, Rickard JA, Gerlic M. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nature Immunology*. 2015;16(7):689-97.
112. Wu Y, Zhao D, Zhuang J, Zhang F, Xu C. Caspase-8 and Caspase-9 Functioned Differently at Different Stages of the Cyclic Stretch-Induced Apoptosis in Human Periodontal Ligament Cells. *PLOS ONE*. 2016;11(12):e0168268.
113. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133(3):e6-e.
114. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson BR, Saito Y, Betsholtz C. A New Method for Large Scale Isolation of Kidney Glomeruli from Mice. *The American Journal of Pathology*. 2002;161(3):799-805.
115. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lindenmeyer MT, Vielhauer V. Distinct Contributions of TNF Receptor 1 and 2 to TNF-Induced Glomerular Inflammation in Mice. *PLOS ONE*. 2013;8(7):e68167.

116. Vielhauer V. Compartment-Specific Flow Cytometry for the Analysis of TNF-Mediated Recruitment and Activation of Glomerular Leukocytes in Murine Kidneys. In: Bayry J, editor. *The TNF Superfamily: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 173-86.
117. Mene P. Mesangial cell cultures. *Journal of Nephrology*. 2001;14(3):198-203.
118. Wolf G, Haberstroh U, Neilson EG. Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *The American Journal of Pathology*. 1992;140(1):95-107.
119. Takahashi N, Duprez L, Grootjans S, Cauwels A, Nerinckx W, DuHadaway JB, Goossens V, Roelandt R, Van Hauwermeiren F, Libert C, Declercq W, Callewaert N, Prendergast GC, Degterev A, Yuan J, Vandenabeele P. Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death and Disease*. 2012;3:e437.
120. Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer [Instructions] Rockford, IL, USA: Thermo Scientific; 2011 [Available from: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/46428>].
121. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1):248-54.
122. Creatinine FS [Instructions] Holzheim, Germany: DiaSys Diagnostic Systems GmbH; 2013 [Available from: <https://www.diasys-deutschland.de/produkte/reagenzien/klinische-chemie/reagent-details/48-creatinine-fs/reagent.show>].
123. Cytotoxicity Detection Kit (LDH) [Instructions] Mannheim, Germany: Roche Diagnostics GmbH; 2016 [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11644793001bul.pdf>].
124. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. 11: Elsevier; 2005. p. 127-52.
125. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1):55-63.
126. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993;303(2):474-82.
127. Baum S. The PAS Reaction for Staining Cell Walls. *CSH Protocols*. 2008;2008:pdb.prot4956.
128. El Nahas AM, Bassett AH, Cope GH, Le Carpentier JE. Role of growth hormone in the development of experimental renal scarring. *Kidney International*. 1991;40(1):29-34.

129. Guo J-K, Menke AL, Gubler M-C, Clarke AR, Harrison D, Hammes A, Hastie ND, Schedl A. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Human Molecular Genetics*. 2002;11(6):651-9.
130. Tryggvason K. Unraveling the Mechanisms of Glomerular Ultrafiltration: Nephlin, a Key Component of the Slit Diaphragm. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1999;10(11):2440-5.
131. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *The New England Journal of Medicine*. 2014;370(5):455-65.
132. Vicart P, Schwartz B, Vandewalle A, Bens M, Delouis C, Panthier J-J, Pournin S, Babinet C, Paulin D. Immortalization of Multiple Cell Types from Transgenic Mice Using a Transgene Containing the Vimentin Promoter and a Conditional Oncogene. *Experimental Cell Research*. 1994;214(1):35-45.
133. Duncan CJA, Dinnigan E, Theobald R, Grainger A, Skelton AJ, Hussain R, Willet JDP, Swan DJ, Coxhead J, Thomas MF, Thomas J, Zamvar V, Slatter MA, Cant AJ, Engelhardt KR, Hambleton S. Early-onset autoimmune disease due to a heterozygous loss-of-function mutation in TNFAIP3 (A20). *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2018;77(5):783-6.
134. Kadowaki S, Hashimoto K, Nishimura T, Kashimada K, Kadowaki T, Kawamoto N, Imai K, Okada S, Kanegane H, Ohnishi H. Functional analysis of novel A20 variants in patients with atypical inflammatory diseases. *Arthritis Research & Therapy*. 2021;23(1):52.
135. Takagi M, Ogata S, Ueno H, Yoshida K, Yeh T, Hoshino A, Piao J, Yamashita M, Nanya M, Okano T, Kajiwarra M, Kanegane H, Muramatsu H, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Bando Y, Kato M, Hayashi Y, Miyano S, Imai K, Ogawa S, Kojima S, Morio T. Haploinsufficiency of TNFAIP3 (A20) by germline mutation is involved in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017;139(6):1914-22.
136. Mele A, Cervantes JR, Chien V, Friedman D, Ferran C. Single nucleotide polymorphisms at the TNFAIP3/A20 locus and susceptibility/resistance to inflammatory and autoimmune diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2014;809:163-83.
137. Kopp JB, Rosenberg AZ, Schnaper HW. Focal Segmental Glomerulosclerosis. In: Gilbert SJ, Weiner DE, Bomback AS, Perazella MA, Tonelli M, editors. *National Kidney Foundation's Primer on Kidney Diseases*. 7th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier; 2018. p. 181-7.
138. Anders HJ, Vielhauer V, Schlöndorff D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney International*. 2003;63(2):401-15.
139. Sun L, Zou L-X, Han Y-C, Wu L, Chen T, Zhu D-D, Hu P. A20 overexpression exerts protective effects on podocyte injury in lupus nephritis by downregulating UCH-L1. *Journal of Cellular Physiology*. 2019.
140. Sun L, Zou L-X, Han Y-C, Zhu D-D, Chen T, Wang J. Role of A20/TNFAIP3 deficiency in lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2020;24(2):107-18.

