

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Die funktionelle Rolle von RIPK1-, RIPK3- und MLKL- vermitteltem Zelltod in der Immunkomplex- Glomerulonephritis



Dissertation

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

vorgelegt von

Alexandra Vera Lindenthal

aus München

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Vielhauer

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Gerald Schulz
PD Dr. Michael Scholke

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2023

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Zusammenfassung.....	VII
Abstract.....	IX
1 Einleitung	11
1.1 Die chronische Nierenerkrankung	11
1.2 Physiologie der Niere	16
1.3 Die Glomerulonephritis.....	20
1.4 Das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis.....	23
1.5 RIPK1-, RIPK3- und MLKL-vermittelter Zelltod	26
1.6 Hypothese der Arbeit.....	32
2 Materialien und Methoden	34
2.1 Materialien.....	34
2.1.1 Geräte	34
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	36
2.1.3 Chemikalien und Puffer	37
2.1.4 Antikörper und Enzyme	42
2.1.5 Primer für die <i>Real Time</i> -PCR.....	43
2.2 Tierexperimentelle Methoden.....	44
2.2.1 Versuchstiere	44
2.2.2 Tierhaltung	45
2.2.3 Genotypisierung	45
2.2.4 Induktion der autologen nephrotoxischen Serumnephritis..	47
2.3 Immunologische Methoden	50
2.3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	50
2.3.2 Durchflusszytometrie.....	52
2.3.3 Western Blot.....	55
2.4 Molekularbiologische Methoden	57
2.4.1 RNA-Isolierung.....	57
2.4.2 cDNA-Synthese.....	58
2.4.3 Quantitative <i>Real Time</i> -PCR	59
2.5 Histologische Methoden	62
2.5.1 Aufbereitung des Nierengewebes	62
2.5.2 Färbung der Schnitte.....	62

2.5.3	Auswertung am Mikroskop	63
2.6	Statistische Analyse	63
3	Ergebnisse	64
3.1	Expression von RIPK1 und RIPK3 im Verlauf der NTN.....	65
3.2	Renaler Zelltod	67
3.3	Albuminurie	68
3.4	Serumanalyse	70
3.5	Glomerulärer und tubulointerstitieller Nierenschaden	71
3.6	Renale Leukozyteninfiltration	76
3.7	Expression von Entzündungsmediatoren in der Niere.....	79
3.8	Lokale und systemische T-Zell-Aktivierung	81
3.9	Humorale Immunantwort auf das nephrotoxische Serum.....	84
4	Diskussion und Ausblick	86
4.1	Vermehrte Proteinexpression von RIPK1 und RIPK3 in der NTN	87
4.2	Einfluss von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf renalen Zelltod in der NTN.....	88
4.3	Einfluss von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf renale Funktion und Gewebeschädigung.....	90
4.4	Einfluss von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf die Entzündungsreaktion in der NTN	92
4.5	Einfluss von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf die systemische Immunantwort	95
4.6	Mechanismen der durch RIPK1-Kinaseaktivität vermittelten renalen Schädigung bei der NTN	96
4.7	Zusammenfassung der Ergebnisse, Limitationen und Ausblick	100
	Literaturverzeichnis	103
	Danksagung	113
	Eidesstattliche Versicherung	114

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon
APC	Allophycocyanin
CCL	CC-Chemokin-Ligand
clAP	Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein
CKD	Chronic Kidney Disease
DAI	DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors
DAMP	Danger associated molecular patterns
DSS	Dextran sulfate sodium
FACS	Flourescence activated cell sorting
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
ICD	International Classification of Diseases
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
MCAO	Middle Cerebral Artery Occlusion
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like protein
MPT	Mitochondrial membrane permeability transition

Nec-1	Necrostatin-1
NFκB	Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells
NGAL	Neutrophilen-Gelatinase assoziiertes Lipocalin
NTN	Nephrotoxische Serumnephritis
PAS	Periodic Acid Schiff
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RHIM	RIP homotypic interaction motif
RIP(K)	Receptor-interacting Protein (Kinase)
RNA	Ribonukleinsäure
SPF	Spezifisch pathogenfrei
TIMP	Tissue inhibitor of Metalloproteinases
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	TNF-receptor-associated Death Domain
TRAILR	TNF-related apoptosis inducing ligand receptor
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein inducing IFNβ
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
TWEAK	tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis
XIAP	x-linked inhibitor of apoptosis protein

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer für die quantitative <i>real-time</i> PCR	43
Tabelle 2: Versuchstiere	44
Tabelle 3: Primer für die Genotypisierung der Versuchstiere	46
Tabelle 4: Thermocycler-Einstellungen für die Genotypisierung	46
Tabelle 5: Mastermix cDNA-Synthese	58
Tabelle 6: Einstellungen des Lightcycler 480 für die qPCR	60
Tabelle 7: <i>SYBR Green-Mastermix</i>	61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nierentransplantationen in Deutschland 2013-2018 (aus [9])	13
Abbildung 2: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz nach KDIGO (aus [10]).....	14
Abbildung 3: Diagnoseverteilung der von QuaSi-Niere erfassten Dialysepatienten 2005 (aus [7])	15
Abbildung 4: Indikationen für eine Nierentransplantation in Deutschland 2018 (aus [9]).....	16
Abbildung 5: Feinstruktur der Niere (aus [12]).....	18
Abbildung 6: Ort der Zellschädigung bei verschiedenen Formen der Glomerulonephritis (aus [13]).....	21
Abbildung 7: Pathophysiologische Mechanismen der heterologen und autologen Phase der NTN (nach Hoppe et al. [19])	25
Abbildung 8: Übersicht über Mechanismen des regulierten Zelltodes (aus [21])	27
Abbildung 9: Circulus vitiosus aus reguliertem Zelltod und Inflammation (aus [21]).....	28
Abbildung 10: Signalwege nach Aktivierung von TNFR1 durch TNF α (aus [33])	31
Abbildung 11: Schematischer Ablauf der autologen NTN	49
Abbildung 12: Expression von RIPK1 und RIPK3 im Rahmen der NTN.....	66
Abbildung 13: Analyse des renalen Zelltodes mittels TUNEL-Färbung.....	68
Abbildung 14: Albuminurie an Tag 0, 7 und 14 der NTN	69
Abbildung 15: Serumanalyse an Tag 14 der NTN	71
Abbildung 16: Evaluation des glomerulären Schadens	73
Abbildung 17: mRNA-Expression von Markern für tubulointerstitiellen Schaden und renaler Fibrose.....	75
Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse der Leukozyteninfiltration	78
Abbildung 19: Renale mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren an Tag 14 der NTN	81
Abbildung 20: Analyse der lokalen und systemischen T-Zell-Aktivierung.....	83
Abbildung 21: Analyse der adaptiven Immunantwort auf das nephrotoxische Serum	85
Abbildung 22: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit	101

Zusammenfassung

Nekroptose ist eine Form des regulierten Zelltodes, an dessen Vermittlung die intrazellulären Proteinkinasen RIPK1 und RIPK3 sowie die Pseudokinase MLKL maßgeblich beteiligt sind. Durch Zellmembranruptur und die Freisetzung von immunogenen Zellbestandteilen kommt es bei der Nekroptose, im Gegensatz zur Apoptose, zur Stimulation des Immunsystems und zur Induktion einer Entzündungsreaktion. Diese Inflammationsreaktion führt ihrerseits wiederum zur Induktion von Zelltod. So kann es zu einem selbstverstärkenden Kreislauf aus immunogenem Zelltod und Entzündung kommen, der zu progredientem Gewebeverlust und schließlich Funktionsausfall des jeweiligen Organs führt.

Eine anhaltende Entzündungsreaktion sowie Gewebeuntergang durch Zelltod können auch im Rahmen chronisch entzündlicher Nierenerkrankungen bis zum vollständigen Funktionsausfall der Nieren führen. In mehreren Modellen tubulointerstitieller Nierenerkrankungen konnte eine pathophysiologische Relevanz der Nekroptose nachgewiesen werden. In dieser Arbeit sollte nun die Rolle der Nekroptose in der chronisch progredienten Immunkomplex- Glomerulonephritis am Mausmodell der nephrotoxischen Serumnephritis untersucht werden.

Hierzu wurde eine vergleichende Phänotyp-Analyse von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen, von transgenen *Knock-in* Mäusen ohne die für die Nekroptose erforderliche Kinaseaktivität von RIPK1 (RIPK1kd) respektive RIPK3 (RIPK3kd) sowie von MLKL-defizienten *Knockout*-Mäusen durchgeführt. Die Induktion der Glomerulonephritis erfolgte durch intravenöse Injektion eines Schafserums, das gegen glomeruläre Strukturen gerichtete Antikörper enthält. 14 Tage nach Injektion des Serums wurden die Genotypen hinsichtlich funktioneller Nierenparameter, morphologischem Nierenschaden, reguliertem Zelltod sowie renaler Entzündungsreaktion verglichen.

Während die RIPK1kd-Mäuse einen verbesserten Phänotyp aufwiesen, der durch verminderten renalen Zelltod, geringere Albuminurie, verminderten morphologischen Nierenschaden sowie eine verminderte Entzündungsreaktion gekennzeichnet war, konnte bei den RIPK3kd-Mäusen kein vergleichbarer Effekt

nachgewiesen werden. Bei den MLKL-defizienten Mäusen zeigte sich ein tendenziell verminderter renaler Zelltod, morphologischer Nierenschaden sowie eine verminderte renale Entzündungsreaktion, diese Effekte waren allerdings geringer ausgeprägt als in der RIPK1^{kd}-Gruppe.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Komplexität bei der Regulation von Zelltod und Inflammation durch die RIP-Kinasen. Der größere protektive Effekt der fehlenden Kinaseaktivität von RIPK1 im Vergleich zu RIPK3 sowie des Fehlens von MLKL zeigt, dass die Kinaseaktivität von RIPK1 im Kontext verschiedener Erkrankungen nicht nur über die Vermittlung von RIPK3-abhängiger Nekroptose, sondern auch über davon unabhängige Mechanismen zur Pathophysiologie beiträgt. Zudem wird deutlich, dass die Blockade der RIPK1-Kinaseaktivität auch bei der Behandlung chronisch entzündlicher Glomerulonephritiden eine vielversprechende Therapiestrategie darstellt.

Abstract

Necroptosis is a form of regulated cell death mediated by the intracellular protein kinases RIPK1 and RIPK3 as well as the pseudokinase MLKL. Unlike apoptosis, necroptosis leads to cell membrane rupture and release of damage associated molecular patterns which stimulate the immune system and induce an inflammatory reaction. Inflammation again triggers cell death, which in the end leads to an auto-amplification loop provoking tissue damage and eventually loss of organ function. Research on various models of tubulointerstitial kidney diseases shows that necroptosis can play a key role in mediating progressive kidney damage. This work investigates the role of necroptosis in immune complex glomerulonephritis using the murine model of nephrotoxic serum nephritis.

In this work, C57Bl/6 wildtype mice were compared to transgenic knockin mice lacking the kinase activity of RIPK1 (RIPK1kd mice) or RIPK3 (RIPK3kd mice), respectively, which is essential for necroptosis, as well as to MLKL knockout mice. For inducing nephritis, a sheep serum containing anti-glomerular basement membrane antibodies was used. 14 days after intravenous injection of the serum the different genotypes were compared to the wildtype mice regarding functional parameters, kidney morphology, regulated cell death and renal inflammation.

Whereas RIPK1kd mice showed a significantly improved phenotype with less renal cell death, reduced albuminuria, improved kidney morphology, and reduced inflammation compared to wildtype mice, RIPK3kd mice showed no such improvements. In MLKL knockout mice a trend to reduced renal cell death, morphological kidney damage and renal inflammation was also noted. These effects, however, were not as pronounced as seen in the RIPK1kd genotype.

These results underline the complexity of how RIP kinases regulate cell death and inflammation. The fact that lack of RIPK1 kinase activity improved glomerulonephritis, but deficiency of RIPK3 kinase activity and MLKL did not protect mice to the same extent shows that RIPK1 kinase activity can facilitate organ damage by mechanisms extending beyond mediating RIPK3-dependent necroptosis in the context of various diseases. In addition, this work shows that

inhibition of RIPK1 kinase activity is a promising target in the treatment of immune complex glomerulonephritis.

1 Einleitung

1.1 Die chronische Nierenerkrankung

Definition

Die chronische Nierenerkrankung (Synonym: chronische Niereninsuffizienz, CKD) ist ein zentrales Problem der Nephrologie. Die geschätzte weltweite Prävalenz beträgt etwa 11-13% [1], und alleine in Deutschland sind etwa 9 Millionen Menschen von einer chronischen Nierenerkrankung betroffen. Besonders die Progression zur terminalen Niereninsuffizienz ist mit zahlreichen Komplikationen, unter anderem einem deutlich erhöhtem kardiovaskulärem Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko, verbunden. Zudem beschränken sich hier die Behandlungsmöglichkeiten auf die Anwendung von apparativen Nierenersatzverfahren sowie Nierentransplantationen, welche ihrerseits mit Komplikationen und Einschränkungen für die Patienten einhergehen. Trotz der hohen Fallzahlen wurden aufgrund uneinheitlicher Definition und Klassifizierung Patienten mit chronischer Nierenerkrankung über Jahrzehnte hinweg nicht allorts gleichermaßen identifiziert und adäquat therapiert. Nach und nach wurde die Notwendigkeit erkannt, ein einheitliches Vorgehen für alle Patienten mit chronischer Nierenerkrankung zu entwickeln, um die Progression hin zur terminalen Niereninsuffizienz zu vermindern. So waren es die erklärten Ziele der 2002 veröffentlichten Leitlinien der National Kidney Foundation, sowohl eine einheitliche Definition und Stadieneinteilung der chronischen Nierenerkrankung vorzunehmen, als auch Laborparameter für deren klinische Beurteilung zu identifizieren [2]. Eine aktuelle Überarbeitung der 2002 entwickelten Definition erfolgte in der KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease [3]. Demnach spricht man von einer chronischen Nierenerkrankung bei Auffälligkeiten in Struktur und Funktion der Niere, die über mindestens 3 Monate bestehen und Auswirkungen auf die Gesundheit haben. Auffälligkeiten in Struktur und Funktion der Niere sind definiert als

a.) das Vorhandensein von Nierenschadensmarkern wie Albuminurie, pathologischem Urinsediment, Elektrolytstörungen, pathologischer Histologie oder Bildgebung sowie erfolgter Nierentransplantation und/oder

b) einer reduzierter glomerulären Filtrationsrate (GFR) von $<60\text{ml/min/1,73m}^2$.

Bedeutung der chronischen Nierenerkrankung für das Gesundheitswesen:

Die chronische Nierenerkrankung stellt ein wesentliches Problem für die Gesundheitssysteme weltweit dar. In den Jahren 1990 bis 2010 hat sich weltweit die absolute Zahl der an chronischer Nierenerkrankung Verstorbenen nahezu verdoppelt, wobei hier nur die terminale Niereninsuffizienz als direkte Todesursache registriert wurde. Aber auch in früheren Stadien ist die chronische Nierenerkrankung mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert [4]. Darüber hinaus konnte mehrfach durch Studien belegt werden, dass die Prävalenz einerseits sowie das Auftreten aggravierter Verläufe etlicher anderer Erkrankungen durch die chronische Nierenerkrankung begünstigt werden, im Besonderen sind hier kardiovaskuläre Erkrankungen zu nennen [5, 6].

Bei Progression der chronischen Nierenerkrankung hin zum terminalen Nierenversagen stehen nur mehr Dialyse und Nierentransplantation als Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Diese stellen nicht nur eine gravierende Einschränkung in die Lebensqualität der Patienten dar. Die hohe Prävalenz der chronischen Nierenerkrankung sowie damit verbundener Folgeerkrankungen einerseits und die aufwendige und kostenintensive Therapie, vor allem bei terminaler Niereninsuffizienz, andererseits, machen die chronische Nierenerkrankung auch zu einer wesentlichen ökonomischen Belastung für unser Gesundheitssystem. Die Anzahl der Dialysepatienten in Deutschland stieg von etwa 60000 im Jahr 2005 auf etwa 90000 in 2018, und es wird eine Steigerung der Patientenanzahl von jährlich etwa 1,5-2,5% beobachtet [7, 8]. Die Kosten für eine Dialysetherapie betragen etwa 40 000€ pro Jahr. Hinzu kommen jährlich etwa 2000 bis 2500 Nierentransplantationen (**Abbildung 1**), was die Niere zum am häufigsten transplantierten Organ in Deutschland macht [9]. Den 2291 im Jahr 2018 durchgeführten Nierentransplantationen stehen jedoch 12 031 Patienten auf der Warteliste für eine Spenderniere (Stichtag 31.12.2018) gegenüber. Somit liegt der Bedarf an Spendernieren weiterhin deutlich über dem Angebot.

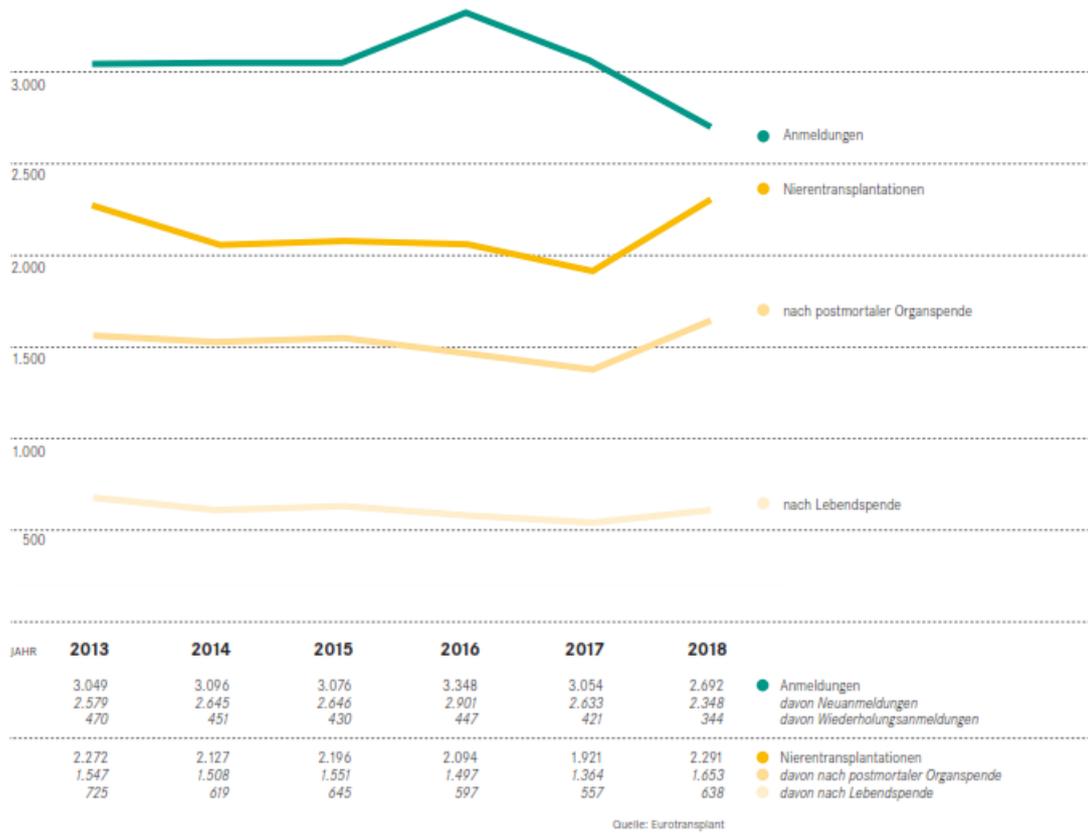


Abbildung 1: Nierentransplantationen in Deutschland 2013-2018 (aus [9])

Stadieneinteilung:**Stadien der chronischen Niereninsuffizienz**

Prognose der chronischen Niereninsuffizienz				Albuminausscheidung im Urin (mg/g)		
				A1	A2	A3
				Normal bis leicht erhöht	Mäßig erhöht	Schwer erhöht
				< 30	30–300	> 300
Glomeruläre Filtrationsrate (ml/min/1,73 m ²)	G1	Normal oder hoch	≥ 90	Niedriges Risiko	Mäßiges Risiko	Hohes Risiko
	G2	Leicht erniedrigt	60–89	Niedriges Risiko	Mäßiges Risiko	Hohes Risiko
	G3a	Leicht bis mäßig erniedrigt	45–59	Mäßiges Risiko	Hohes Risiko	Sehr hohes Risiko
	G3b	Mäßig bis schwer erniedrigt	30–44	Hohes Risiko	Sehr hohes Risiko	Sehr hohes Risiko
	G4	Schwer erniedrigt	15–29	Sehr hohes Risiko	Sehr hohes Risiko	Sehr hohes Risiko
	G5	Nierenversagen	< 15	Sehr hohes Risiko	Sehr hohes Risiko	Sehr hohes Risiko

Nach KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements* 2013; 3: 5–14

Abbildung 2: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz nach KDIGO (aus [10])

Die Stadieneinteilung der chronischen Nierenerkrankung nach KDIGO 2012 erfolgt anhand zweier Parameter, der glomerulären Filtrationsrate und der Albuminurie (**Abbildung 2**) [3]. Anhand dieser Parameter erfolgt auch die Abschätzung der Prognose der chronischen Niereninsuffizienz hinsichtlich ihrer Progression und ihrer Komplikationen.

Ursachen:

Die relative Häufigkeit der einer chronischen Niereninsuffizienz zugrunde liegenden Ursachen unterscheidet sich weltweit teils erheblich. Während in Industrienationen, aber auch bereits in vielen Schwellenländern im Zuge des Lebenswandels in einer Wohlstandsgesellschaft die führenden Ursachen Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie darstellen, spielen in Afrika südlich der Sahara und Asien Glomerulonephritiden sowie Infektionskrankheiten eine größere Rolle [11].

Im Jahresbericht 2005/2006 zur Nierenersatztherapie in Deutschland der Qua-Si Niere, in dem die Daten von über 46 000 zu diesem Zeitpunkt in Deutschland lebenden Dialysepatienten ausgewertet wurden, konnten als häufigste Ursa-

chen für das terminale Nierenversagen Diabetes mellitus (Typ I und II zusammen 28%), Glomerulonephritiden (19%) sowie vaskuläre Nephropathie (16%) ermittelt werden (**Abbildung 3**) [7].

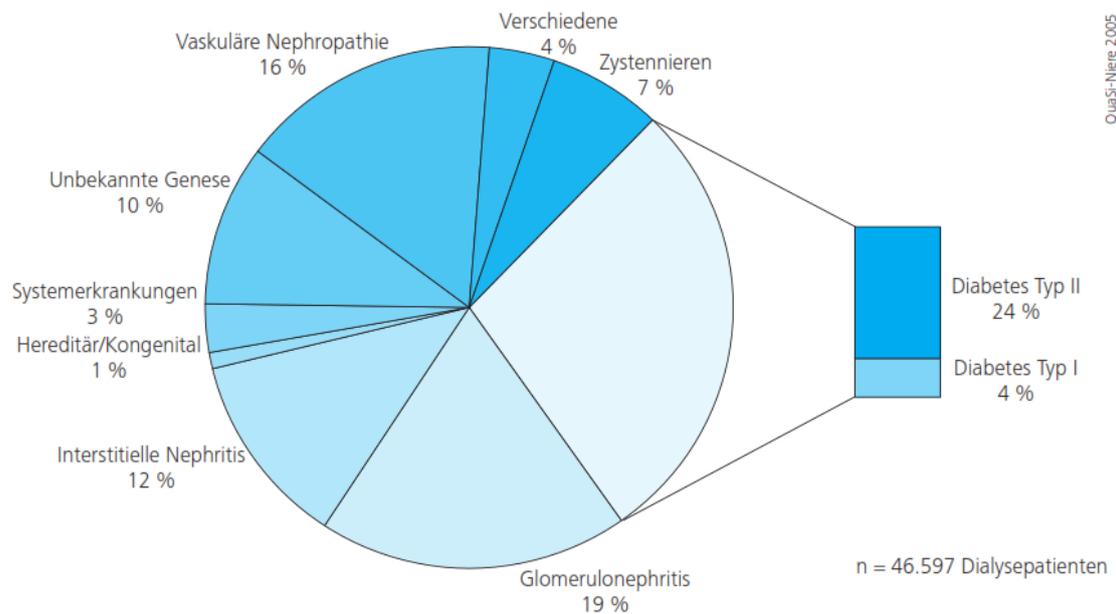


Abbildung 3: Diagnoseverteilung der von QuaSi-Niere erfassten Dialysepatienten 2005 (aus [7])

Unter den Diagnosen, die 2018 in Deutschland eine Nierentransplantation notwendig machten, finden sich die Glomerulonephritiden, die hier unter der ICD-10-Diagnose Chronisches nephritisches Syndrom geführt werden, noch vor Diabetes mellitus und der hypertensiven Nierenkrankheit an dritter Stelle (**Abbildung 4**) [9].

Indikationen für eine Nierentransplantation

Deutschland 2018 | Anzahl der häufigsten ICD-10 Hauptdiagnosen bei Neuanmeldung
DSO 280

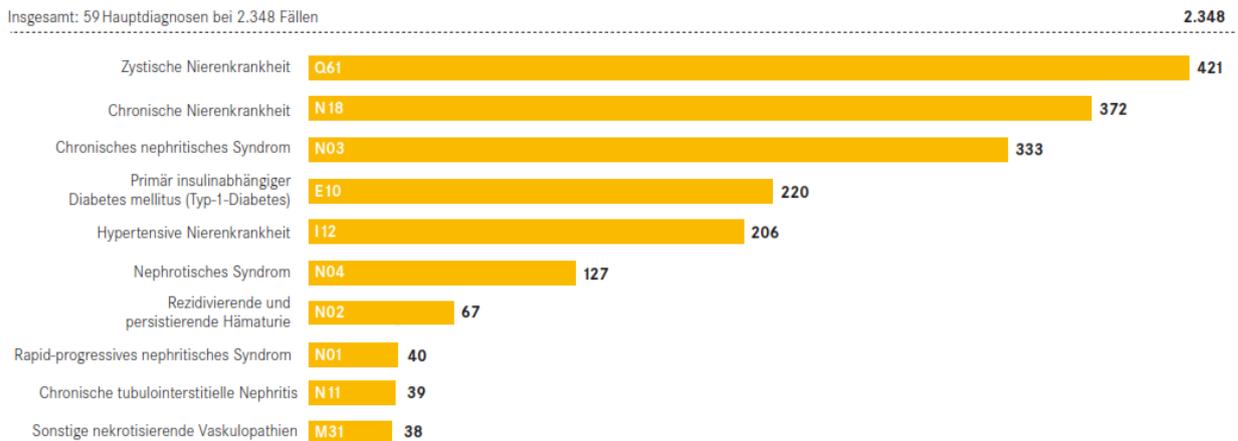


Abbildung 4: Indikationen für eine Nierentransplantation in Deutschland 2018 (aus [9])

Angesichts der wachsenden Bedeutung der chronischen Niereninsuffizienz für unser Gesundheitswesen und bei gleichzeitig tendenziell sinkender Bereitschaft zur Organspende in der Bevölkerung sind somit neue Strategien zur Therapie der chronischen Nierenerkrankung und ihrer zugrunde liegenden Pathologien dringend notwendig, um die progrediente renale Gewebeschädigung und Progression zur terminalen Niereninsuffizienz zu reduzieren.

1.2 Physiologie der Niere

Die Nieren übernehmen vielfältige Aufgaben im menschlichen Körper. Dazu gehören die Ausscheidung harnpflichtiger Stoffwechselprodukte wie beispielsweise Harnstoff, Harnsäure oder Kreatinin, sowie die langfristige Blutdruckregulation. Sie nehmen zudem eine zentrale Stellung bei der Regulation des Säure-Basen-, Elektrolyt- und Wasserhaushaltes ein. Des Weiteren sind sie Zielorgan verschiedenster extrarenal produzierter Hormone und bilden ihrerseits Hormone wie Erythropoietin oder Calcitriol. Sie spielen außerdem eine wichtige Rolle im Zwischenstoffwechsel des Gesamtorganismus [12].

Die Nieren sind ein paarig angelegtes Organ und bestehen jeweils aus Mark und Rinde. Die Blutversorgung erfolgt über die Arteria und Vena renalis und der Abfluss des in der Niere gebildeten Urins über den Ureter. Der Anteil der Nierendurchblutung am Herzzeitvolumen beträgt etwa 15-25%. Dies ist, gemessen am Gewicht der Nieren, das nur etwa 0,4% des Körpergewichts beträgt, eine verhältnismäßig starke Durchblutung. Dies erklärt sich durch das Funktionsprinzip der Nieren, welches eine Kombination aus sehr hoher Filtrationsrate auf der einen Seite und nachfolgender ausgeprägter Resorption ist. So können auf der einen Seite harnpflichtige Stoffwechselendprodukte in großen Mengen ausgeschieden werden, während andererseits die Ausscheidung von Wasser und Elektrolyten an den jeweiligen Bedarf angepasst und in großem Maße variiert werden kann [12].

Die Funktionseinheit der Nieren sind die sogenannten Nephronen (**Abbildung 5**), wovon in jeder Niere über eine Million vorhanden sind. Diese bestehen jeweils aus einem kortikal gelegenen Glomerulus sowie zugehörigem Tubulussystem. Jedes Tubulussystem hat am sogenannten juxtamedullären Apparat direkten Kontakt zum zugehörigen Glomerulus. Dies ist Voraussetzung für einen tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus, der die zusätzliche Steuerung der glomerulären Filtrationsrate in Abhängigkeit von der gegenwärtigen Harnzusammensetzung im Tubulussystem ermöglicht. Der Glomerulus ist der Ort der Entstehung des Primärharn und bezeichnet im engeren Sinne das Kapillarknäuel zwischen zuführender (Vas afferens) und abführender (Vas efferens) Arteriole. Der Primärharn ist ein Ultrafiltrat des Blutplasmas, entspricht diesem also in der Zusammensetzung, sieht man von großen, nicht filtrierte Molekülen ab. Das Blut gelangt über das Vas afferens zum glomerulären Gefäßknäuel. Hier wird das Blutplasma durch eine Filtrationsbarriere in das Innere der Bowman-Kapsel gepresst, während Blutzellen und Makromoleküle zurückgehalten werden. Die Filtrationsbarriere besteht im Wesentlichen aus drei Schichten. Diese sind das fenestrierte Endothel der Glomeruluskapillaren, die Basalmembran, in die negativ geladene Glykosaminoglykane eingelagert sind, sowie das außen auf der Basalmembran aufsitzende viszerale Epithel. Diese Epithelzellen werden als Podozyten bezeichnet, da sie miteinander verzahnte Fußfortsätze ausbilden. Entscheidend für die selektive Durchlässigkeit der Filtrationsbarriere sind somit die glomerulären Endothelzellen mit ihrer Glykokalyx, die Struktur

und elektrische Ladung der Basalmembran und die Integrität der Podozytenfußfortsätze mit der zwischen ihnen ausgebildeten Schlitzmembran. Der Filtrationsdruck wird durch den Blutdruck in den Kapillaren sowie dem onkotischen Druck im Blutplasma und dem Druck in der Bowman-Kapsel bestimmt [12].

Pro Tag werden physiologisch von beiden Nieren etwa 180 Liter Primärharn produziert, dies entspricht etwa einer glomerulären Filtrationsrate von 120ml/min pro 1,73m² Körperoberfläche. Diese ist wie oben erläutert essenziell für die Aufrechterhaltung der normalen Nierenfunktion und wird aufgrund dessen auch im klinischen Alltag als wesentlicher Parameter zur ihrer Beurteilung eingesetzt (siehe Kapitel 1.1)

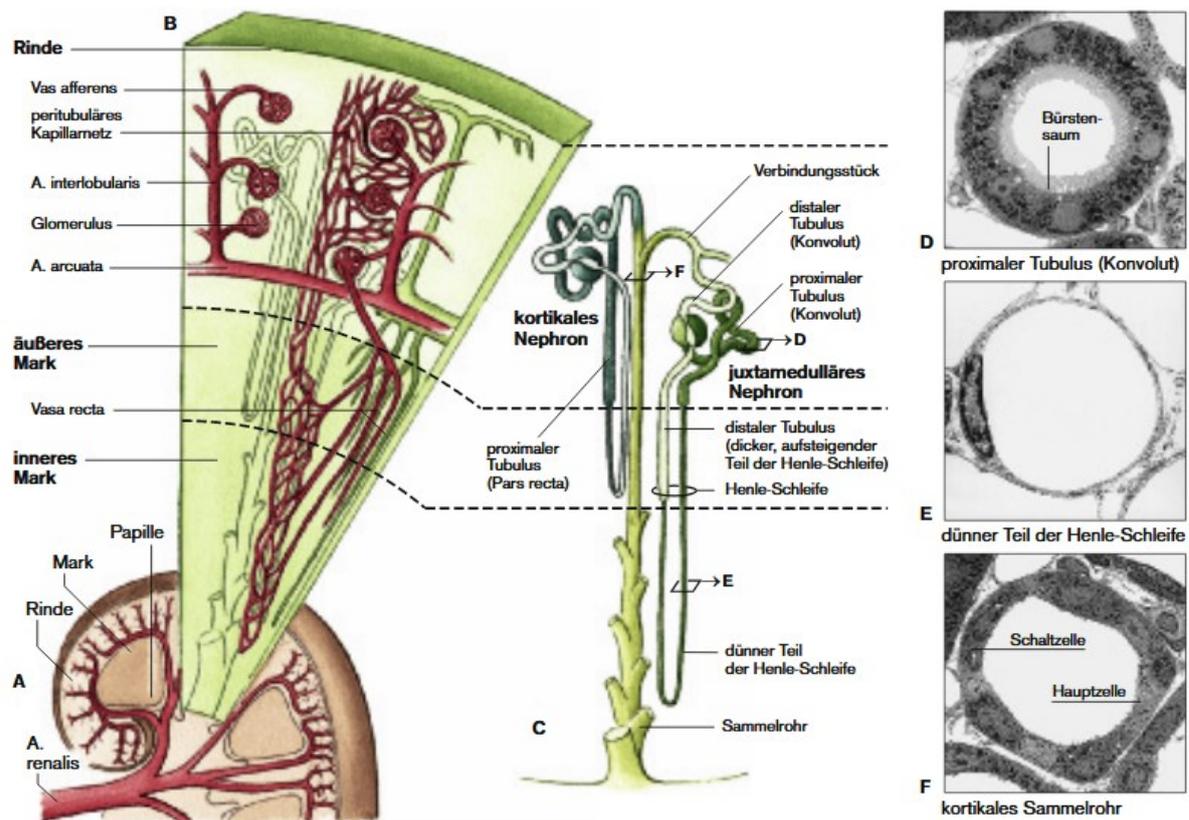


Abbildung 5: Feinstruktur der Niere (aus [12])

Im darauf folgenden Abschnitt des Nephrons, dem Tubulussystem, verändert sich die Zusammensetzung des Harns noch einmal wesentlich. Für den Körper

essenzielle Stoffe wie Elektrolyte, Glucose oder Eiweiße werden in die Tubuluszellen sowie das peritubuläre Kapillarsystem resorbiert, während bestimmte harnpflichtige Substanzen aktiv in das Tubuluslumen sezerniert werden können. Zudem erfolgt, angepasst an den gegenwärtigen Wasserhaushalt im Körper, eine Harnkonzentrierung, sodass insgesamt pro Tag im Mittel nur etwa 1-1,5 Liter Endurin ausgeschieden werden. Voraussetzung für diese immense Harnkonzentrierung ist zum einen ein aktiv aufrecht erhaltener kortikomedullärer osmotischer Gradient, die Blutversorgung des Nierenmarks im Gegenstromprinzip, die Rezirkulation von Harnstoff sowie die durch das antidiuretische Hormon (ADH) regulierte Durchlässigkeit des letzten Abschnittes des Tubulussystems, des sogenannten Sammelrohrs, für Wasser [12].

Wie oben erwähnt spielen die Nieren auch als endokrines Organ eine entscheidende Rolle. Sie sind Zielorgan einiger extrarenal produzierter Hormone wie beispielsweise ADH oder Parathormon. In den Nieren selbst findet zudem die Bildung beziehungsweise Aktivierung einiger weiterer wichtiger Hormone wie Calcitriol statt. Die Fibroblasten des Nierenkortex sind der Ort der Erythropoietin-Bildung, ein Hormon, das die Proliferation und Differenzierung der roten Blutkörperchen im Knochenmark steuert und bei Anämie oder arterieller Hypoxie vermehrt freigesetzt wird. Über das sogenannte Renin-Angiotensin-Aldosteron-System sind die Nieren zudem wesentlich an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Entscheidend hierfür ist die anatomische Besonderheit des juxtaglomerulären Apparats, wo die reninhaltigen Zellen in der Wand des Vas afferens, die Macula-densa-Zellen des zugehörigen distalen Tubulus sowie die extraglomerulären Mesangiumzellen in direktem Kontakt zueinander stehen [12]. So führt die Abnahme der GFR mit Abfall der Chlorid-Konzentration im distalen Tubulus zur Reninsekretion. Dieses bewirkt dann eine Blutdrucksteigerung mittels Vasokonstriktion sowie die vermehrte Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde [12].

Anhand dieser vielfältigen Aufgaben der Nieren lassen sich die weitreichenden Folgen eines renalen Funktionsausfalls gut nachvollziehen. Ein sehr häufiger Grund für die terminale Niereninsuffizienz ist wie in Kapitel 1.1. dargelegt, die Glomerulonephritis.

1.3 Die Glomerulonephritis

Bei Glomerulonephritiden handelt es sich um immunvermittelte, entzündliche Erkrankungen der Glomeruli beider Nieren, die mit glomerulärer Hämaturie, Proteinurie, renaler Hypertonie sowie einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate verbunden sind. Hiervon abzugrenzen sind nicht-entzündliche Glomerulopathien wie etwa bei diabetischer oder hypertensiver Nephropathie oder Amyloidose.

Grundsätzlich kann man primäre Glomerulonephritiden, bei denen keine klinischen, laborchemischen oder serologischen Hinweise auf das Vorliegen einer zugrundeliegenden immunologischen Systemerkrankung bestehen, von sekundären Glomerulonephritiden im Rahmen von autoimmunologischen, infektiösen, malignen oder metabolischen Erkrankungen sowie Medikamentenexposition unterscheiden [13].

Eine Einteilung der Glomerulonephritiden kann zudem anhand von pathogenetischen, histologischen und klinischen Kriterien erfolgen [14]. In der Pathogenese der Glomerulonephritis spielt die immunologische Schädigung der glomerulären Kapillaren eine zentrale Rolle. Diese kann vermittelt werden durch

1. die lokale Bildung von Immunkomplexen oder glomeruläre Ablagerung im Blut zirkulierender Immunkomplexe,
2. die Bildung von Autoantikörpern gegen das Typ-IV-Kollagen der glomerulären Basalmembran,
3. andere immunologische Mechanismen ohne glomeruläre Ablagerung von Antikörpern/Immunkomplexen [13].

Im ersten Fall kann eine Vielfalt an exogenen (z.B. verschiedene Bakterien oder Viren, aber auch Medikamente) und endogenen (z.B. intranukleäre Bestandteile) Antigenen zur Bildung von Antikörpern und konsekutiv Immunkomplexen führen. Diese werden glomerulär abgelagert und lösen dort eine entzündliche Reaktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems sowie eine lokale Schädigung des Glomerulus und in der Folge auch des Tubulointerstitiums aus. Hier bestimmt der Ort der abgelagerten Immunkomplexe (**Abbildung 6**) maßgeblich die Klinik und den Verlauf der Glomerulonephritis. So führen sub-

endothelial oder mesangial abgelagerte Immunkomplexe eher zu einem nephritischen Syndrom mit glomerulärer Hämaturie und Erythrozytenzylindern, während eine subepitheliale Ablagerung durch die Schädigung der Podozytenfortsätze häufig mit einem nephrotischen Syndrom mit ausgeprägter Proteinurie sowie Ödemen verbunden ist [13].