141. Lloyd CM, Dorf ME, Proudfoot A, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC. Role of MCP-1 and RANTES in inflammation and progression to fibrosis during murine crescentic nephritis. *Journal of Leukocyte Biology*. 1997;62(5):676-80.
142. Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:2759.
143. Turner-Stokes T, Garcia Diaz A, Pinheiro D, Prendecki M, McAdoo SP, Roufosse C, Cook HT, Pusey CD, Woollard KJ. Live Imaging of Monocyte Subsets in Immune Complex-Mediated Glomerulonephritis Reveals Distinct Phenotypes and Effector Functions. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2020;31(11):2523.
144. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(9):3652-6.
145. Xu LL, Warren MK, Rose WL, Gong W, Wang JM. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*. 1996;60(3):365-71.
146. Tesch GH, Schwarting A, Kinoshita K, Lan HY, Rollins BJ, Kelley VR. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(1):73-80.
147. Stahl RA, Thaiss F, Disser M, Helmchen U, Hora K, Schlondorff D. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney International*. 1993;44(5):1036-47.
148. Wolf G, Jocks T, Zahner G, Panzer U, Stahl RA. Existence of a regulatory loop between MCP-1 and TGF-beta in glomerular immune injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2002;283(5):F1075-84.
149. Moadab F, Khorramdelazad H, Abbasifard M. Role of CCL2/CCR2 axis in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: Latest evidence and therapeutic approaches. *Life Sciences*. 2021;269:119034.
150. Bruggeman LA, Drawz PE, Kahoud N, Lin K, Barisoni L, Nelson PJ. TNFR2 interposes the proliferative and NF- κ B-mediated inflammatory response by podocytes to TNF- α . *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 2011;91(3):413-25.
151. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo, R.C., Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8⁺ T Cells. *Science*. 1995;270:1811-5.
152. Nouailles G, Dorhoi A, Koch M, Zerrahn J, Weiner J, 3rd, Faé KC, Arrey F, Kuhlmann S, Bandermann S, Loewe D, Mollenkopf HJ, Vogelzang A, Meyer-Schwesinger C, Mittrücker HW, McEwen G, Kaufmann SH. CXCL5-secreting pulmonary epithelial cells drive destructive neutrophilic inflammation in tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(3):1268-82.
153. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.