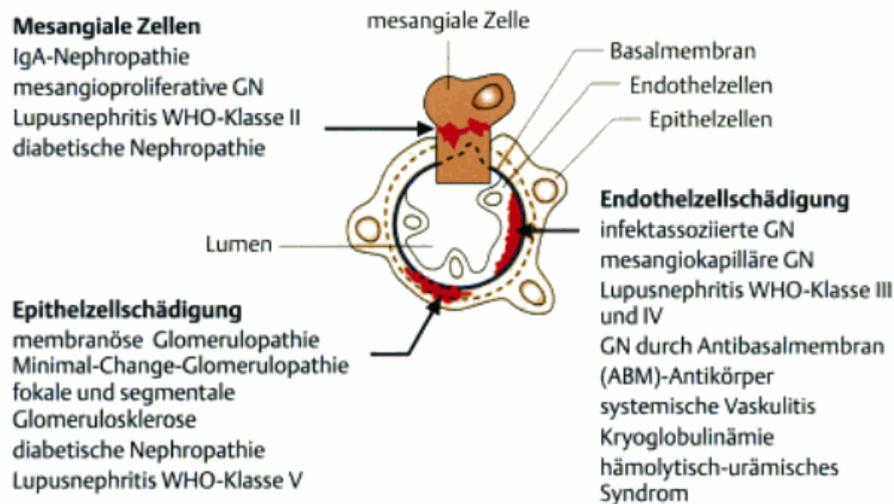


Abbildung 6: Ort der Zellschädigung bei verschiedenen Formen der Glomerulonephritis (aus [13])

Etwa 1-2% aller Glomerulonephritiden liegt dagegen die Bildung von Autoantikörpern gegen die $\alpha 3$ -Kette des Typ-IV-Kollagens der glomerulären Basalmembran zu Grunde. Hier zeigt sich klinisch häufig das Bild einer rapid progressiven Glomerulonephritis mit Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz oft innerhalb von Wochen. Treten zusätzlich pulmonale Symptome auf, sind also auch die Basalmembranen der Lungenkapillaren betroffen, spricht man von einem Goodpasture-Syndrom [13].

Es existieren jedoch auch Glomerulonephritiden, denen eine immunologische Genese zu Grunde liegt, ohne dass es zur lokalen Ablagerung von Immunkomplexen kommt. Beispiele hierfür sind die Beteiligung der glomerulären Kapillaren bei Vaskulitiden oder thrombotischer Mikroangiopathie sowie die durch Zytokine verursachte Podozytenschädigung bei Minimal-Change-Glomerulopathie oder fokal-segmentaler Glomerulosklerose [13].

Goldstandard in der Diagnostik der Glomerulonephritiden ist die Nierenbiopsie. Histopathologisch zeigen sich hierbei in variablem Ausmaß Nekrose und sklerotischer Umbau der Glomeruli, Exsudation von Leukozyten und Fibrin, Proliferation von Mesangialzellen und Endothelzellen sowie Verdickungen der Basalmembran. Anhand der histopathologischen Veränderungen kann eine Einteilung der primären Glomerulonephritiden in proliferative und nichtproliferative Glomerulonephritiden vorgenommen werden [13].

Während nichtproliferative Glomerulonephritiden klinisch oftmals durch ein nephrotisches Syndrom, charakterisiert durch eine Proteinurie $>3,5\text{g}/24\text{h}$, Hypalbuminämie, Hyperlipidämie sowie Ödemen, auffällig werden, ist der klinische Verlauf bei proliferativen Glomerulonephritiden sehr variabel. Häufig finden sich asymptomatische Urinveränderungen ohne Nierenfunktionseinschränkung, es kann aber auch zum akuten nephritischen Syndrom mit glomerulärer Hämaturie, Proteinurie, eingeschränkter Nierenfunktion sowie renaler Hypertonie bis hin zur rasch progredienten Glomerulonephritis kommen. Bei anhaltender Proteinurie und/oder Hämaturie sowie langsamen Verschlechterung der Nierenfunktion spricht man von einer chronischen Glomerulonephritis.

Trotz des weiten Spektrums an zugrunde liegenden Pathomechanismen und klinischen Verläufen, ist die verfügbare supportive und immunsuppressive Therapie der Glomerulonephritis noch immer sehr unspezifisch [15]. Zudem sind Glukokortikoide und weitere verwendete Immunsuppressiva mit teils erheblichen Nebenwirkungen verbunden und können oftmals die Progression der Glomerulonephritis zur terminalen Niereninsuffizienz nicht verhindern. Neue Strategien bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Nierenerkrankungen sind daher dringend nötig. Hierfür ist die Identifikation von pathophysiologisch relevanten sowie spezifisch therapeutisch hemmbaren Mechanismen unabdingbar.

1.4 Das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben spielen häufig bei Glomerulonephritiden vor Ort gebildete oder abgelagerte Immunkomplexe eine entscheidende Rolle. Für diese immunkomplexvermittelten Glomerulonephritiden stellt die nephrotoxische Serumnephritis (NTN) ein etabliertes Modell am Versuchstier, in der Regel Ratte oder Maus, dar. Neben der akuten Glomerulonephritis scheint die nephrotoxische Serumnephritis jedoch auch für die Untersuchung der chronischen Nierenerkrankung ein geeignetes Modell zu sein, das zudem gegenüber anderen etablierten CKD-Modellen Vorteile bezüglich Dauer und Umsetzung aufweist [16].

Basierend auf Vorarbeiten des russischen Forschers Lindemann gelang es dem Pathologen M. Masugi 1934 erstmals, ein Modell für die NTN am Versuchstier zu etablieren [17]. Es folgten Jahrzehnte der weiteren Erforschung der pathologischen sowie immunologischen Mechanismen des Modells. So konnte bereits 1936 gezeigt werden, dass die Versuchstiere nach Injektion eines nephrotoxischen Serums eine diffuse progressive Glomerulonephritis entwickeln, die in vielerlei Hinsicht der Glomerulonephritis am Menschen ähnelt [18]. Obwohl die NTN auf komplexen und teils variablen immunologischen Vorgängen beruht und über die Zeit hinweg eine Reihe an verschiedenen NTN-Modellen entstanden, können doch ein grundlegendes allgemeines Funktionsprinzip und eine charakteristische Abfolge an pathophysiologischen Vorgängen festgehalten werden, die diesen Modellen gemeinsam sind und die im Folgenden genauer charakterisiert werden.

Das Funktionsprinzip der NTN basiert auf der intraperitonealen oder intravenösen Injektion des sogenannten nephrotoxischen Serums, das polyklonale Antikörper gegen verschiedene glomeruläre Strukturen, unter anderen die glomeruläre Basalmembran, enthält. Dieses Serum wird aus Tieren einer weiteren (heterologen) Spezies, meist Schaf oder Kaninchen, gewonnen, die zuvor mit aufbereiteten glomerulären Strukturen von Ratten oder Mäusen immunisiert wurden. Grundsätzlich können bei der nephrotoxischen Serumnephritis nach Pathophysiologie und Phänotyp zwei verschiedene Phasen unterschieden werden: Die sogenannte heterologe Phase ist gekennzeichnet durch eine durch die nephrotoxischen Antikörper verursachte lokale Immunreaktion (**Abbildung 7**).

Sie beginnt bereits Minuten nach Injektion durch Ablagerung der Antikörper an glomerulären Strukturen, was zu einer lokalen Immunkomplexbildung mit nachfolgender Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt. Es kommt zur Aktivierung des Komplementsystems, Sekretion proinflammatorischer Chemokine und Zytokine sowie Rekrutierung und lokalen Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Die dadurch induzierte Entzündungsreaktion bewirkt letztendlich einen glomerulären Gewebsschaden [19].

Bei Injektion einer ausreichend hohen Dosis des nephrotoxischen Serums beginnt etwa eine Woche danach die autologe Phase der NTN (**Abbildung 7**). C. Kay zeigte bereits 1940, dass hierfür eine gegen die glomerulär abgelagerten heterologen Antikörper gerichtete systemische adaptive Immunantwort entscheidend ist [20]. Diese scheint im Sinne einer zellulären Immunreaktion Typ IV nach Coombs und Gell abzulaufen. Lokal und in sekundären lymphatischen Geweben erfolgt die Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen und Makrophagen. In der Folge gereifte und aktivierte B-Zellen produzieren autologe Antikörper gegen die glomerulär abgelagerten heterologen nephrotoxischen Antikörper, was zur Bildung von größeren Immunkomplexen aus autologen sowie heterologen Antikörpern im Glomerulus führt, die die lokale Inflammationsreaktion verstärken [19]. Werden dem Versuchstier vor der Injektion des nephrotoxischen Serums subkutan heterologe Antikörper verabreicht, so ist eine zusätzliche Verstärkung dieser adaptiven Immunantwort zu beobachten. Durch diese sogenannte Präimmunisierung führen auch andernfalls nicht ausreichende subnephritische Dosen des nephrotoxischen Serums zur Entwicklung einer Glomerulonephritis [19].

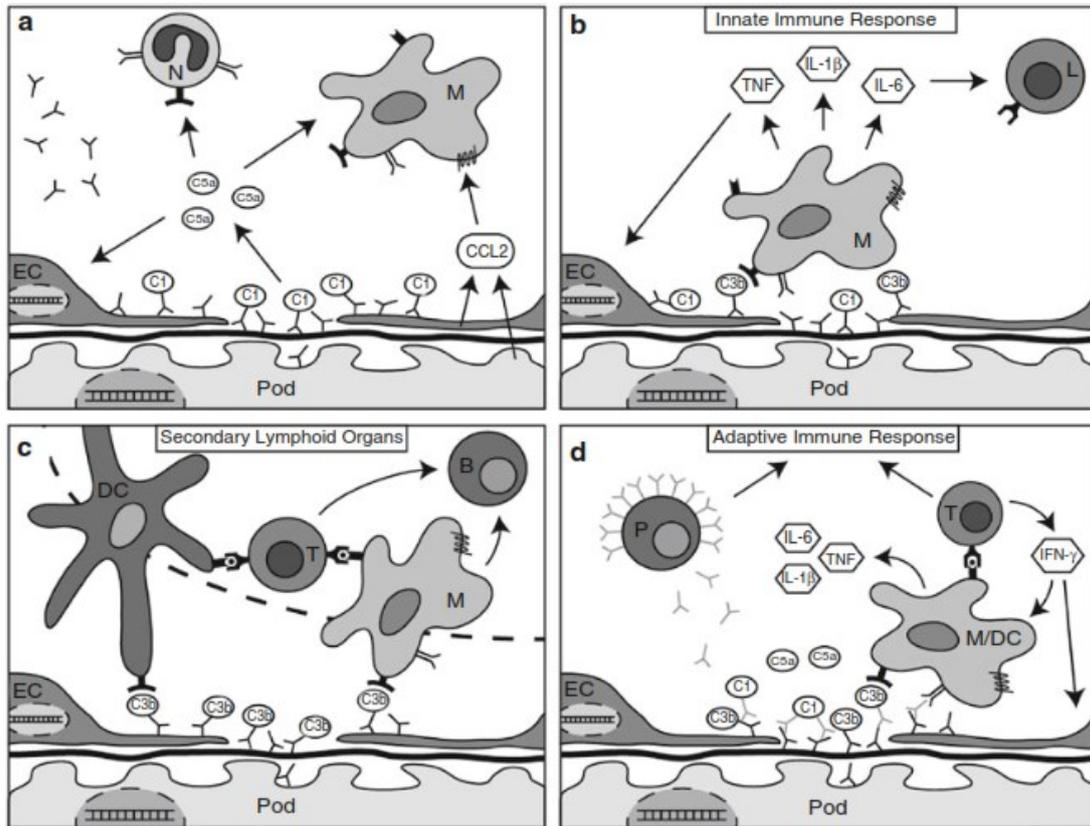


Abbildung 7: Pathophysiologische Mechanismen der heterologen und autologen Phase der NTN (nach Hoppe et al. [19])

(a) Initiale Bindung der heterologen nephrotoxischen Antikörper an glomeruläre Strukturen wie glomeruläre Basalmembran, Endothelzellen und Podozyten. Die Bildung von Immunkomplexen führt zur Aktivierung des Komplementsystems (C1, C3b, C5a), was die Rekrutierung von Neutrophilen (N) und Monozyten (M) zur Folge hat. Zusätzliche Sekretion von proinflammatorischen Chemokinen wie CCL2/MCP-1 und Zytokinen durch glomeruläre Zellen verstärkt diese Leukozyteninfiltration. (b) Die durch das Komplementsystem opsonierten heterologen Antikörper werden durch aktivierte Phagozyten aufgenommen, die daraufhin weitere Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF sezernieren. Die dadurch in Gang gesetzte Signalkaskade bewirkt zusammen mit weiterer Leukozyteninfiltration und -aktivierung letztendlich die glomeruläre Schädigung. (c) Vor Ort oder in sekundären lymphatischen Organen erfolgt die Aktivierung von T-Lymphozyten durch dendritische Zellen und Makrophagen mittels Präsentation von Antigenepitopen der nephrotoxischen heterologen Antikörper. Diese aktivierten T-Zellen bewirken eine Plasmazellreifung in den sekundären lymphatischen Organen. (d) Im Nierengewebe folgt die wechselseitige Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen sowie die Sekretion von Effektorzytokinen wie IFN γ . Zudem werden durch gereiften Plasmazellen autologe Antikörper produziert, die mit den heterologen Antikörper Immunkomplexe bilden und so die lokale Inflamationsreaktion weiter verstärken.

Die Phänotypanalyse in beiden Modellen kann analog erfolgen, jedoch sollte der Zeitrahmen der heterologen Phase als Modell für eine akute Glomerulonephritis nur etwa eine Woche ab Injektion des nephrotoxischen Serums umfassen, da von hier an eine signifikante Produktion von autologen Antikörpern zu

erwarten ist [19]. Sowohl im heterologen als auch im autologen Modell kann eine Nierenschädigung nachgewiesen werden. So treten eine Hämaturie und Proteinurie als Zeichen eines glomerulären Schadens, ein nephrotisches Syndrom mit Hypoproteinämie und Hyperlipoproteinämie sowie ein Anstieg der Retentionsparameter im Sinne einer exkretorischen Niereninsuffizienz auf [19]. Im autologen Modell mit chronisch progredientem Verlauf entwickelt sich zudem eine sekundäre tubulointerstitielle Nephritis und Fibrose.

1.5 RIPK1-, RIPK3- und MLKL-vermittelter Zelltod

Regulierter Zelltod:

Für mehrzellige Organismen ist Zelltod ein essenzieller Mechanismus im Rahmen von physiologischen Wachstumsprozessen und Homöostase, aber auch, um auf eine Zellschädigung zu reagieren. Wirken extreme Stressoren wie beispielsweise Hitze oder oxidativer Stress direkt auf Zellen ein, tritt passiver Zelltod mittels Nekrose auf [21]. Hier kommt es zur Zellschwellung, Ruptur der Plasmamembran und damit zur Freisetzung von intrazellulären Zellbestandteilen. Diese sogenannten *Danger Associated Molecular Patterns* (DAMP) fungieren als Warnsignal und bewirken eine wesentliche Stimulation des angeborenen und in der Folge auch des adaptiven Immunsystems [22]. Im Unterschied dazu wurde 1972 erstmals eine Form des regulierten, nicht immunogenen Zelltodes beschrieben [23]. Diese sogenannte Apoptose ist morphologisch klar von der Nekrose abgrenzbar. Hier kommt es zur Fragmentierung von DNA, Kondensation von Chromatin und Bildung sogenannter Apoptosekörperchen, ohne dass hierbei DAMPS freigesetzt werden. Diese Bruchstücke werden dann von umliegenden Zellen phagozytiert und abgebaut. So können Zellen beispielsweise während Wachstums- und Entwicklungsprozessen absterben, ohne eine Aktivierung des Immunsystems mit nachfolgender Entzündungsreaktion zu verursachen. Dies führte über lange Zeit hinweg zu der Annahme, dass Apoptose und Nekrose diametrale und exklusive Ausprägungen von Zelltod seien, der entweder reguliert und nicht immunogen im physiologischen Kontext auftritt, oder unreguliert und immunogen im Rahmen von Pathologien. Diese Auffassung musste revidiert werden, als in den letzten Jahren eine Reihe weiterer Formen des Zelltodes beschrieben wurde, die durch klar definierte, intrazellulär

aktivierte Signalwege ausgelöst werden, im Gegensatz zur Apoptose aber mit einer starken Stimulation des Immunsystems einhergehen. Eine Übersicht über die Formen dieser regulierten Nekrose im Vergleich zur Apoptose findet sich in **Abbildung 8**.

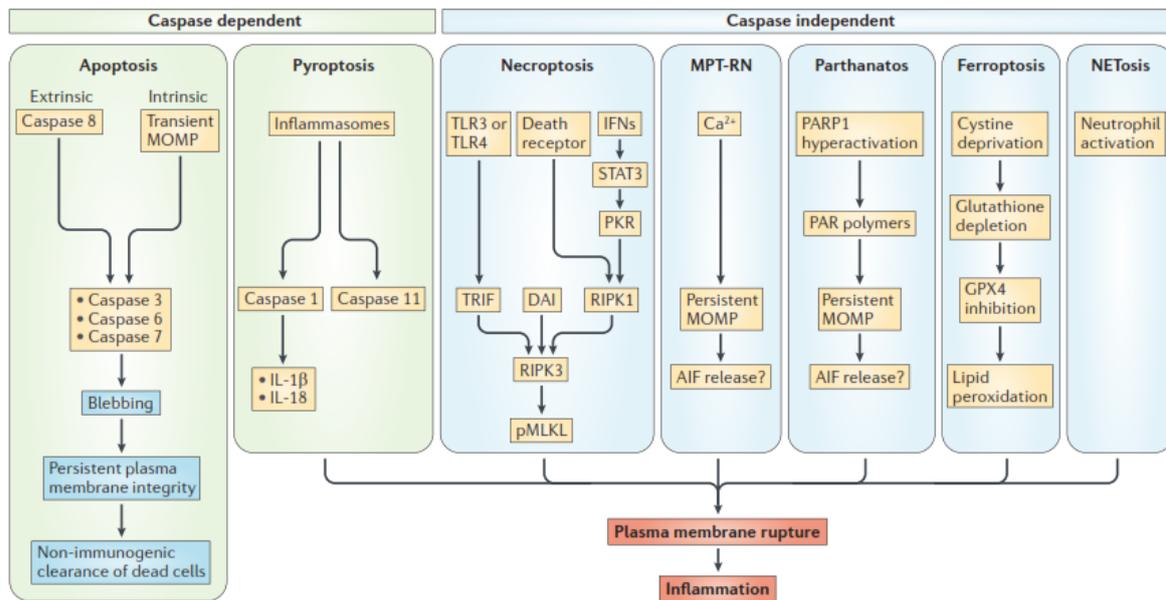


Abbildung 8: Übersicht über Mechanismen des regulierten Zelltodes (aus [21])

Circulus vitiosus aus reguliertem Zelltod und Inflammation:

Bei aller Vielfalt ist es den unterschiedlichen Formen des regulierten Zelltodes, von der Apoptose abgesehen, gemein, dass sie letztendlich zur Zellmembranruptur und damit zur Freisetzung von DAMPs mit nachfolgender Entzündung führen [21]. Auch konnten verschiedene Studien zeigen, dass die Hemmung verschiedener Arten regulierten Zelltodes mit geringeren Serumkonzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen verbunden war [21]. Über diese Mechanismen wirkt regulierter Zelltod als potenter Trigger für das angeborene Immunsystem. Auf der anderen Seite können proinflammatorische Zytokine, die von sterbenden Parenchymzellen, aber auch von infiltrierenden Immunzellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion freigesetzt werden, ihrerseits wiederum regulierten Zelltod auslösen. Einige der dafür notwendigen Mechanismen werden im folgenden Abschnitt näher erläutert. So entstand die Theorie, dass sich regulierter nekrotischer Zelltod und Inflammation in einer Art Circulus vitiosus gegensei-

tig bedingen und verstärken (**Abbildung 9**). Dieser Prozess der Nekroinflammation mündet letztendlich in Gewebeschaden und Organversagen [21].

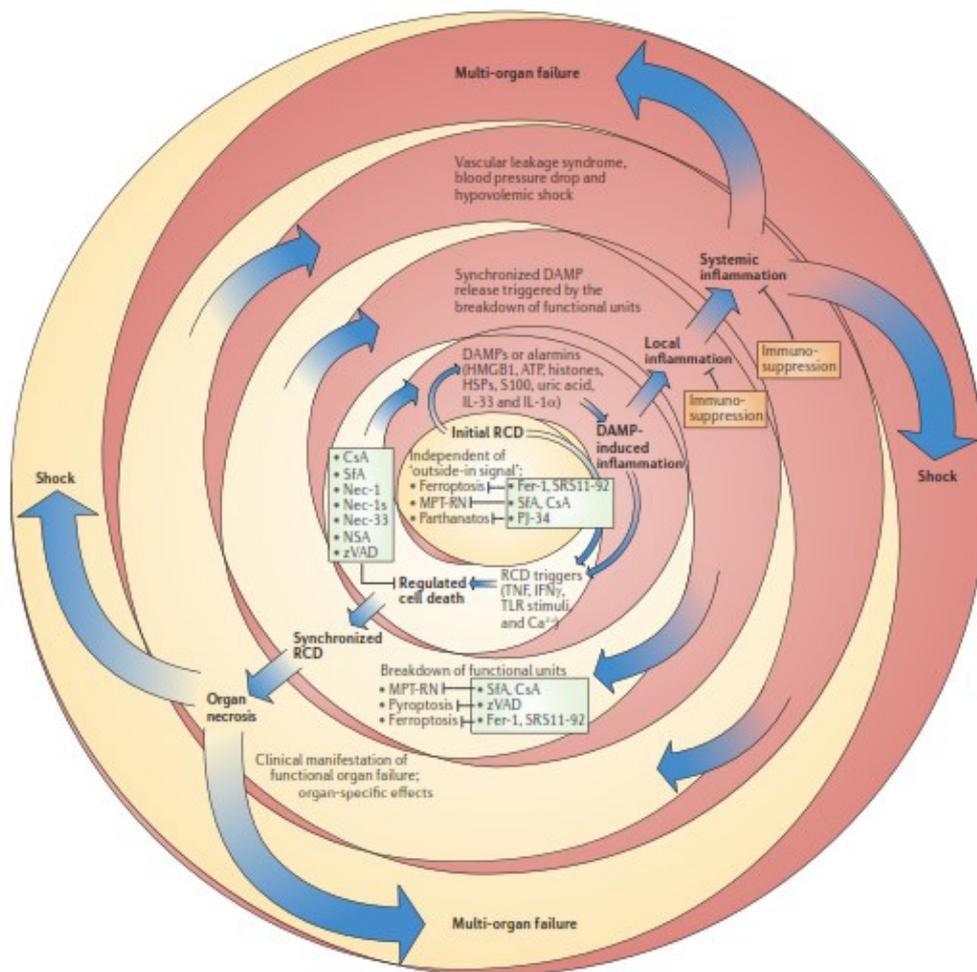


Abbildung 9: Circulus vitiosus aus reguliertem Zelltod und Inflammation (aus [21])

Nekroptose:

Eine Form des regulierten Zelltodes, die in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erfuhr und deren biochemischer Ablauf relativ gut beschrieben wurde, ist die sogenannte Nekroptose. An zentraler Stelle in diesem Signalweg stehen die intrazellulären Adaptormoleküle *Receptor Interacting Protein Kinase* (RIPK) 1 und 3 sowie deren Effektorprotein *Mixed Lineage Kinase Domain-Like* (MLKL). Aus diesem Grunde wird in der vorliegenden Arbeit, den Empfehlungen des *Nomenclature Committee on Cell Death* von 2012 folgend, der Begriff Nekroptose im Sinne eines „von RIPK1 und/oder RIPK3 abhängigen nekrotischen

Zelltodes“ verwendet [24]. RIPK1 ist ein Adaptormolekül mit Kinaseaktivität, das über verschiedene Domänen unterschiedliche zelluläre Signaltransduktionswege in Gang setzen kann. Es besitzt eine N-terminale Kinase-Domäne, eine intermediäre Domäne sowie am C-terminalen Ende eine sogenannte RHIM-Domäne und eine *Death Domain*. Bis auf die *Death Domain* am C-terminalen Ende finden sich homologe Domänen auch bei RIPK3 [25]. MLKL hingegen ist eine Pseudokinase ohne oder mit lediglich gering ausgeprägter Kinase-Aktivität. Entscheidend für seine Funktion als Effektorprotein der Nekroptose ist eine *Four Helical Bundle*-Domäne am N-Terminus [25].

Die Aktivierung der Nekroptose kann über Zellmembranrezeptoren wie den TNF-Rezeptor 1, *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor* (TRAILR), FAS oder *Toll-like*-Rezeptoren erfolgen. Zudem wurde gezeigt, dass auch intrazelluläre Auslöser für Nekroptose existieren. So können *DNA-Dependent Activator of Interferon-Regulatory Factors* (DAI), ein Sensor für virale Nukleotide, oder Interferone über die Proteinkinase R (PKR) ebenfalls über verschiedene Signalwege eine Aktivierung von RIPK3 bewirken [21, 25, 26]. Am besten charakterisiert wurde der Signalweg nach Aktivierung des proinflammatorischen Zytokinrezeptors TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) durch TNF α (**Abbildung 10**). Nach Bindung von TNF α und Trimerisierung des Rezeptors werden intrazellulär RIPK1 und das Adaptermolekül *TNF-Receptor-Associated Death Domain* (TRADD) zum TNFR1 rekrutiert. Zusammen mit weiteren Proteinen wie *TNF Receptor Associated Factor* (TRAF) 2/5 sowie *Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein* (cIAP) 1 und 2 folgt die Bildung eines Komplex an der zytosolischen Seite des TNFR1 (Komplex I) (**Abbildung 10a**) [25, 27]. Grundsätzlich werden durch Komplex I über die Rekrutierung des sogenannten I κ B Kinase Komplexes der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert und so proinflammatorische Effekte von TNF α vermittelt (**Abbildung 10b**). Werden die im Komplex enthaltenen Apoptose-hemmenden Moleküle cIAP 1 und 2 ihrerseits gehemmt, dissoziieren TRADD und RIPK1 vom TNFR1 und im Zytoplasma wird Komplex II gebildet (**Abbildung 10c**). Dieser kann regulierten Zelltod in Form von Apoptose, sowie, bei Hemmung beziehungsweise Abwesenheit Apoptose-induzierender Moleküle wie Caspase 8, Nekroptose vermitteln [25, 27]. Zur Induktion der Apoptose ist zwar RIPK3, nicht jedoch die RIPK3-Kinaseaktivität erforderlich. So führt eine

spezifische Hemmung der RIPK3-Kinaseaktivität zur vermehrt ablaufender Apoptose, während Nekroptose blockiert wird [28, 29].

In Abwesenheit oben genannter Apoptose-induzierender Moleküle wird RIPK3 durch RIPK1 aktiviert, mit dem es über die sogenannten *RIP Homotypic Interaction Motif* (RHIM)-Domänen interagiert. Es kommt zur Auto- und Fremdphosphorylierung der beiden Moleküle durch deren Kinase-Domänen und, unterstützt durch HSP90 und Cochaperone, zur Bildung des sogenannten Nekrosoms, einer dem β -Amyloid ähnelnden Struktur (**Abbildung 10d**) [30]. Das Effektormolekül MLKL ist als Bindungspartner von RIPK3 Bestandteil dieses Komplexes und wird durch RIPK3 mittels Phosphorylierung aktiviert [25]. In der Folge lagert sich MLKL an Phospholipide der Plasmamembran an und führt über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen letztendlich zu einer gesteigerten Membranpermeabilität und einem Einstrom von Ionen in die Zelle, was Zellschwellung und schließlich Zelltod verursacht. Für die durch RIPK1 und RIPK3 vermittelte Nekroptose ist jeweils eine intakte Kinase-Domäne dieser Adaptermoleküle erforderlich [25, 31]. Unabhängig von seiner Kinaseaktivität kann RIPK3 auch proinflammatorische Effekte vermitteln. Unter bestimmten Bedingungen beeinflusst RIPK3 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und damit die Genexpression proinflammatorischer Zytokine [31, 32]. Zudem kann RIPK3 über die Aktivierung des sogenannten NLRP3-Inflammasoms, eines Multiproteinkomplexes, zur verstärkten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β sowie IL-18 beitragen [32].

Nekroptose kann auch unabhängig von RIPK1 ausgelöst werden. So erfolgt bei einigen viralen Infektionen die Aktivierung von RIPK3 und MLKL in Abhängigkeit von dem cytoplasmatischen Sensor DAI/ZBP1. Auch eine Stimulation des TLR3-Rezeptors kann über das Adaptermolekül *TIR Domain-Containing Adaptor Protein Inducing IFN β* (TRIF) zu einer von RIPK1 unabhängigen RIPK3-vermittelten Nekroptose führen [25].

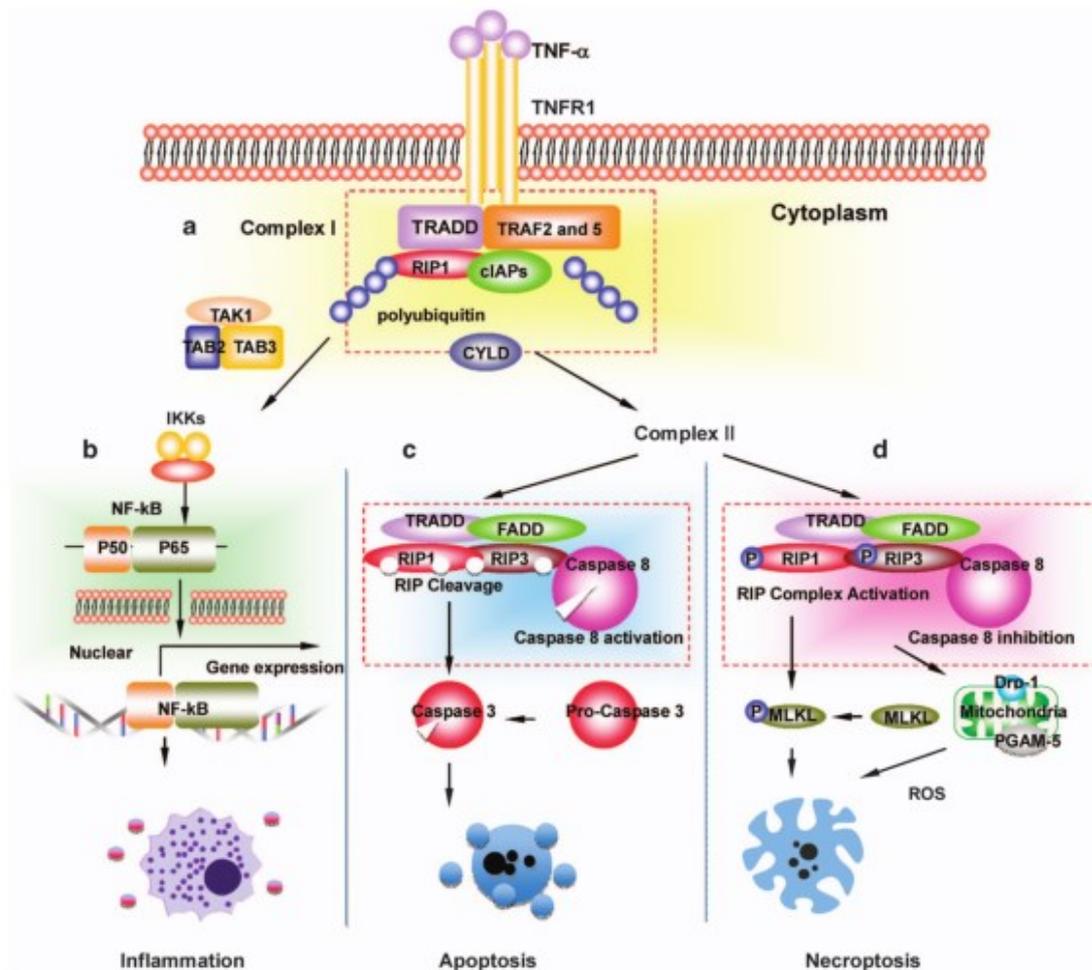


Abbildung 10: Signalwege nach Aktivierung von TNFR1 durch TNF α (aus [33])

Pathophysiologische Bedeutung der Nekroptose:

In den letzten Jahren zeigten Studien an verschiedenen Krankheitsmodellen, dass der Nekroptose und dem Prozess der Nekroinflammation eine signifikante Rolle in der Pathophysiologie einiger Krankheiten zukommt. Diese umfassen Ischämie- bzw. Ischämie-Reperfusionen-Modelle an Gehirn, Myokard und Niere, Modelle für neurodegenerative Erkrankungen wie Chorea Huntington oder Morbus Alzheimer, aber auch Modelle für entzündliche Erkrankungen wie der akuten Pankreatitis oder chronisch entzündlicher Darmerkrankungen [33, 34]. Hier konnten durch Inhibition von RIPK1 oder durch Deletion von RIPK3 protektive Effekte nachgewiesen werden. Auch bei einem Mausmodell für eine Allo-transplantation der Niere konnte ein signifikanter Überlebensvorteil bei RIPK3-

depletierten Nieren gezeigt werden [26]. Angesichts dieser Ergebnisse scheint eine Inhibition von Nekroptose eine vielversprechende neue therapeutische Strategie bei vielen Erkrankungen zu sein, insbesondere, da bereits mehrere Inhibitoren des Nekroptose-Signalwegs bekannt sind. So stabilisieren beispielsweise der kleinmolekulare Inhibitor Necrostatin-1 (Nec-1) sowie dessen Derivate RIPK1 in einer inaktiven Form. Ein protektiver Effekt von Nec-1 oder Nec-1s auf verschiedene *in vivo*-Modelle konnte bereits gezeigt werden. Auch Necrosulfonamid (NSA), ein Inhibitor der Pseudokinase MLKL, könnte als Nekroptose-Blocker potentiellen therapeutischen Nutzen haben [33].

1.6 Hypothese der Arbeit

Auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen ist davon auszugehen, dass Inflammation und regulierter Zelltod interagieren und sich gegenseitig verstärken. Aus diesem Grunde scheint es hier sinnvoll, bei der Behandlung immunsuppressive Therapeutika mit Inhibitoren der regulierten Nekrose zu kombinieren, um therapeutisch beide Komponenten der Nekroinflammation synergistisch zu beeinflussen. Hierfür ist es nötig, bei entzündlichen Nierenerkrankungen wie der progredienten Immunkomplex-Glomerulonephritis pathophysiologisch relevante sowie einer therapeutischen Blockade zugängliche Mechanismen der regulierten Nekrose zu identifizieren.

Da für RIPK1-/RIPK3-vermittelte Nekroptose, nicht aber für die Vermittlung proinflammatorischer Effekte mittels NF- κ B eine intakte Kinase-Domäne von RIPK1 sowie RIPK3 erforderlich ist, sind transgene Mäuse, denen jene Kinaseaktivität fehlt, besonders dazu geeignet, die pathophysiologische Rolle der Nekroptose unabhängig von inflammatorischen Funktionen dieser Moleküle in verschiedenen Krankheitsmodellen zu untersuchen [31]. Das eigentliche Effektormolekül der Nekroptose ist jedoch MLKL. In MLKL-*Knockout*-Mäusen konnte eine effektive Blockade der Nekroptose in mehreren Krankheitsmodellen nachgewiesen werden, während proinflammatorische Effekte nicht beeinträchtigt waren [35]. Während für RIPK1 und 3 mehrere Nekroptose-unabhängige Funktionen beschrieben wurden [36-40], scheint MLKL ausschließlich Funktionen im Rahmen der Nekroptose auszuüben. So werden MLKL-*Knockout*-Mäuse

als das spezifischste System angesehen, den Einfluss der Nekroptose im Krankheitsmodell zu untersuchen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aus diesen Gründen der Verlauf einer chronischen Immunkomplex-Glomerulonephritis im Mausmodell der nephrotoxischen Serumnephritis in transgenen Mäusen mit fehlender Kinaseaktivität von RIPK1 oder RIPK3 sowie in MLKL-*Knockout*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren untersucht.

Der Arbeit lagen dabei folgende Hypothesen zu Grunde:

1. Ein Fehlen der RIPK1-Kinaseaktivität führt zu verminderter Nekroptose, konsekutiv verminderter Inflamationsreaktion und dadurch zu einem verbesserten Verlauf der Glomerulonephritis, der sich durch einen geringeren Gewebeschaden und verbesserte funktionelle Parameter auszeichnet.
2. Ein Fehlen der RIPK3-Kinaseaktivität bewirkt ebenfalls verminderte Nekroptose und Inflammation und verbessert damit den Verlauf der Glomerulonephritis.
3. Auch ein Fehlen des Effektorproteins MLKL verursacht verminderte Nekroptose, Inflammation und einen verbesserten Verlauf der Glomerulonephritis.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Autoklav:

Autoklav 23 Melag Medizintechnik, Berlin

Durchflusszytometrie:

FACSCalibur Becton Dickinson, San Jose, USA

Elektrophorese:

miniVE Vertical Electrophoresis System GE, Freiburg

Blotting-System Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

ELISA:

ELISA-Reader Tecan, GENios Plus Tecan, Crailsheim

MRX Microplate Reader Dynatech Laboratories, Alexandria, USA

Microplate-Washer Elx 50 Biotek, Bad Friedrichshall

Histologische Aufbereitung:

Einbettssystem EC 350-2 Myr, Llorenç del Penedès, ESP

Gewebeprozessor Citadel 2000 Thermo Fisher Inc., Waltham, USA

Mikrotom HM 340E Microm, Heidelberg

Homogenisator:

RW 20 IKA GmbH, Staufen

Mikroskop:

Leica DM RBE Leica Microsystems, Wetzlar

Pipetten:

Pipetten Pipetman classic Gilson, Middleton, USA

Multikanalpipette Eppendorf, Hamburg

Pipettierhilfe Pipetus classic Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Real-Time-PCR:

Lightcycler 480 Roche, Basel, CH

Spektrophotometrie:

Nanodrop ND-1000 PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

Thermozykler:

Mastercycler pro 6321 Vapo protect Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen:

Eppendorf centrifuge 541C Eppendorf, Hamburg

Heraeus Biofuge Primo Heraeus Sepatech, Osterode

Heraeus Megafuge 1.0R Heraeus Sepatech, Osterode

Sonstige Geräte:

pH-Meter WTW WTW GmbH, Weilheim

Sicherheitswerkbank Microflow Nunc GmbH, Wiesbaden

Sonifier B-12 Branson, Danbury, USA

Thermomixer 5436 Eppendorf, Hamburg

Vortex Genie 2 Bender&Hobein AG, Zürich, CH

Waage BP 110S Sartorius, Göttingen

Waage Mettler PJ 3000	Mettler-Toledo, Greifensee, CH
Wasserbad HI 1210	Leica Biosystems, Wetzlar

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Albustix Teststreifen	Bayer, Leverkusen
Einbettkassetten	neoLab Migge, Heidelberg
Einmalpipetten 10ml	Greiner, Kremsmünster, AT
Eppendorfgefäße 0,5ml-2ml	Eppendorf, Hamburg
Filter 70µm	Becton Dickinson, Heidelberg
Filtereinheit MN Sterilizer CA 0,2µm	Machery-Nagel, Düren
Käfige Eurostandard Typ II L	Tecniplast, Hamburg
Kanülen BD Microlance 20G; 26G; 30G	Becton Dickinson, Heidelberg
LightCycler 480 Multiwell-Platte 96	Roche, Basel, CH
Menzel Objektträger	Thermo Fisher Inc., Waltham, USA
Nunc 96-well-Platten	Thermo Fisher Inc., Waltham, USA
Petrischalen Ø 60mm und 96mm	TPP, Trasadingen, CH
Pipettenspitzen 10-1000µl Typ Gilson	Peske, Aindling-Arnhofen
PVDF Transfermembran Immobilon-P	Millipore, Schwalbach
Skalpelle Feather No.10/11	Feather Safety Razor Co, Osaka, JP
Spritzen 2ml, 5ml, 10ml	Becton Dickinson, Heidelberg

Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml TPP, Trasadingen, CH

2.1.3 Chemikalien und Puffer

Chemikalien:

Acrylamid	Ambion, Darmstadt
Acrylamid 30% (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Thermo Fisher Inc., Waltham, USA
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat 10%	BioRad, München
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
ChromePure Sheep IgG	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Complete Freund's Adjuvans	Sigma Aldrich, Steinheim
DNA-Leiter 100bp	Thermo Fisher Inc., Waltham, USA
DNase Typ IV	Sigma, Deisenhofen
dNTP	GE Healthcare, München
DTT (0,1M)	Thermo Fisher Inc., Waltham, USA
ECL Prime	Amersham, GE, Freiburg
EDTA	Merck, Darmstadt

Einbettmedium	Jung, Leica Biosystems, Nussloch
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FACS Clean	BD, Heidelberg
FACS Flow	BD, Heidelberg
FACS Rinse	BD, Heidelberg
5x First Strand Buffer	Thermo Fisher Inc., Waltham, USA
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Hexanukleotide	Roche, Mannheim
HCl	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Sigma, Deisenhofen
Methylgrün	Sigma, Deisenhofen

MgCl ₂ (25mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
NaCl	Braun, Melsungen
NaOH	Merck, Darmstadt
NaN ₃	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
NiCl ₃	Sigma, Deisenhofen
Normal Mouse Serum	Jackson, West Grove, USA
Normal Rat Serum	Jackson, West Grove, USA
PBS	Pan Biotech, Aidenbach
PCR Direct Lyse-Puffer	PeqLab, Erlangen
PCR Optimizer BioStab	Bitop, Witten
PCR-Puffer	Minerva BioLabs, Berlin
Periodic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma, Deisenhofen
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Protein Assay	BioRad, München
PureLink RNA Mini Kit	Ambion, Darmstadt
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNasin (40U/μl)	Promega, Mannheim

Sodiumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
Shandon Formal Fixx	Thermo Fisher Inc., Waltham, USA
Sheep Anti-Rat Glomeruli (GBM) Serum (PTX 001-S)	Probetex, San Antonio, USA
SuperScript II	Thermo Fisher Inc., Waltham, USA
SYBR Green I Farbstoff	Applied Biosystems, Norwalk, USA
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden
Taq Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
10x Taq-Puffer ohne Detergenz	Fermentas, St. Leon-Rot
TEMED	BioRad, München
ThermoPol Puffer	New England Biolabs, Ipswich, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tween 20 Detergent	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
VectaMount Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Xylen	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe

Puffer:

Genotypisierung:

6x Glycerinaldehydpuffer:

25ml 50% Glycerin, 0,125g 0,25% Bromphenolblau, 0,125g 0,25% Xylencyanol,
10ml 100mM EDTA, 15ml H₂O

10x TBE-Puffer:

108g Tris, 55g Borsäure, 5,84g EDTA auf 1l Wasser aufgefüllt

Durchflusszytometrie:

FACS-Puffer:

500ml 1xPBS, 0,2% BSA, 0,1% Na-Azid

TAC-Puffer:

1,03g Tris, 3,74g Ammoniumchlorid in 500ml H₂O (pH 7,2)

Western Blot:

Tris Buffered Saline (TBS):

50mM Tris, 150mM NaCl mit H₂O auf 100ml auffüllen (pH 7,6)

Tris Buffered Saline Tween-20 (TBS-T):

0,1% Tween-20 in TBS

Running Buffer:

3g Tris, 14,4g Glycin, 0,5g SDS mit H₂O auf 1000ml auffüllen (pH 8,3)

Transfer Buffer:

1,5g Tris, 7,2g Glycin mit H₂O auf 500ml auffüllen

Stripping Buffer:

8g NaOH mit H₂O auf 500ml auffüllen

Ladepuffer nach Lämmli (10x):

2g SDS, 1mg Bromphenolblau, 1ml Glycerol, 2,5ml β -Mercaptoethanol, 5ml 1M Tris HCl (pH 6,8), 1,5ml H₂O

2.1.4 Antikörper und Enzyme

Durchflusszytometrie:

Anti-CD3e-FITC	BD, Heidelberg
Anti-CD4-APC	BD, Heidelberg
Anti-CD8-PE.Cy5	BD, Heidelberg
Anti-CD69-PE	BD, Heidelberg

ELISA:

IgG-FITC <i>goat anti-mouse</i>	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
<i>Mouse Albumin ELISA Kit</i>	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
<i>Creatinine FS Kit</i>	DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim

Immunhistologie und Immunfluoreszenz:

<i>hamster anti-mouse CD3</i>	BD, Heidelberg
<i>rat anti-mouse ER-HR3</i>	BMA Biomedicals, Augst, CH
<i>rat anti-mouse F4/80</i>	Serotec, Düsseldorf
<i>goat anti-mouse IgG</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>rat anti-mouse MAC-2</i>	Cedarlane, Ontario, Kanada
<i>In Situ Cell Death Detection Kit (TUNEL)</i>	Roche, Mannheim

Western Blot:

Maus anti-RIP1, Klon 7/H10	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-RIP3, polyklonales Serum	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti- β -Actin, polyklonales Serum	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Anti-Maus IgG, HRP, polyklonales Serum	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Anti-Kaninchen IgG, HRP, polyklonales Serum	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK

2.1.5 Primer für die *Real Time*-PCR**Tabelle 1: Verwendete Primer für die quantitative *real-time* PCR**

<i>Gen</i>	<i>Forward-Primer</i>	<i>Reverse-Primer</i>
RIPK1	5'-GACTGTGTACCCTTACCTCCGA-3'	5'-CACTGCGATCATTCTCGTCCTG-3
RIPK3	5'-GAAGACACGGCACTCCTTGGTA-3'	5'-CTTGAGGCAGTAGTTCTTGGTGG-3'
Nephrin	5'-ACCCTCCATTAACCTTGTCTTGG-3'	5'-ATGCAGCGGAGCCCTTGA-3'
TIMP-2	5'-CGTTTTGCAATGCAGACGTA-3'	5'-GAATCCTCTTGATGGGGTTG-3'
NGAL	5'-AATGTCACCTCCATCCTGGT-3'	5'-ATTTCCCAGAGTGAAGTGGC-3'
Fibronectin	5'-GGAGTGGCACTGTCAACCTC-3'	5'-ACTGGATGGGGTGGGAAT-3'
Procollagen1	5'-ACATGTTTCAGCTTTGTGGACC-3'	5'-TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3'
TNFα	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'	5'-AGGGTCTGGGCCATAGAAGT-3'
IL-1β	5'-TTCCTTGTGCAAGTGTCTGAAG-3'	5'-CACTGTCAAAGGTGGCATT-3'
IL-6	5'-TGATGCACTTGCAGAAAACA-3'	5'-ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC-3'
IL-10	5'-ATCGATTTCTCCCCTGTGAA-3'	5'-TGTCAAATTCATTCATGGCCT-3'
CCL2	5'-CCTGCTGTTACAGTTGCC-3'	5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3'
CCL5	5'-CCACTTCTTCTCTGGGTGG-3'	5'-GTGCCACGTCAAGGAGTAT-3'
CXCL10	5'-GGCTGGTCACCTTTCAGAAG-3'	5'-ATGGATGGACAGCAGAGAGC-3'
18s	5'-GCAATTATCCCCATGAACG-3'	5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'

2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Tabelle 2: Versuchstiere

<i>Mausstamm</i>	<i>Ursprung</i>
C57BL/6NClr Wildtyp	Charles River Laboratories, Sulzfeld
RIPK1 ^{K45A/K45A} (C57BL/6NClr)	Dr. Peter Gough, GSK, Colledgeville, USA
RIPK3 ^{K51A/K51A} (C57BL/6NClr)	Dr. Peter Gough, GSK, Colledgeville, USA
MLKL ^{-/-} (C57BL/6NClr)	Professor James Murphy und Professor Warren Alexander, WEHI, Melbourne, Australien

Die verwendeten RIPK1^{K45A/K45A}- ebenso wie die RIPK3^{K51A/K51A}-Versuchstiere wurden uns freundlicherweise von Dr. Peter Gough, GSK, Colledgeville, USA, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um transgene *Knock-in*-Mäuse. Durch eine Punktmutation im katalytischen Lysin (K45A) des RIPK1-Gens wurde in den RIPK1^{K45A/K45A}-Mäusen gezielt die Kinase-Aktivität des RIPK1-Moleküls, welche essenziell für die RIPK1-vermittelte Nekroptose ist, ausgeschaltet („*Kinase-dead*“-Mutante), während die Expression des RIPK1-Proteins und damit Kinase-unabhängige Funktionen unbeeinträchtigt bleiben [41]. Auch bei den transgenen RIPK3^{K51A/K51A}-Mäusen wurde die für die RIPK3-vermittelte Nekroptose benötigte Kinaseaktivität durch eine Punktmutation ausgeschaltet. Trotz im Vergleich zu Wildtyp-Tieren verminderter Expression von RIPK3 konnte gezeigt werden, dass Kinase-unabhängige, RIPK3-vermittelte Funktionen wie Inflammasom-Aktivierung oder Apoptose bei diesen Tieren intakt blieben [28].

Die MLKL-*Knockout*-Mäuse wurden initial von Professor James Murphy und Professor Warren Alexander, WEHI, Melbourne, Australien, generiert und uns freundlicherweise von Prof. Dr. Krautwald, UKSH, Kiel, zur Verfügung gestellt. Bei diesen homozygoten transgenen Tieren ist durch einen *Knockout* des

MLKL-Gens die Proteinexpression von MLKL, des Effektormoleküls der RIPK1-/RIPK3-vermittelten Nekroptose, vollständig unterbunden [42].

Die als Kontrolle verwendeten Wildtyp-Versuchstiere mit dem den transgenen Mäusen entsprechenden genetischen Hintergrund (C57Bl/6NClr) wurden bei Charles River Laboratories (Sulzfeld) erworben.

2.2.2 Tierhaltung

Maximal fünf Versuchstiere wurden unter SPF-Bedingungen in Eurostandard Typ IIL-Käfigen gehalten. Die Käfige, Futter, Wasser und Einstreu wurden im Vorfeld autoklaviert. Die Tiere wurden bei einem 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus mit Wasser und Trockenpelletsfutter *ad libidum* gehalten. Im Alter von 21 Tagen wurden Jungtiere geschlechtergetrennt abgesetzt und mit Ohrlochmarkierungen versehen.

Alle tierexperimentellen Methoden entsprachen den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes und waren im Vorfeld durch die Regierung von Oberbayern genehmigt worden.

2.2.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte mittels PCR. Hierbei wurde entsprechend die Gensequenz von RIPK1 bzw. RIPK3 oder MLKL amplifiziert und nachgewiesen. Die DNA der Versuchstiere wurde aus Gewebe der Ohrlochmarkierung oder der Schwanzspitzen gewonnen. Hierzu wurde dem Gewebe jeweils 200µl DirectPCR Lysepuffer sowie 1,5µl Proteinase K gegeben. Durch Inkubation im Thermomixer für etwa 3 Stunden bei 55°C wurde so das Gewebe vollständig lysiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde anschließend die Suspension für 45 Minuten auf 85°C erhitzt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 15.000 G, wodurch sich Gewebereste am Boden absetzten, während die DNA im Überstand gelöst war. Hiervon wurde 1µl zu folgendem Mastermix gegeben:

2,5µl 10x ThermoPol Puffer

4µl 1,25mM dNTPs

Je 1µl Forward sowie Reverse Primer (10pMol) des jeweils zu untersuchenden Gens

0,2µl Taq DNA Polymerase

15,8µl H₂O

Tabelle 3 zeigt die jeweils verwendeten Primer-Sequenzen.

Tabelle 3: Primer für die Genotypisierung der Versuchstiere

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
RIPK1^{K45A}	5'-CTCTGATTGCTTTATAGGAC-3'	5'-GCTTTCAGTGATGTCTTCCT-3'
RIPK3^{K51A}	5'-CACGCCCAAGGTTAGTCCATG-3'	5'-CCTCAGCTTTTTGGAAGGTG-3'
MLKL	5'-TATGACCATGGCAACTCACG-3'	5'-TCCTTCCAGCACCTCGTAAT-3'

Anschließend erfolgte die Amplifikation der jeweiligen Gensequenzen im Thermocycler. Hierbei wurden für die Gene RIPK1, RIPK3 und MLKL folgende Einstellungen verwendet:

Tabelle 4: Thermocycler-Einstellungen für die Genotypisierung

	Temperatur	Dauer	
Vorabdenaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	59°C	30 sec	38x Wiederholung

Elongation	72° C	3 0 s e c
Polymerisation	72° C	5 m in
Ende	10° C	

Im Anschluss wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die amplifizierten Genprodukte ihrer Länge nach aufzutrennen. Zunächst wurde das Elektrophoresegel hergestellt. Hierzu wurde 1,5% Agarose durch Erhitzen in 1x TBE-Puffer aufgelöst. Nach Zugabe von 7µl Ethidiumbromid wurde das Gel in eine Form gegossen. Anschließend wurden 25µl der Proben mit der amplifizierten Gensequenz mit 5µl des Glycerinladepuffers versetzt, um eine Auftrennung der Proben alleine anhand ihrer Größe zu gewährleisten. Nach Aushärten des Gels wurden jeweils 5µl hiervon in eine Tasche des Gels pipettiert. Zudem wurde eine DNA-Leiter als Standard aufgetragen, um eine Größenbestimmung der amplifizierten Genprodukte zu ermöglichen. Die Auftrennung der Genprodukte erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 150 Volt über 45 Minuten. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zum Nachweis der jeweiligen Banden unter UV-Licht fotografiert. Anhand der Größe der jeweiligen Bande konnte zwischen Wildtypallel und jeweiligem *Kinase-dead*- bzw. *Knockout*-Allel unterschieden werden.

2.2.4 Induktion der autologen nephrotoxischen Serumnephritis

Es wurden ausschließlich männliche Versuchstiere der unter 2.2.1 genannten Genotypen im Alter von sieben bis neun Wochen für die Versuche verwendet. Die Dauer der Versuche betrug 14 Tage ab Injektion des nephrotoxischen Serums. Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen des Modells der nephrotoxischen Serumnephritis wurden unter Punkt 1.4 erläutert.

Präimmunisierung:

Drei Tage vor Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis erfolgte die Präimmunisierung mittels Schafs-IgG-Antikörpern (**Abbildung 11**). Hierdurch kann die autologe Phase der nephrotoxischen Serumnephritis, die wesentlich auf einer adaptiven Immunantwort gegen die glomerulär abgelagerten heterologen Antikörper des injizierten Schafserums basiert, auch durch andernfalls nicht ausreichende, subnephritische Dosen des nephrotoxischen Serums ausgelöst werden [19]. Das Schafs-IgG wurde mit PBS auf eine Konzentration von 0,2mg/ml verdünnt und anschließend 1:1 in Adjuvans gelöst (Endkonzentration 0,1 mg/ml). Daraufhin wurde die Lösung durch mehrmaliges Mischen am Sonicator homogenisiert. Es erfolgte die subkutane Gabe von je 100µl Präimmunisierungslösung in jede Leistenregion der Versuchstiere.

Induktion der NTN:

Drei Tage darauf wurde durch die sterile intravenöse Injektion von 200µl Probetex *sheep anti-rat* GBM Serum in die Schwanzvene der Versuchstiere die nephrotoxische Serumnephritis induziert (**Abbildung 11**).

Beginnend mit dem Zeitpunkt der Präimmunisierung wurde täglich der Gesundheitszustand der Tiere überprüft. Die Gewinnung von Spontanurin erfolgte an den Tagen 0 (vor Injektion des Serums), 7 und am Endpunkt der Versuche an Tag 14 (**Abbildung 11**). Der Proteinurie wurde zunächst orientierend mittels Albustix Teststreifen bestimmt und der Urin anschließend für weitere Analysen wie Albumin-Elisa bei -20°C aufbewahrt.

Injektionsnarkose:

2ml Fentanyl (0,05 mg/ml)

2ml Midazolam (5mg/ml)

1ml Medetomidin (1mg/ml)

2.3 Immunologische Methoden

2.3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die für diese Arbeit durchgeführten ELISAs funktionieren nach dem Prinzip des sogenannten Sandwich-ELISAs. Hierbei erfolgt zunächst die Beschichtung von 96-Well-Platten mit einem sogenannten *Coating Antibody*, an den anschließend das zu analysierende Antigen bindet. Die Quantifizierung dieses Antigens wird mithilfe eines zweiten Antikörpers, des sogenannten *Detection Antibody* erreicht, welcher an ein anderes Epitop des Antigens bindet. Dieser Detektionsantikörper ist nun entweder an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, sodass die gemessene Fluoreszenz proportional der Menge an Antigen in der zu analysierenden Probe ist, oder an ein Enzym, bei dem die Menge an Antigen mittels einer Substratreaktion quantifiziert werden kann. Zwischen der Zugabe der Antikörper und Proben erfolgen jeweils mehrere Waschschriffe, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Albumin-ELISA:

Mittels Albumin-ELISA wurde das Ausmaß der Proteinurie im Verlaufe des Versuches bestimmt. Hierzu wurden Urinproben von den Versuchstagen 0, 7 und 14 analysiert. Zunächst erfolgte eine Einschätzung der Proteinurie mit Albustix Teststreifen, um zu ermitteln, wie stark die Proben für die folgende Analyse mittels ELISA zu verdünnen waren.

Am Vortag wurden die 96-Well-Platten mit Purified-anti-Mouse-Albumin-Antikörper, 1:1000 verdünnt in Carbonat-Puffer, beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach mehreren Waschschriffen die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 0,5%

BSA/Tween/PBS-Lösung für 30 Minuten. Es wurden die Verdünnungsreihen hergestellt (bei den Urinproben für diese Arbeit stets vier Verdünnungsstufen von 1:100 bis 1:100000), anschließend eine Standardreihe mit bekannten Albumin-Konzentrationen und die verdünnten Proben im Dreifachansatz auf die Platten aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend folgte nach erneuten Waschschritten das Auftragen des 1:10000 in 0,5% BSA/Tween/PBS-Lösung verdünnten *Detection Antibody HRP-Goat Anti-Mouse-Albumin*. Dieser ist an das Enzym *Horseradish Peroxidase* gekoppelt, das Redoxreaktionen mit verschiedenen Substraten katalysiert. Nach zweistündiger Inkubation und erneutem Waschen wurde dann das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben, was zu einer Farbreaktion führte, und diese nach circa fünf Minuten mit Schwefelsäure (H_2SO_4) angehalten. Abschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 450nm mittels *ELISA-Reader*. Für die Auswertung wurde aus den Absorptions-Werten der Standards eine Standardkurve erstellt und so die absoluten Werte der Albumin-Konzentration in den Urinproben berechnet.

Kreatinin-Bestimmung:

Da die mittels ELISA ermittelte Albumin-Konzentration in den Urinproben von der Konzentration des Urins abhängig ist, muss sie auch zu dieser in Bezug gesetzt werden. Hierfür ist die Bestimmung der Kreatinin-Konzentration im Urin nötig. Kreatinin eignet sich hierfür besonders, da es ein harnpflichtiges Stoffwechselprodukt ist, mit einer relativ konstanten Rate allein über die Nieren ausgeschieden wird und so als Maß für die Harnkonzentrierung dient.

Die Bestimmung des Kreatinins in den Urinproben erfolgte mithilfe des Creatinine FS Kits nach der Jaffé-Methode. Es wurde eine Standardreihe mit bekannten Kreatininkonzentrationen hergestellt, die Urinproben 1:10 mit *Aqua ad injectabilia* verdünnt und im Doppelansatz auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Nach Alkalisierung der Proben mit Natronlauge wurde die Reaktion durch 4,0 mM Pikrinsäure ausgelöst. Diese bildet im Alkalischen mit Kreatinin einen Kreatinipikrat-Komplex, was zu einem Farbumschlag führt. So kann die Extinktion als Maß für die Menge an gebildetem Kreatinipikrat verwendet werden. Es wurde nach einer und nach drei Minuten die Extinktion bei 492nm im *ELISA-Reader* gemessen und jeweils die Differenz beider Werte gebildet. Mithilfe der

Standardreihe wurde eine Standardkurve erstellt, sodass aus der Differenz der jeweils gemessenen Extinktionswerte der Urinproben deren Kreatinin-Konzentration berechnet werden konnte.

Anti-Schafs-IgG-ELISA:

Um die Bildung von autologen IgG-Antikörpern der Versuchstiere gegen die im nephrotoxischen Serum enthaltenen Schafs-IgG-Antikörper zu bestimmen, wurde mit dem Serum der Versuchstiere ein ELISA durchgeführt. Hierzu wurden 96-Well-Platten über Nacht bei 4°C mit 0,1mg/ml Schafs-IgG, gelöst in Carbonat-Puffer, inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach mehreren Waschschritten die 30-minütige Blockierung mit 0,5% BSA/Tween/PBS-Lösung, bevor die Proben im Dreifachansatz in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:100, 1:200, 1:400, 1:800) aufgetragen wurden. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur und erneutem Waschen wurde der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Detektionsantikörper *Goat anti-Mouse-IgG-FITC* 1:250 verdünnt in 0,5% BSA/Tween/PBS-Lösung hinzugefügt. Es folgte eine erneute zweistündige Inkubationszeit, bevor die Emission bei 535nm Wellenlänge mittels *ELISA-Reader* bestimmt wurde.