154. Chang MS, McNinch J, Basu R, Simonet S. Cloning and characterization of the human neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(41):25277-82.
155. Van Der Veen BS, Petersen AH, Belperio JA, Satchell SC, Mathieson PW, Molema G, Heeringa P. Spatiotemporal expression of chemokines and chemokine receptors in experimental anti-myeloperoxidase antibody-mediated glomerulonephritis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2009;158(1):143-53.
156. Gómez-Guerrero C, López-Armada MJ, González E, Egido J. Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation. *The Journal of Immunology*. 1994;153(11):5247-55.
157. Jevnikar AM, Brennan DC, Singer GG, Heng JE, Maslinski W, Wuthrich RP, Glimcher LH, Kelley VE. Stimulated kidney tubular epithelial cells express membrane associated and secreted TNF alpha. *Kidney International*. 1991;40(2):203-11.
158. Neale TJ, Rüger BM, Macaulay H, Dunbar PR, Hasan Q, Bourke A, Murray-McIntosh RP, Kitching AR. Tumor necrosis factor-alpha is expressed by glomerular visceral epithelial cells in human membranous nephropathy. *American Journal of Pathology*. 1995;146(6):1444-54.
159. Wen Y, Rudemiller NP, Zhang J, Robinette T, Lu X, Ren J, Privratsky JR, Nedospasov SA, Crowley SD. TNF- α in T lymphocytes attenuates renal injury and fibrosis during nephrotoxic nephritis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2019;318(1):F107-F16.
160. Green SJ, Scheller LF, Marletta MA, Seguin MC, Klotz FW, Slayter M, Nelson BJ, Nacy CA. Nitric oxide: Cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunology Letters*. 1994;43(1):87-94.
161. Cook HT, Ebrahim H, Jansen AS, Foster GR, Largen P, Cattell V. Expression of the gene for inducible nitric oxide synthase in experimental glomerulonephritis in the rat. *Clinical and Experimental Immunology*. 1994;97(2):315-20.
162. Schreck R, Baeuerle PA. NF-kappa B as inducible transcriptional activator of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *Molecular and Cellular Biology*. 1990;10(3):1281-6.
163. Zhang YH, Lin JX, Vilcek J. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. *Molecular and Cellular Biology*. 1990;10(7):3818-23.
164. Lv W, Booz GW, Wang Y, Fan F, Roman RJ. Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. *European Journal of Pharmacology*. 2018;820:65-76.
165. Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, Goettel JA, Horwitz BH, Klein C, Muise AM, Snapper SB. Chapter Five - Interleukin 10 Receptor Signaling: Master Regulator of Intestinal Mucosal Homeostasis in Mice and Humans. In: Alt FW, editor. *Advances in Immunology*. 122: Academic Press; 2014. p. 177-210.
166. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10:170.

167. Hu J, Yi S, Wang C, Zhang Y, Tang J, Huang X, Yang L, Yang J, Li H. A20 Inhibits Intraocular Inflammation in Mice by Regulating the Function of CD4+T Cells and RPE Cells. *Frontiers in Immunology*. 2021;11(3764).
168. Chu Y, Vahl JC, Kumar D, Heger K, Bertossi A, Wójtowicz E, Soberon V, Schenten D, Mack B, Reutelshöfer M, Beyaert R, Amann K, van Loo G, Schmidt-Supprian M. B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood*. 2011;117(7):2227.
169. Hövelmeyer N, Reissig S, Thi Xuan N, Adams-Quack P, Lukas D, Nikolaev A, Schlüter D, Waisman A. A20 deficiency in B cells enhances B-cell proliferation and results in the development of autoantibodies. *European Journal of Immunology*. 2010;41(3):595-601.
170. Sarhan M, Land WG, Tonnus W, Hugo CP, Linkermann A. Origin and Consequences of Necroinflammation. *Physiological Reviews*. 2018;98(2):727-80.
171. Nagamachi A, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Tsuji K, Honda Z, Takubo K, Suda T, Oda H, Inaba T, Honda H. Acquired deficiency of A20 results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and abnormal hematopoietic stem cell function. *PLOS One*. 2014;9(1):e87425.
172. Lei Z, Yue Y, Stone S, Wu S, Lin W. NF- κ B Activation Accounts for the Cytoprotective Effects of PERK Activation on Oligodendrocytes during EAE. *The Journal of Neuroscience*. 2020;40(33):6444-56.
173. Latanich CA, Toledo-Pereyra LH. Searching for NF- κ B-Based Treatments of Ischemia Reperfusion Injury. *Journal of Investigative Surgery*. 2009;22(4):301-15.
174. Eckmann L, Neish AS. NF- κ B and mucosal homeostasis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2011;349:145-58.
175. Gilmore TD. Multiple Myeloma: Lusting for NF- κ B. *Cancer Cell*. 2007;12(2):95-7.
176. Beug ST, Cheung HH, LaCasse EC, Korneluk RG. Modulation of immune signalling by inhibitors of apoptosis. *Trends in Immunology*. 2012;33(11):535-45.
177. Scott FL, Denault J-B, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvesen GS. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *The EMBO Journal*. 2005;24(3):645-55.
178. Mehrotra S, Languino LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC. IAP Regulation of Metastasis. *Cancer Cell*. 2010;17(1):53-64.
179. Takahashi N, Vereecke L, Bertrand MJ, Duprez L, Berger SB, Divert T, Goncalves A, Sze M, Gilbert B, Kourula S, Goossens V, Lefebvre S, Gunther C, Becker C, Bertin J, Gough PJ, Declercq W, van Loo G, Vandenabeele P. RIPK1 ensures intestinal homeostasis by protecting the epithelium against apoptosis. *Nature*. 2014;513(7516):95-9.