2.3.2 Durchflusszytometrie

Allgemeines Funktionsprinzip:

Die Durchflusszytometrie oder *Flourescence Activated Cell Sorting* (FACS) ist eine Methode zur Charakterisierung bestimmter Partikel oder Zellen anhand ihrer Größe, inneren Beschaffenheit (Granularität) und ihren Oberflächenantigenen. Hierzu wird die Probenflüssigkeit mit den enthaltenen Zellen in einem laminaren Fluss an einem Laser vorbeigelenkt, sodass nach Möglichkeit zu jedem Zeitpunkt nur eine Zelle von dem Laser bestrahlt wird. Für die meisten Analysen sind die Zellen zudem mit an Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörpern markiert, um eine Aussage über exprimierte Oberflächenantigene der Zellen treffen zu können. Diese Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren das Licht

des Lasers und emittieren daraufhin Licht bestimmter Wellenlänge, wobei jeder Fluoreszenzfarbstoff ein charakteristisches Absorptions- und Emissionsspektrum aufweist. Anhand des Spektrums des emittierten Lichts können so über die Menge des jeweils an die vorhandenen Oberflächenantigene gebundenen, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpers Rückschlüsse über das Expressionsmuster der Zelle gezogen werden. Zudem erlaubt der sogenannte *Forward Scatter* (Vorwärtsstreulicht) eine Einschätzung der Größe und der sogenannte *Sideward Scatter* (Seitwärtsstreulicht) der Granularität der Zellen. Mittels der Analyse der Oberflächenantigene und *Forward* sowie *Sideward Scatter* können so einzelne Subpopulationen an Zellen identifiziert und deren relativer Anteil an allen Zellen der Proben bestimmt werden.

Durchflusszytometrie der Milz:

Nach Entnahme der Milz wurde diese mithilfe eines Spritzenstempels durch einen 70µm Filter gepresst und das Gewebe anschließend in 10ml PBS gelöst. Nach 7-10 Minuten Zentrifugation bei 1500 G wurde der Überstand abgegossen, das Pellet in Tris-Ammoniumchlorid-Puffer (TAC-Puffer) resuspendiert und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert, um eine Lyse der roten Blutkörperchen zu bewirken. Anschließend wurde diese Reaktion mit PBS gestoppt, die Lösung erneut gefiltert und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in FACS-Puffer resuspendiert. Um unspezifische, oberflächliche Bindungsstellen an den Zellen zu blockieren, wurden 100µl der Zellsuspension für 10 Minuten mit je 5µl Maus- und Rattenserum inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit den Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern nach folgendem Schema:

CD3-FITC

CD4-APC

CD8-PE-Cy5.5

CD69-PE

Hierzu wurden je 1,4µl des jeweiligen Antikörpers hinzugegeben und die Zellsuspension bei 4°C für 45 Minuten inkubiert. Nach Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper mit FACS-Puffer erfolgte die Analyse der Proben mittels

Durchflusszytometrie. Hierfür wurde die Software CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet.

Anhand der mit Antikörpern markierten Oberflächenantigene konnten folgende Zellpopulationen unterschieden werden:

T- Lymphozyten	CD3 ⁺
CD4 ⁺ T-Lymphozyten	CD3 ⁺ , CD4 ⁺
CD8 ⁺ T-Lymphozyten	CD3 ⁺ , CD8 ⁺
Aktivierte CD4 ⁺ T-Lymphozyten	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD69 ⁺
Aktivierte CD8 ⁺ T-Lymphozyten	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD69 ⁺

Bei CD69 handelt es sich um ein Oberflächenantigen, das unter anderem von T-Lymphozyten als ein früher Marker für Zellaktivierung exprimiert wird [43]. So wurde jeweils der prozentuale Anteil der aktivierten an allen CD4⁺ bzw CD8⁺ T-Lymphozyten in der Milz ermittelt.

Durchflusszytometrie der drainierenden renalen Lymphknoten:

Die entnommenen paraaortalen Lymphknoten wurden durch einen 70µm Filter gepresst und in 10ml PBS gelöst. Die Suspension wurde bei 1200 G für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in FACS-Puffer resuspendiert und unspezifische Bindungsstellen mit Maus- und Rattenserum blockiert. Die Färbung mit den Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

CD3-FITC

CD4-APC

CD8-PE-Cy5.5

CD69-PE

Nach Inkubation und Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung der Proben analog zur oben geschilderten Analyse der Zellpopulationen in der Milz.

2.3.3 Western Blot

Funktionsprinzip:

Der Western Blot ist ein Verfahren, mit dem innerhalb eines Proteingemisches bestimmte Zielproteine nachgewiesen werden können. Die Namensgebung erfolgte in Anlehnung an den von Ed Southern entwickelten Southern Blot zum Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen. Zunächst erfolgt beim Western Blot die Auftrennung des Proteingemisches anhand von Größe, Ladung und weiterer Faktoren wie Sekundär- und Tertiärstruktur mittels Gelelektrophorese. Im Anschluss werden die nun aufgetrennten einzelnen Proteinbanden, auch unter Zuhilfenahme einer elektrischen Spannung, auf eine Trägermembran verbracht. Dort bleiben sie im Muster der elektrophoretischen Auftrennung haften und können mittels Antikörper nachgewiesen werden. Das gleichzeitige Aufbringen eines Molekulargewichtstandards erlaubt die Identifikation des gesuchten Proteins anhand des Molekulargewichts. Zum Nachweis des Proteins wird ein primärer Antikörper verwendet, der spezifisch an das gesuchte, auf die Membran übertragene Protein bindet. Ein sekundärer Antikörper, der in der Regel mit einem Enzym oder Farbstoff konjugiert oder radioaktiv markiert ist, bindet an die Fc-Region des primären Antikörpers und kann dann detektiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis über die bei einer durch ein HRP-Enzym katalysierten Reaktion entstehende Chemolumineszenz.

Proteinisolation:

Vor dem eigentlichen Western Blot müssen zunächst Proteine aus dem intakten Gewebe isoliert werden. Hierfür wurde nach Entnahme der Nieren etwa ein Drittel einer Niere bei -80°C eingefroren. Dieses Gewebe wurde nun bei 4°C mittels Lyse-Puffer lysiert. Dazu wurde es mit $400\mu\text{l}$ RIPA-Puffer versetzt sowie $16\mu\text{l}$ Protease-Inhibitor und $4\mu\text{l}$ Phosphatase-Inhibitor hinzugegeben, um die simultan mit der Lyse der Zellen auftretende Proteolyse und Dephosphorylierung zu verhindern. Zusätzlich wurde das Gewebe mittels Ultraschallwellen weiter zerkleinert und homogenisiert. Hierfür wurde es mehrmals für 2-3 Sekunden in einen Sonicator gehalten und zwischen den einzelnen Schritten jeweils auf Eis

gekühlt. Im Anschluss erfolgte die langsame Rotation des Lysats auf einem Rotator für etwa zwei Stunden. Nach der folgenden Zentrifugation für 5 Minuten bei 15.000 G konnte der Überstand mit den darin gelösten Proteinen abpipetiert und das am Boden verbleibende Pellet verworfen werden. Anschließend erfolgte die Bestimmung der jeweiligen Proteinkonzentration im Überstand mittels Bradford-Messung, und das Verdünnen der zu vergleichenden Proteinisolate auf die gleiche Konzentration.

Western Blot:

Um eine Auftrennung der Proteine alleine anhand ihres Molekulargewichts zu erreichen, müssen alle Proteine innerhalb des Proteingemisches gleichmäßig geladen sein. Dies wurde durch Verdünnung mit dem Ladepuffer nach Lämmli erreicht. Zudem erfolgte eine Denaturierung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine durch Erhitzen der Proben auf 95°C für 5 Minuten. Anschließend wurden die Proteingemische in die Taschen eines Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-(SDS-PAGE-)Gels eingebracht, wobei ein Proteingehalt von 60-80µg pro Tasche angestrebt wurde. Dann folgte die Auftrennung mittels Elektrophorese. Hierzu wurde eine Spannung von 100 Volt für etwa 40 Minuten und darauf für etwa 90-120 Minuten eine Spannung von 150 Volt angelegt. Nach der Auftrennung des Proteinlysats erfolgte das eigentliche „Blotting“ auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF-) Membran durch Anlegen einer Spannung von 15 Volt für etwa 60 Minuten. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Membran im Anschluss mit 5%iger Milchlösung blockiert. Als Lösungsmittel für das Milchpulver wurde TBS-T verwendet. Über Nacht wurde die Membran dann mit dem 1:1000 verdünnten Primärantikörper bei 4°C inkubiert. Nach mehrfachen Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem in 5% Milchlösung 1:10000 verdünnten, an ein HRP-Enzym gekoppelten Sekundärantikörper. Nun wurde die Membran mit einem Detektionsreagenz (ECL Prime) benetzt. In der Dunkelkammer wurde die Membran auf einen Röntgenfilm gelegt, sodass dieser nur durch die entstehende Chemolumineszenz belichtet wurde. Dadurch entstand am Ort des nachzuweisenden Proteins eine schwarze Bande auf dem Röntgenfilm, deren Dicke der Menge des nachzuweisenden Proteins entspricht. Zur Ladekontrolle erfolgte im Anschluss der Nachweis von

β -Actin, einem Protein mit hohem und konstantem Expressionslevel. Hierzu wurde die Membran für 8-10 Minuten durch einen Stripping Buffer von den gebundenen Antikörpern gereinigt und danach wieder durch 5% Milchlösung blockiert, bevor die Aufbringung des Primärantikörpers erfolgen konnte. Die weiteren Schritte entsprachen dem bereits Ausgeführten. Eine semiquantitative Auswertung der Banden auf dem Röntgenfilm wurde mit Hilfe der Software ImageJ durchgeführt. Hierzu wurde jeweils die Intensität der Bande des nachzuweisenden Proteins in Relation zu jener der zugehörigen β -Actin-Bande gesetzt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus dem Nierengewebe wurde mithilfe des PureLink RNA Mini Kits von Ambion durchgeführt. Hierfür wurde etwa ein Viertel einer Niere verwendet. Zu dem Gewebe wurden 350 μ l des mit β -Mercaptoethanol versetzten Lyse-Puffers (Ambion) gegeben. Anschließend erfolgte die mechanische Zerkleinerung mithilfe eines Homogenisators, bis kein Gewebe-Pellet mehr sichtbar war. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand mit der darin enthaltenen RNA in einem neuen, RNase-freiem Gefäß mit 70% Ethanol versetzt, gemischt, und anschließend auf die mit einem Auffanggefäß versehenen Filtermembran des Kits pipettiert. Durch Zentrifugieren bei 12.000 G für 15 Sekunden sammelte sich die RNA auf dem Filter. Nach weiteren Waschschritten wurde die Filtermembran mit der gebundenen RNA durch Zentrifugation bei 12.000 G für 1-2 Minuten getrocknet. Im Anschluss konnte die RNA mit RNase-freiem Wasser durch erneute Zentrifugation von der Membran gelöst und in einem frischen Auffanggefäß gesammelt werden.

Vor der cDNA-Synthese erfolgte eine Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA. Diese wurde mithilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop, Peqlab) durchgeführt. Es wurde jeweils die optische Dichte der Proben bei $\lambda=260\text{nm}$ und $\lambda=280\text{nm}$ gemessen und daraus ein Quotient gebildet. War dieser $<1,8$ oder $>2,2$, galt die Probe als kontaminiert und wurde erneut gerei-

nigt. Da eine Optische Dichte von 1 bei $\lambda=260\text{nm}$ einer RNA-Konzentration von $40\text{ng}/\mu\text{l}$ entspricht, konnte so im Anschluss die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe berechnet werden.

2.4.2 cDNA-Synthese

Da für die Amplifizierung mittels PCR DNA benötigt wird, erfolgte nun die Umschreibung der isolierten RNA in Einzelstrang-DNA mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Zunächst wurden die Proben mit der isolierten RNA für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Um jeweils die gleiche Menge an RNA umzuschreiben, wurde im Anschluss die RNA mit RNase-freiem Wasser so verdünnt, dass in einem Volumen von $13,2\mu\text{l}$ RNA-Lösung genau $1\mu\text{g}$ RNA enthalten war. Dieses Volumen wurde nun zu einer Reagenzmischung (Mastermix), die die Reverse Transkriptase, bzw in einem Kontrollansatz (RT-) RNase freies Wasser enthielt, pipettiert.

Tabelle 5: Mastermix cDNA-Synthese

Mastermix:

4 μl 5x Puffer

0,4 μl 25mM dNTP-Mischung

1 μl 0,1M DTT

0,5 μl 40 U/ μl RNasin

0,25 μl Acrylamid 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$

0,215 μl Hexanukleotide

0,43 μl Superscript bzw. im RT- Ansatz ddH_2O

Es folgte die Inkubation bei 42°C für 90 Minuten, um die DNA-Synthese zu starten. Zum Stoppen der Enzymaktivität wurde im Anschluss die Probe für 5 Minuten auf 85°C erhitzt und für wenige Sekunden bei 12.000 G zentrifugiert. So konnten die Proben nun für die quantitative *Real Time*-PCR verwendet werden.

2.4.3 Quantitative *Real Time*-PCR

Funktionsprinzip:

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine von Kary Mullis 1983 entwickelte Methode zur Vervielfältigung von DNA mithilfe des Enzyms DNA-Polymerase sowie zweier den gesuchten DNA-Abschnitt flankierender Primer. Durch die wiederholte Verdopplung in mehreren Zyklen ist eine exponentielle Vervielfältigung der DNA möglich, da Produkte vorheriger Zyklen als Vorlage für jeden neuen Replikationsvorgang zur Verfügung stehen. In jedem Zyklus werden mehrere Schritte durchlaufen. Zunächst erfolgt das Erhitzen auf 95°C, um den DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufzuteilen (Denaturierung). Im Anschluss wird die Temperatur auf etwa 65°C gesenkt, um eine Anlagerung der beiden Primer, also der den gesuchten DNA-Abschnitt flankierenden Oligonukleotide, an die jeweils komplementären Einzelstränge der DNA zu ermöglichen (*Primer Annealing*). Daraufhin folgt die Elongation, also das Ergänzen der fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden ausgehend vom Primer, durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (meist Taq-Polymerase). Dieser Ablauf kann beliebig oft wiederholt und so eine exponentielle Vervielfältigung des DNA-Abschnitts erreicht werden.

Bei der quantitativen *Real Time*-PCR (qPCR) ist zusätzlich eine Quantifizierung der DNA möglich. Hierzu wird dem Reaktionsgemisch ein zunächst inaktiver Fluoreszenzfarbstoff (in der vorliegenden Arbeit SYBR Green I) zugegeben, der durch die Einlagerung in Doppelstrang-DNA aktiviert wird. So nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Vervielfältigung der DNA zu. Über die Anzahl an Zyklen, die nötig ist, um einen zuvor definierten Schwellwert zu erreichen und sich damit eindeutig von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden (*Cycle-Threshold*-Wert, CT-Wert), kann eine Aussage über die ursprüngliche Menge des vervielfältigten DNA-Abschnitts gemacht werden. Hierzu wird der CT-Wert des gesuchten Gens in Relation zu jenem eines sogenannten *Housekeeping*-

Gens gesetzt, welches unabhängig von Zelltyp oder äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert wird. Mittels Schmelzkurvenanalyse kann die Spezifität der amplifizierten Produkte untersucht werden. Hierzu erfolgt eine kontinuierliche Erhitzung auf 95°C. Das Erreichen der jeweiligen Schmelzpunkte der PCR-Produkte ist hierbei durch einen Fluoreszenzabfall charakterisiert, da der interkalierende Farbstoff beim Trennen der Doppelstränge freigegeben und so inaktiv wird. Die spezifischen Amplifikationsprodukte haben einen höheren Schmelzpunkt als ebenfalls entstehende unspezifische Primerdimere und können anhand der für das jeweilige Gen charakteristischen Schmelzkurvenpeaks identifiziert werden.

Quantitative Real Time-PCR mit SYBR Green I:

Zunächst erfolgte eine 1:10 Verdünnung der umgeschriebenen RT+ cDNA sowie der RT- Negativkontrolle mit RNase-freiem Wasser. Anschließend wurden 2,2µl der cDNA-Lösung zu 18µl des PCR-Mix gegeben. Dieser besteht aus:

10µl Mastermix mit SYBR-Green I (Version 1.2, Zusammensetzung siehe unten)

0,6µl Forward Primer

0,6µl Reverse Primer

0,16µl Taq-Polymerase

6,64µl RNase-freies Wasser

Analog dazu wurde mit der Negativkontrolle verfahren. Nun erfolgte das Pipettieren im Doppelansatz auf eine 96-Well-Platte, wobei die Proben durch einen Doppelansatz einer weiteren Negativkontrolle ohne Taq-Polymerase ergänzt wurden. Die Platte wurde mit einer Folie abgedichtet und für wenige Sekunden bei 12.000 G zentrifugiert. Im Anschluss wurde die eigentliche PCR im Lightcycler 480 von Roche nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 6: Einstellungen des Lightcycler 480 für die qPCR

	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>
Vorabdenaturierung	5min	95°C
Denaturierung	15sec	95°C

Annealing	45sec	60°C	40x Wiederholung
Extension	30sec	72°C	

Schmelzkurve	5sec	95°C	
	10min	Schrittweise Steigerung von 65°C bis 95°C	

Die Auswertung erfolgte mithilfe der LightCycler 480 Software Version 1.2.9.11 (Roche, Mannheim), wobei jeweils der Mittelwert der im Doppelansatz pipettierten Proben berechnet wurde. Als *Housekeeping*-Gen wurde die 18s-RNA verwendet. Waren unspezifische Signale in den Ansätzen der Negativkontrollen sichtbar, wurde die qPCR wiederholt oder die jeweilige Probe verworfen.

Tabelle 7: SYBR Green-Mastermix

SYBR Green-Mastermix Version 1.2 (10ml)

2ml Taq Puffer ohne Detergenz

150µl dNTPs (25mM)

4ml PCR Optimizer BioStab

200µl bovines Serumalbumin (20mg/ml)

40µl SYBR Green I

2,4ml MgCl₂ (25mM)

1,21ml H₂O

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Aufbereitung des Nierengewebes

Nach der Entnahme der Nieren wurden die Proben für die Histologie in Histologiekassetten für 24 Stunden in wässriger Formalinlösung mit 4% Formaldehydgehalt fixiert. Anschließend erfolgte das Auswaschen des Fixierungsmittels mit Wasser und die Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Vor der Einbettung in 55°C-65°C heißem Paraffin wurden die Proben in Xylol inkubiert. Nach dem Erkalten der Paraffin-Blöcke erfolgte das Schneiden der Gewebeproben mittels Mikrotom in 2µm dünne Schnitte. Anschließend wurden die Schnitte nacheinander in einem Kalt- und ein Heißwasserbad gestreckt. Es folgte das Auftragen auf einen zwecks besserer Haftung mit APES vorbehandelten Objektträger und das Trocknen über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

2.5.2 Färbung der Schnitte

Vor jeder Färbung erfolgte die Deparaffinierung der Schnitte für drei mal fünf Minuten in Xylol, anschließend dann die Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe (100%; 96%; 70%). Zur Beurteilung der glomerulären Sklerose wurden die Proben mit *Periodic Acid Schiff* (PAS) gefärbt. Die mittels kommerziellem *In Situ Cell Death Detection Kit* (Roche) nach Herstellerangaben angefertigte TUNEL-Färbung diente der Quantifizierung des auftretenden Zelltodes. Immunhistochemische Färbungen wurden mit folgenden Antikörpern in folgenden Konzentrationen vorgenommen: *Hamster anti-Mouse* CD3 (1:100; T-Lymphozyten), *Rat anti-Mouse* ER-HR3 (1:50; Makrophagen); *Rat anti-Mouse* F4/80 (1:100; Makrophagen), *Rat anti-Mouse* MAC-2 (1:3000; glomeruläre Makrophagen), *Goat anti-Mouse* IgG (1:200; glomeruläre Immunglobuline). Nach der Färbung erfolgte die erneute Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und das Inkubieren in Xylol. Anschließend wurden die Präparate mit VectaMount Mounting Medium (Vector Laboratories) vor Austrocknung geschützt.

2.5.3 Auswertung am Mikroskop

Die Auswertung der PAS-Färbung zur Beurteilung der glomerulären Sklerose wurde mittels folgendem semiquantitativen Score durchgeführt:

- 0 Punkte: keine Veränderung gegenüber physiologischer Niere
- 1 Punkt: <33% Sklerose
- 2 Punkte: 33%-66% Sklerose
- 3 Punkte: >66% Sklerose.

Für die Auswertung der CD3-Färbung wurden pro Versuchstier die angefärbten Zellen in 20 Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung sowie in 50 Glomeruli gezählt.

Die Auswertung der F4/80- sowie der ER-HR3-Färbung erfolgte mithilfe des Bildanalyseprogramms ImageJ (Open Source). Hierfür wurden pro Versuchstier mithilfe der Bildanalysesoftware QWin (Leica Microsystems, Bensheim) 20 digitale Fotografien in 400-facher Vergrößerung angefertigt und anschließend mit ImageJ der Anteil der schwarz gefärbten Zellen berechnet.