-
180. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(49):30761-4.
 181. Li J, McQuade T, Siemer AB, Napetschnig J, Moriwaki K, Hsiao YS, Damko E, Moquin D, Walz T, McDermott A, Chan FK, Wu H. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell*. 2012;150(2):339-50.
 182. Chen ZJ, Sun LJ. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Molecular Cell*. 2009;33(3):275-86.
 183. Xu Y, Ma H, Shao J, Wu J, Zhou L, Zhang Z, Wang Y, Huang Z, Ren J, Liu S, Chen X, Han J. A Role for Tubular Necroptosis in Cisplatin-Induced AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2015;26(11):2647.
 184. Kearney CJ, Cullen SP, Clancy D, Martin SJ. RIPK1 can function as an inhibitor rather than an initiator of RIPK3-dependent necroptosis. *The FEBS Journal*. 2014;281(21):4921-34.
 185. Denayer T, Stöhr T, Van Roy M. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine*. 2014;2(1):5-11.
 186. Kaiser WJ, Daley-Bauer LP, Thapa RJ, Mandal P, Berger SB, Huang C, Sundararajan A, Guo H, Roback L, Speck SH, Bertin J, Gough PJ, Balachandran S, Mocarski ES. RIP1 suppresses innate immune necrotic as well as apoptotic cell death during mammalian parturition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(21):7753-8.
 187. Mandal P, Berger SB, Pillay S, Moriwaki K, Huang C, Guo H, Lich JD, Finger J, Kasparcova V, Votta B, Ouellette M, King BW, Wisnoski D, Lakdawala AS, DeMartino MP, Casillas LN, Haile PA, Sehon CA, Marquis RW, Upton J, Daley-Bauer LP, Roback L, Ramia N, Dovey CM, Carette JE, Chan FK, Bertin J, Gough PJ, Mocarski ES, Kaiser WJ. RIP3 induces apoptosis independent of pronecrotic kinase activity. *Molecular Cell*. 2014;56(4):481-95.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Allen bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt und gefördert haben, insbesondere den nachfolgenden Personen:

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Volker Vielhauer für seine exzellente Betreuung, seine Hilfsbereitschaft und den zahlreichen tiefgründigen wissenschaftlichen Diskussionen. Die in seinem Laboratorium verbrachte Zeit war wissenschaftlich und menschlich eine große Bereicherung für mich.

Meinen Mitdoktoranden Martin Müller, Andrei Bideak und Moritz Lux für die großartige Unterstützung, die gemeinsam erlebte Zeit, die vielen wertvollen Diskussionen und Ideen bei praktischen Problemen.

Bei Herrn Nuru Eltrich für seine Hilfsbereitschaft und die Einweisung in die Arbeitsmethoden sowie allen anderen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Abteilung für Klinische Biochemie für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir immer im Leben Halt gaben, mich bedingungslos unterstützten und liebevoll zur Seite standen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders für seine wissenschaftliche Unterstützung. Auch bei allen Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die Zusammenarbeit und schöne Arbeitsatmosphäre bedanken.

Zuletzt danke ich dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der Universität München für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Hoppe, John Michael

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Die Rolle von A20 in der Immunkomplex-Glomerulonephritis

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, den 10.07.2022

Ort, Datum

John Michael Hoppe

Unterschrift Doktorand