Ähnlich wurde bei der Mac2- und der IgG-Färbung verfahren. Hier erfolgte nach dem Anfertigen von digitalen Fotografien von 15 Glomeruli pro Versuchstier das Berechnen des Anteils der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche des Glomerulums.

Zur Quantifizierung des Zelltodes in den Nieren der Versuchstiere wurde die TUNEL (*TdT-mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling*)-Färbung benutzt, die DNA-Fragmente, die bei verschiedenen Arten des regulierten Zelltodes entstehen, nachweist. Hierzu wurden die TUNEL-positiven Zellen in 20 Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung sowie in 50 Glomeruli pro Versuchstier gezählt.

2.6 Statistische Analyse

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse stellen Mittelwerte aus jeweils mindestens zwei unabhängigen Versuchsserien dar. Als Maß für die Streuung wurden jeweils Standardabweichung bzw. Standardfehler angegeben.

Der Vergleich der Versuchsgruppen erfolgte mittels zweiseitigem Student's T-Test. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede ab einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen. In den Graphen wurde statistische Signifikanz mit Sternmarkierungen gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) bzw. $p < 0,001$ (***). Für die statistische Berechnung sowie die Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad® Prism 8.0 verwendet.

3 Ergebnisse

Der progrediente Verlauf chronisch entzündlicher Nierenerkrankungen ist nicht alleine Entzündungsreaktionen geschuldet, vielmehr ist davon auszugehen, dass Inflammation und regulierter Zelltod interagieren, sich gegenseitig verstärken und so zu Gewebeuntergang und progredientem Nierenfunktionsverlust führen. Aus diesem Grunde ist es nötig, für diese Erkrankungen pathophysiologisch relevante und therapeutisch hemmbare Mechanismen der regulierten Nekrose zu identifizieren. In den letzten Jahren wurde in verschiedenen Mausmodellen die Rolle der RIPK1- und RIPK3-vermittelte Nekroptose als einer dieser Mechanismen charakterisiert [36]. Um die Relevanz der Nekroptose auch bei der progredienten Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis zu beurteilen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Verlauf einer autologen nephrotoxischen Serumnephritis als Mausmodell für eine chronische Immunkomplexglomerulonephritis bei RIPK1kd-, RIPK3kd- sowie MLKL-*Knockout*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp analysiert.

3.1 Expression von RIPK1 und RIPK3 im Verlauf der NTN

Zunächst wurde untersucht, ob im Modell der autologen nephrotoxischen Serumnephritis Hinweise auf vermehrt abgelaufene Nekroptose vorliegen. Hierzu wurden vergleichende Western Blot-Analysen des Gesamtnierenlysats von unbehandelten, gesunden Wildtyp-Tieren sowie Wildtyp-Tieren an Tag 14 der NTN bezüglich der für die Nekroptose zentralen Proteine RIPK1 und RIPK3 durchgeführt. Diese zeigten, dass im Vergleich zu den gesunden Tieren die renale Proteinkonzentration von sowohl RIPK1, als auch RIPK3 an Tag 14 der autologen NTN signifikant erhöht war (**Abbildung 12**).

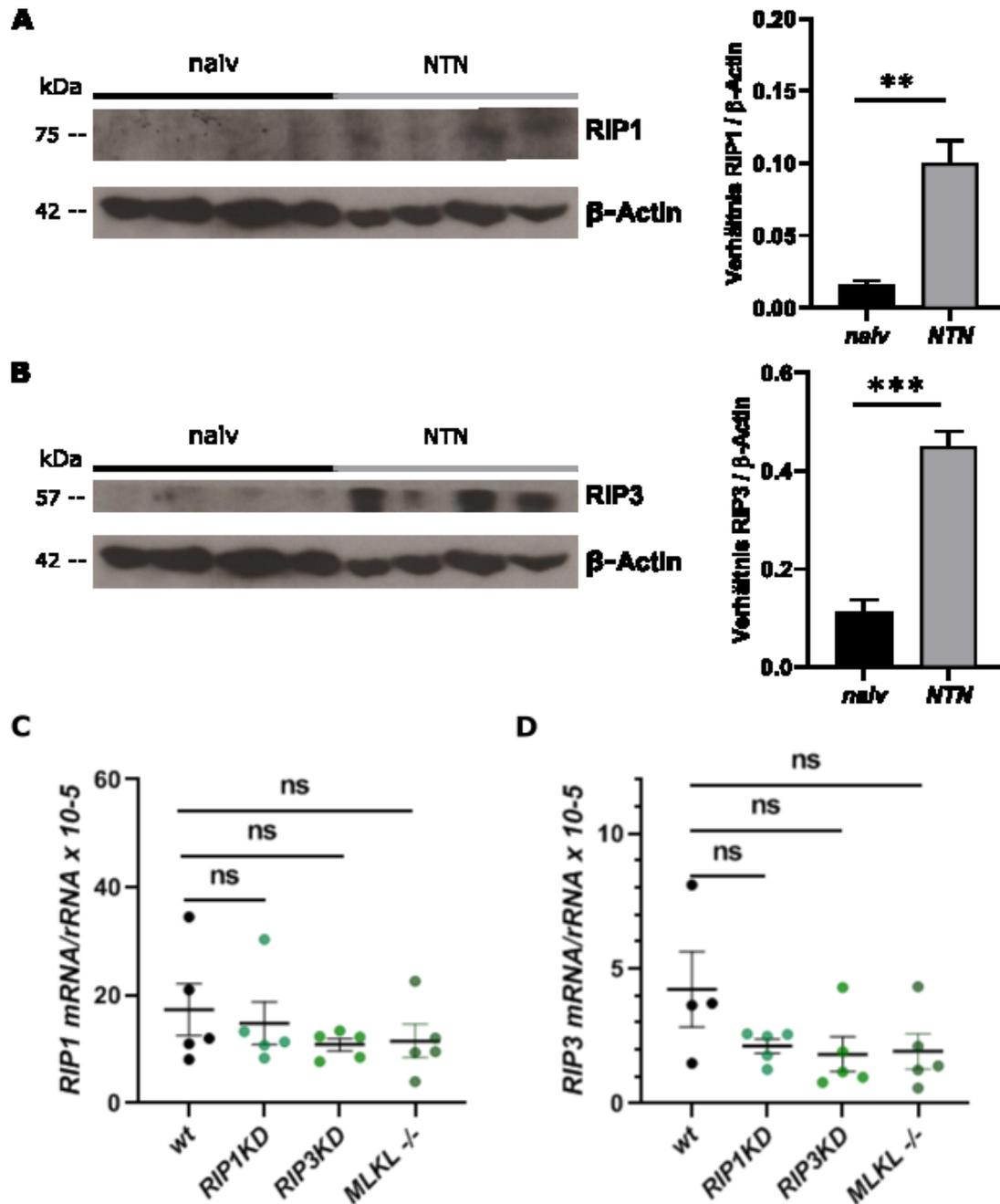


Abbildung 12: Expression von RIPK1 und RIPK3 im Rahmen der NTN

An Tag 14 der NTN konnte bei Wildtyp-Tieren eine signifikant höhere Proteinexpression von RIPK1 (A) sowie RIPK3 (B) als Hinweis auf vermehrte Nekroptose im Vergleich zu naiven Kontrolltieren nachgewiesen werden. Bezüglich der mRNA-Expression von RIPK1 (C) und RIPK3 (D) zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp-, RIPK1kd-, RIPK3kd- und MLKL-Knockout-Tieren an Tag 14 der NTN mittels qPCR ermittelt. Hier zeigte sich kein signifi-

Eine Korrelation von erhöhtem RIPK1- und RIPK3-Proteingehalt und vermehrt ablaufender Nekroptose konnte in verschiedenen Krankheitsmodellen nachgewiesen werden [44, 45]. Zudem wurde die mRNA-Expression von RIPK1 und RIPK3 in nephritischen Wildtyp-, RIPK1kd-, RIPK3kd- und MLKL-Knockout-Tieren an Tag 14 der NTN mittels qPCR ermittelt. Hier zeigte sich kein signifi-

kanter Unterschied zwischen den Genotypen (**Abbildung 12**). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass Unterschiede im Phänotyp der RIPK1kd-, RIPK3kd- und MLKL-*Knockout*-Tiere auf einer verminderten mRNA-Expression von RIPK1 oder RIPK3 beruhen.

3.2 Renaler Zelltod

Um die Bedeutung der Nekroptose für den Zelltod, der im Rahmen der NTN in der Niere auftritt, zu untersuchen, wurde mittels TUNEL-Färbung zunächst überprüft, ob bei den RIPK1kd-, RIPK3kd- und MLKL-defizienten Versuchstieren im Zuge der NTN in den Nieren tatsächlich das Ausmaß an Zelltod vermindert war. Durch das TUNEL-Verfahren werden DNA-Fragmente, die bei reguliertem Zelltod wie Apoptose und Nekroptose, aber auch bei Nekrose entstehen, markiert. Es wurde die Anzahl der TUNEL⁺ Zellen getrennt glomerulär und tubulointerstitiell ausgewertet. Bei den RIPK1kd-Mäusen war sowohl glomerulär als auch tubulointerstitiell eine signifikant verminderte Anzahl an TUNEL⁺ Zellen nachzuweisen, was mit vermindert ablaufender Nekroptose und dadurch insgesamt verringertem Zelltod vereinbar ist (**Abbildung 13**). Überraschenderweise war jedoch bei den RIPK3kd-Mäusen, im Gegensatz zu den RIPK1kd-Tieren, kein Unterschied im Ausmaß des renalen Zelltodes im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren feststellbar. Bei den MLKL-defizienten Tieren zeigte sich hingegen glomerulär und tubulointerstitiell eine tendenziell verminderte Anzahl TUNEL⁺ Zellen, dieser Unterschied erreichte jedoch knapp nicht das Signifikanzniveau.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass ein Verlust der Kinaseaktivität von RIPK1, jedoch nicht RIPK3 im Verlauf der NTN zu vermindertem glomerulärem und tubulointerstitiellen Zelltod führt, mit ähnlichem, jedoch nicht signifikantem Trend bei MLKL-Defizienz.

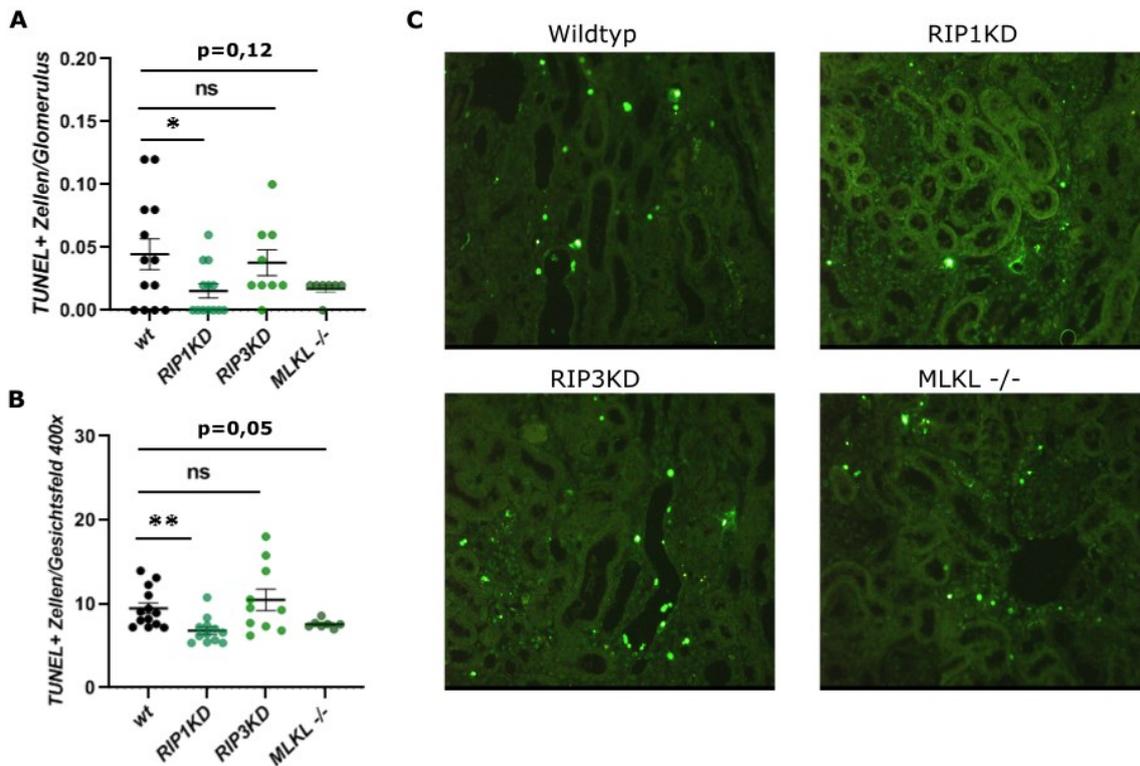


Abbildung 13: Analyse des renalen Zelltodes mittels TUNEL-Färbung

Bei den RIPK1kd-Tieren zeigten sich sowohl glomerulär (A) als auch tubulointerstitiell (B) signifikant weniger TUNEL⁺ Zellen, während bei den RIPK3kd-Tieren kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden konnte. Bei den MLKL^{-/-} Tieren waren die TUNEL⁺ Zellen tendenziell ebenfalls vermindert, dies erreichte knapp nicht das Signifikanzniveau. (C) zeigt repräsentative Gesichtsfelder der jeweiligen Genotypen in 200x Vergrößerung. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM, $n \geq 7$ je Gruppe, * $p < 0,05$, ** $n < 0,01$

3.3 Albuminurie

Im Folgenden wurde als Maß für die Schädigung der Filtrationsbarriere die Albuminurie der RIPK1kd-, RIPK3kd- und MLKL^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Tieren bestimmt. Vor Injektion des nephrotoxischen Serums an Tag 0 bestand weder in der Wildtyp-, noch bei einem der zu untersuchenden Genotypen eine signifikante Albuminurie (**Abbildung 14**). Hierdurch wurden eine bereits vorbestehende Schädigung der Nieren und ein vorbestehender Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ausgeschlossen.

In der heterologen Phase des Versuchs an Tag 7 konnten insgesamt die höchsten Albumin/Kreatinin-Konzentrationen ermittelt werden (**Abbildung 14**). Be-

reits hier war bei den RIP1KD-Tieren eine signifikant niedrigere Albuminurie als bei den Wildtyp-Tiere nachzuweisen. Zwischen RIP3kd- und Wildtyp-Tieren sowie zwischen MLKL-/- und Wildtyp-Tieren bestand hier jeweils kein Unterschied in der Albuminurie.

Zum Versuchsende 14 Tage nach Injektion des nephrotoxischen Serums war bei allen Gruppen weiterhin eine deutliche Albuminurie nachzuweisen, wobei diese bei den Tieren des RIPK1kd-Genotyps signifikant niedriger ausfiel als bei der Wildtyp-Gruppe (**Abbildung 14**). Zwischen der RIP3kd- sowie der MLKL-/- Gruppe und der Wildtyp-Gruppe konnte jeweils kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Diese Daten weisen darauf hin, dass in RIPK1kd-Mäusen der signifikant verminderte glomeruläre Zelltod auch mit einer geringeren Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere und damit mit verminderter Albuminurie korreliert ist.

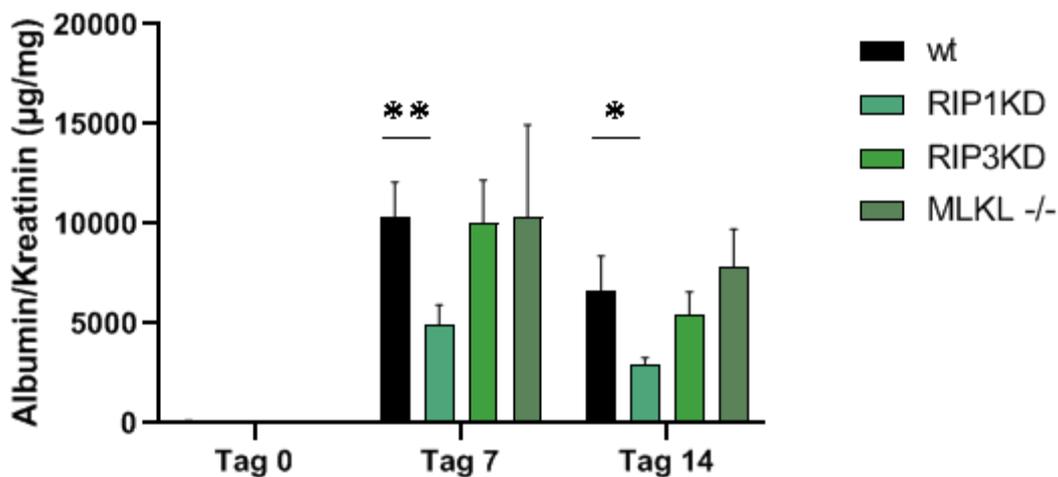


Abbildung 14: Albuminurie an Tag 0, 7 und 14 der NTN

An Tag 0 der NTN bestand bei keiner der Gruppen eine signifikante Albuminurie. Alle Gruppen entwickelten im Verlauf des Versuchs eine ausgeprägte Albuminurie, wobei diese an Tag 7 maximale Werte erreichte. An Tag 7 und an Tag 14 lag bei den RIPK1kd-Tieren eine signifikant niedrigere Albuminurie als in der Wildtyp-Gruppe vor. Es bestand jeweils kein Unterschied in der Höhe der Albuminurie zwischen RIP3kd- sowie MLKL-/- und Wildtyp-Tieren. Es sind Mittelwerte \pm SEM dargestellt; $n \geq 7$ für jede Gruppe; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.4 Serumanalyse

Zur Beurteilung der Nierenfunktion und der Ausbildung eines nephrotischen Syndroms wurden an Tag 14 der NTN verschiedene serologische Parameter bestimmt (**Abbildung 15**). Bezüglich der Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen nachgewiesen werden. Das Gesamtprotein im Serum ist ein weiteres Maß, mit dem sich der Proteinverlust über die Nieren, der mit einer gestörten Filtrationsbarriere einhergeht, abschätzen lässt. Das Gesamtprotein im Serum war in der RIPK1kd-Gruppe im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe signifikant erhöht, was mit der gezeigten geringeren Albuminurie korreliert. Während die RIPK3kd-Tiere in Bezug auf das Gesamtprotein im Serum keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren zeigten, war dieses bei den MLKL-/- Tieren sogar verringert. Eine Hypercholesterinämie kann im Zuge eines nephrotischen Syndroms auftreten, weshalb in allen Gruppen das Gesamtcholesterin im Serum bestimmt wurde. Hier zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Verringerung der Cholesterinspiegel sowohl bei den RIPK1kd-, als auch den RIPK3kd- und MLKL-/- Tieren als Hinweis auf ein vermindert ausgeprägtes nephrotisches Syndrom in den drei transgenen Tiergruppen.

Zusammenfassend zeigt die Auswertung dieser funktionellen Parameter bei vergleichbaren Nierenretentionswerten in allen untersuchten Genotypen keine Beeinflussung der Nierenfunktion durch Fehlen der RIPK1- oder RIPK3-Kinaseaktivität oder durch Fehlen von MLKL. Übereinstimmend mit der verminderten Albuminurie zeigten RIPK1kd-Mäuse dagegen erhöhte Gesamtproteinpiegel im Serum und eine verminderte Hypercholesterinämie als Zeichen eines geringer ausgeprägten nephrotischen Syndroms im Vergleich zum Wildtyp.

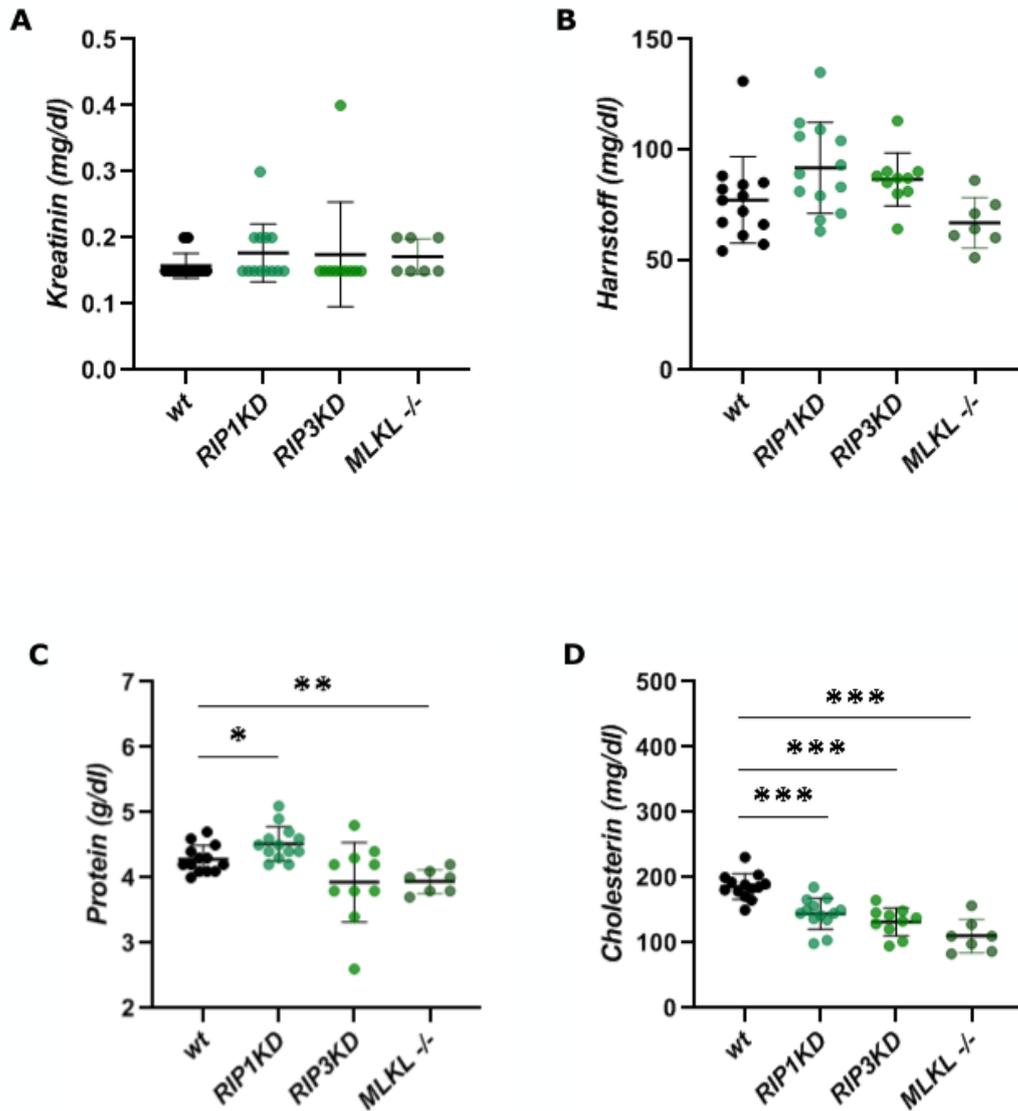


Abbildung 15: Serumanalyse an Tag 14 der NTN

Es wurden Nierenfunktionsparameter im Serum an Tag 14 der NTN bestimmt. Bezüglich des Kreatinins (A) und des Harnstoffes (B) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen festgestellt werden. Die RIP1kd-Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ein signifikant höheres Gesamtprotein im Serum (C), während sich dies hingegen bei den MLKL^{-/-} Tieren verminderte. Hier bestand kein Unterschied zwischen Wildtyp- und RIPK3kd-Tieren. Es konnte sowohl bei RIP1kd-Tieren, als auch bei RIPK3kd- und MLKL^{-/-} Tieren eine signifikant verminderte Cholesterinämie nachgewiesen werden (D). Die Daten sind als Mittelwerte±SD dargestellt; n≥7; *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001.

3.5 Glomerulärer und tubulointerstitieller Nierenschaden

Die vergleichende Analyse der funktionellen Nierenparameter weist auf eine geringere Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere mit verminderter Al-

buminurie sowie erhöhtem Gesamtprotein im Serum bei den RIPK1kd-Tieren im Vergleich zum Wildtyp hin. Für die RIPK3kd- sowie MLKL-*Knockout*-Tiere konnte kein Unterschied festgestellt werden. In der Folge wurde evaluiert, ob diese funktionellen Parameter jeweils mit dem Ausmaß der strukturellen Schädigung der Glomeruli und des Tubulointerstitiums in den einzelnen Genotypen korrelieren.

Zur Evaluation der glomerulären Matrixablagerung und Sklerose wurden histologische Schnitte des Nierengewebes angefertigt, mit *Periodic Acid Schiff* (PAS) gefärbt und die Glomeruli mithilfe eines semiquantitativen Scores (vgl. Kapitel 2.5.3) beurteilt. Bei den RIPK1kd-Mäusen zeigte sich hier ein signifikant verminderter glomerulärer Sklerose-Score mit verminderter Deposition extrazellulärer Matrix im Vergleich zu den Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu konnte beim RIPK3kd-Genotyp eine Verminderung der glomerulären Sklerose nicht nachgewiesen werden. Bei den MLKL-/- Tieren zeigte sich ein tendenziell verminderter Sklerose-Score, jedoch erreichte dieser Unterschied nicht das Signifikanzniveau (**Abbildung 16**).

Die verminderte Albuminurie bei den RIPK1kd-Tieren spricht für eine geringere Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere. Nephrin ist als podozytäres Transmembranprotein und Teil der Schlitzmembran zwischen den Podozytenfortsätzen entscheidend am Aufbau dieser Filtrationsbarriere beteiligt und wird im Rahmen einer Podozytenschädigung bei nephrotischem Syndrom vermindert exprimiert. Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expression von Nephrin in den RIPK1kd-, RIPK3kd- sowie MLKL-*Knockout*-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren mittels quantitativer *Real Time*-PCR untersucht. Hier konnte zwischen den einzelnen Genotypen kein signifikanter Expressionsunterschied festgestellt werden (**Abbildung 16**). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die verminderte Proteinurie im RIPK1kd-Genotyp eher aus einer verminderten Schädigung anderer Bestandteile der glomerulären Filtrationsbarriere wie beispielsweise der glomerulären Endothelzellen oder der glomerulären Basalmembran resultiert.

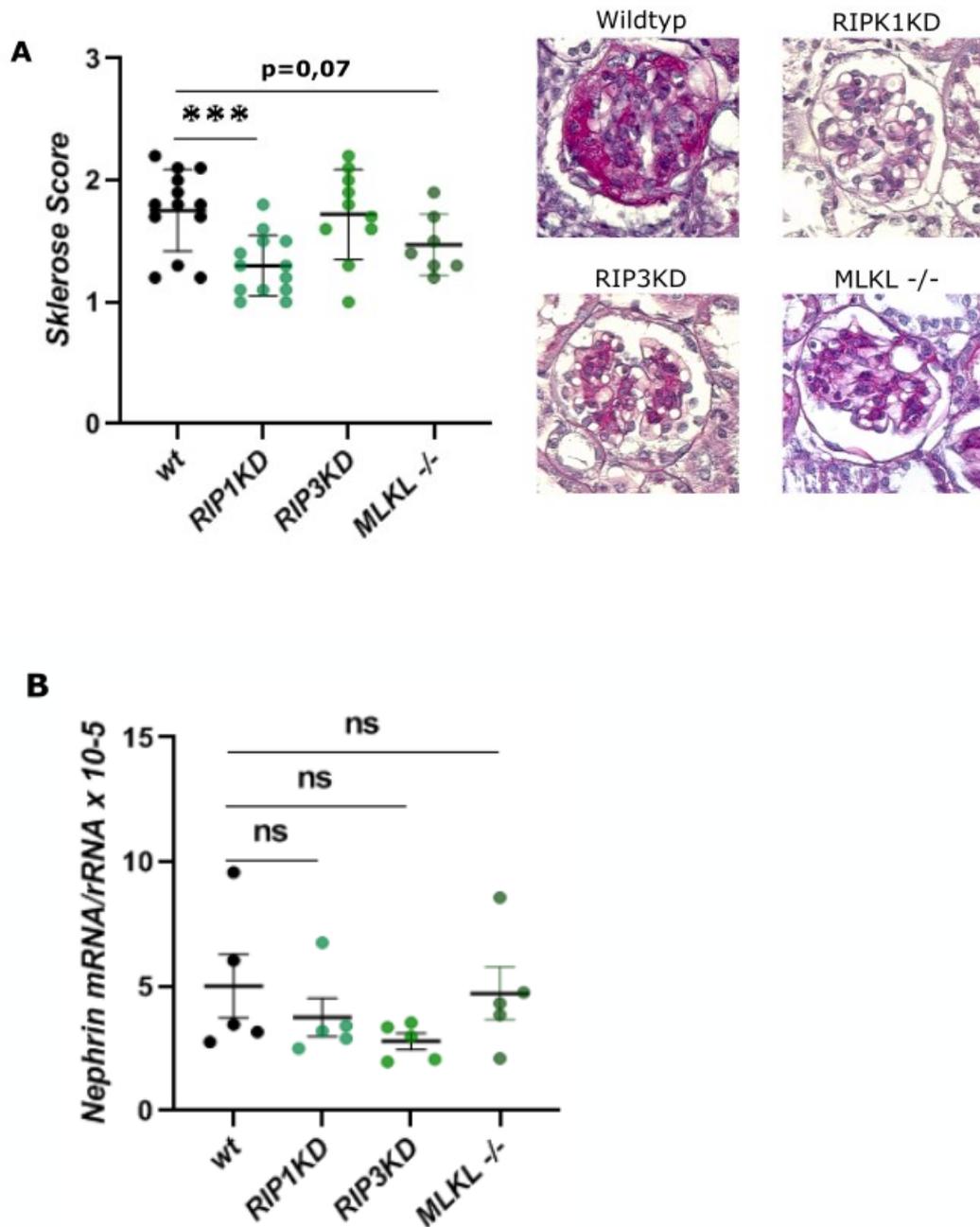


Abbildung 16: Evaluation des glomerulären Schadens

Das Ausmaß der Glomerulosklerose wurde mittels semiquantitativem Score in der PAS-Färbung bestimmt (A). Es zeigte sich eine signifikant verminderte Glomerulosklerose in den RIP1kd-Tieren im Vergleich zum Wildtyp. Zwischen RIP3kd- sowie MLKL-/- Tieren und Wildtyp-Tieren konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Nephtrin-mRNA-Expression erfolgte in allen Genotypen in vergleichbarem Maße. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar, $n \geq 5$ je Gruppe, *** $p < 0,001$

Die glomeruläre Schädigung und daraus resultierende Albuminurie geht bei der NTN wie bei chronischen Glomerulonephritiden des Menschen sekundär auch mit einem tubulointerstitiellen Nierenschaden einher. Aus diesem Grunde wurde

die mRNA-Expression verschiedener tubulärer Schadensmarker mittels quantitativer *Real Time*-PCR analysiert. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2* (TIMP-2) wird in renalen Tubuluszellen als Reaktion auf eine Schädigung der DNA oder andere Formen des Zellstress vermehrt exprimiert. Es zeigte sich eine signifikant verminderte mRNA-Expression von TIMP-2 bei den RIPK1kd-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren am Tag 14 der NTN. Im RIPK3kd- sowie MLKL-*Knockout*-Tieren konnte ebenfalls eine tendenziell verminderte Expression von TIMP-2 nachgewiesen werden, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen (**Abbildung 17**). Ein weiterer tubulärer Schadensmarker ist *Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin* (NGAL). Es konnte sowohl bei den RIPK1kd- als auch bei den MLKL-*Knockout*-Tieren eine verminderte mRNA-Expression von NGAL nachgewiesen werden, dieser Unterschied erreichte jedoch aufgrund der großen Schwankung bei den Wildtyp-Tieren nicht das Signifikanzniveau. Das Expressionslevel von NGAL bei den RIPK3kd-Tieren war vergleichbar mit jenem der Kontrolltiere (**Abbildung 17**).

Die anhaltende Gewebeschädigung bei chronisch entzündlichen Nierenerkrankungen führt über eine Aktivierung von Fibroblasten und anderen Zelltypen des Tubulointerstitiums zur Produktion extrazellulärer Matrix. Es kommt zur Bildung und interstitiellen Ablagerung von Kollagen-Fasern, bestehend aus Kollagen Typ I und III sowie Fibronectin und letztendlich zum bindegewebigen Umbau des tubulointerstitiellen Nierengewebes, einer progredienten renalen Fibrose [46]. Als Marker für das Ausmaß der tubulointerstitiellen Fibrose wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA-Expression von Prokollagen I sowie Fibronectin im Vergleich zwischen den Genotypen untersucht. Bei den RIPK1kd-Tieren zeigte sich eine signifikant verminderte Expression sowohl von Prokollagen I, als auch von Fibronectin als Hinweis auf verminderten fibrotischen Umbau des Nierengewebes. Im Gegensatz dazu wurden die untersuchten Fibrosemarker bei den RIPK3kd-Tieren in vergleichbarem Ausmaß zur Kontrollgruppe exprimiert. Bei den MLKL-defizienten Tieren zeigte sich auch eine verminderte Expression von Prokollagen I sowie Fibronectin.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass in RIPK1kd-Mäusen mit NTN verminderter glomerulärer und tubulointerstitieller Zelltod mit einer geringeren glomerulären Schädigung als auch geringerer Tubulusschaden unter

renaler Fibrose korreliert. In RIPK3kd-Mäusen sind dagegen sowohl das Ausmaß von Zelltod als auch glomerulärer und tubulointerstitieller Schädigung im Vergleich zu Wildtypieren nicht signifikant verschieden. In MLKL-defizienten Mäusen findet sich interessanterweise neben dem nichtsignifikanten Trend zu geringerem glomerulären und tubulointerstitiellen Zelltod eine ähnliche nichtsignifikante Tendenz zu geringerem glomerulärem und tubulärem Schaden und eine signifikante Reduktion der extrazellulären Matrixproduktion.

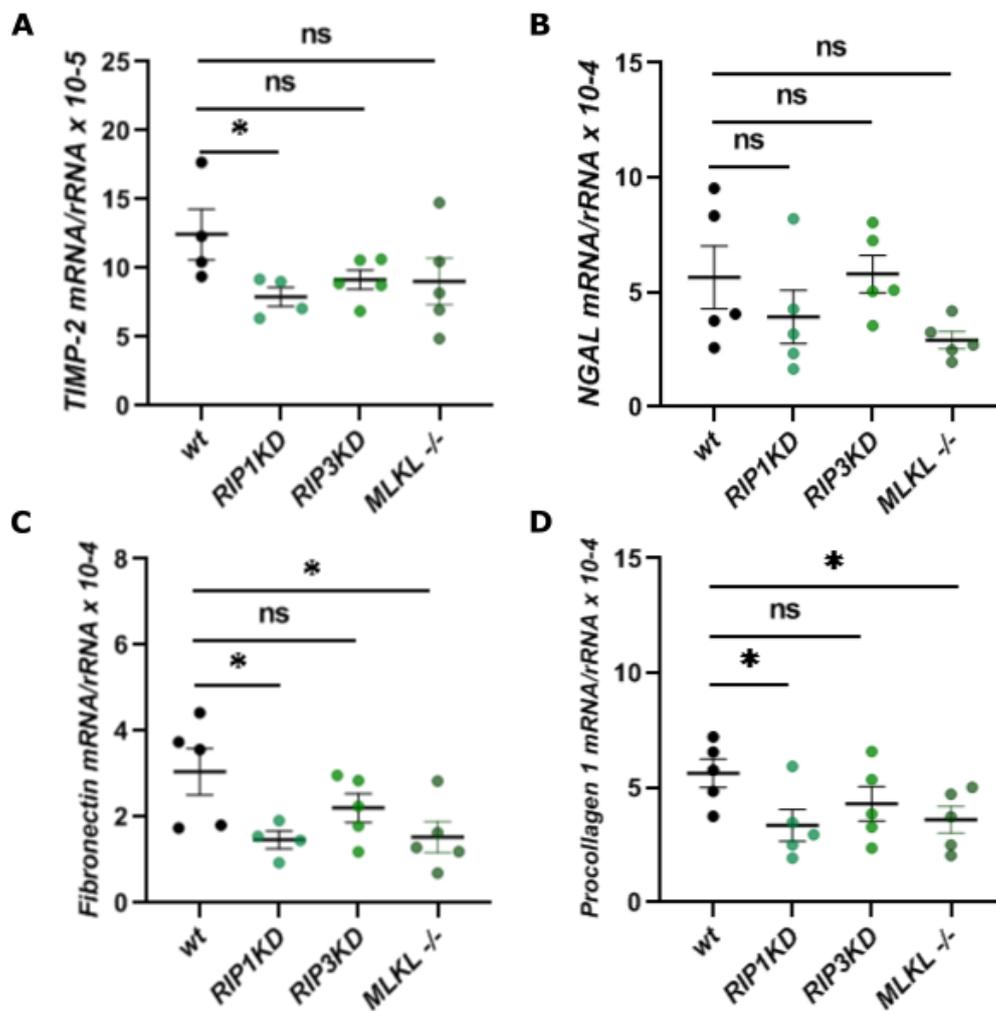


Abbildung 17: mRNA-Expression von Markern für tubulointerstitiellen Schaden und renaler Fibrose

Die mRNA-Expression des tubulären Schadensmarker TIMP-2 (A) war bei den RIPK1kd-Tieren signifikant und bei den RIPK3kd- und MLKL^{-/-} Tieren tendenziell vermindert. Hinsichtlich der Expression von NGAL (B), ebenfalls ein tubulärer Schadensmarker, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ermittelt werden, bei den RIPK1kd- und MLKL^{-/-} Tieren zeigte sich jedoch eine tendenziell verminderte Expression. Die mRNA-Expression von Fibronectin (C) und Procollagen 1 (D), beides Fibrosemarker, war bei den RIPK1kd- und bei den MLKL^{-/-} Tieren im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermindert. Bei den RIPK3kd-Tieren zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar, n=5 je Gruppe, *p<0,05

3.6 Renale Leukozyteninfiltration

Eine zentrale Rolle im Rahmen von Entzündungsreaktionen spielt die Rekrutierung von Zellen des Immunsystems in geschädigtes Gewebe, wo sie wichtige Funktionen bei der Beseitigung von Pathogenen oder abgestorbenem Gewebe ausüben. Um die renale Entzündungsreaktion im Modell der autologen NTN näher zu charakterisieren und um zu untersuchen, ob Unterschiede zwischen den Genotypen bezüglich des Zelltodes und renaler Schädigung mit einem unterschiedlichen Ausmaß der Inflammation korrelieren, wurde die renale Leukozyteninfiltration mittels Immunhistochemie kompartimentspezifisch analysiert.

Um die Rekrutierung von T-Lymphozyten zu quantifizieren, wurde diese mittels Hamster anti-Maus-CD3 angefärbt und kompartimentspezifisch ausgezählt. Hier zeigte sich sowohl glomerulär als auch tubulointerstitiell kein signifikanter Unterschied in der Zahl infiltrierender T-Zellen zwischen den Genotypen (**Abbildung 18**). Die renale Makrophageninfiltration wurde glomerulär mithilfe der Mac-2-Färbung und tubulointerstitiell mittels F4/80-Färbung quantifiziert. Glomerulär zeigte sich sowohl in den RIPK1kd-, als auch den MLKL-/- Tieren eine signifikant niedrigere Akkumulation von Mac-2⁺ Makrophagen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren, während sich bei den RIPK3kd-Tieren kein Unterschied zeigte. Tubulointerstitiell war bezüglich des Influx von F4/80⁺ Makrophagen kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen zu sehen. Des Weiteren wurde die tubulointerstitielle Rekrutierung der ER-HR3⁺ Subpopulation von Makrophagen quantifiziert. Es zeigte sich eine tendenziell verminderte Infiltration in den RIPK1kd- sowie RIPK3kd-Versuchstieren im Vergleich zum Wildtyp, dieser Unterschied erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau (**Abbildung 18**).

Diese immunhistologische Auswertung zeigt, dass in RIPK1kd-Mäusen verminderter glomerulärer Zelltod, verminderte glomeruläre Schädigung und Sklerose auch mit einer geringeren Akkumulation glomerulärer Makrophagen korreliert. Im Tubulointerstitium sind dagegen geringerer renaler Zelltod und Zeichen einer geringeren tubulointerstitiellen Schädigung nicht mit einer signifikant verminderten Leukozytenakkumulation assoziiert. In RIPK3kd-Mäusen ergibt sich ähnlich wie beim Ausmaß des Zelltodes und der renalen Schädigung kein signifikanter Unterschied der Leukozyteninfiltration im Vergleich zu Wildtypkontrollen. Dage-

gen korreliert der tendenziell verminderte glomeruläre Zelltod und Schaden in MLKL-defizienten Tieren mit einer signifikant reduzierten Akkumulation glomerulärer Makrophagen.

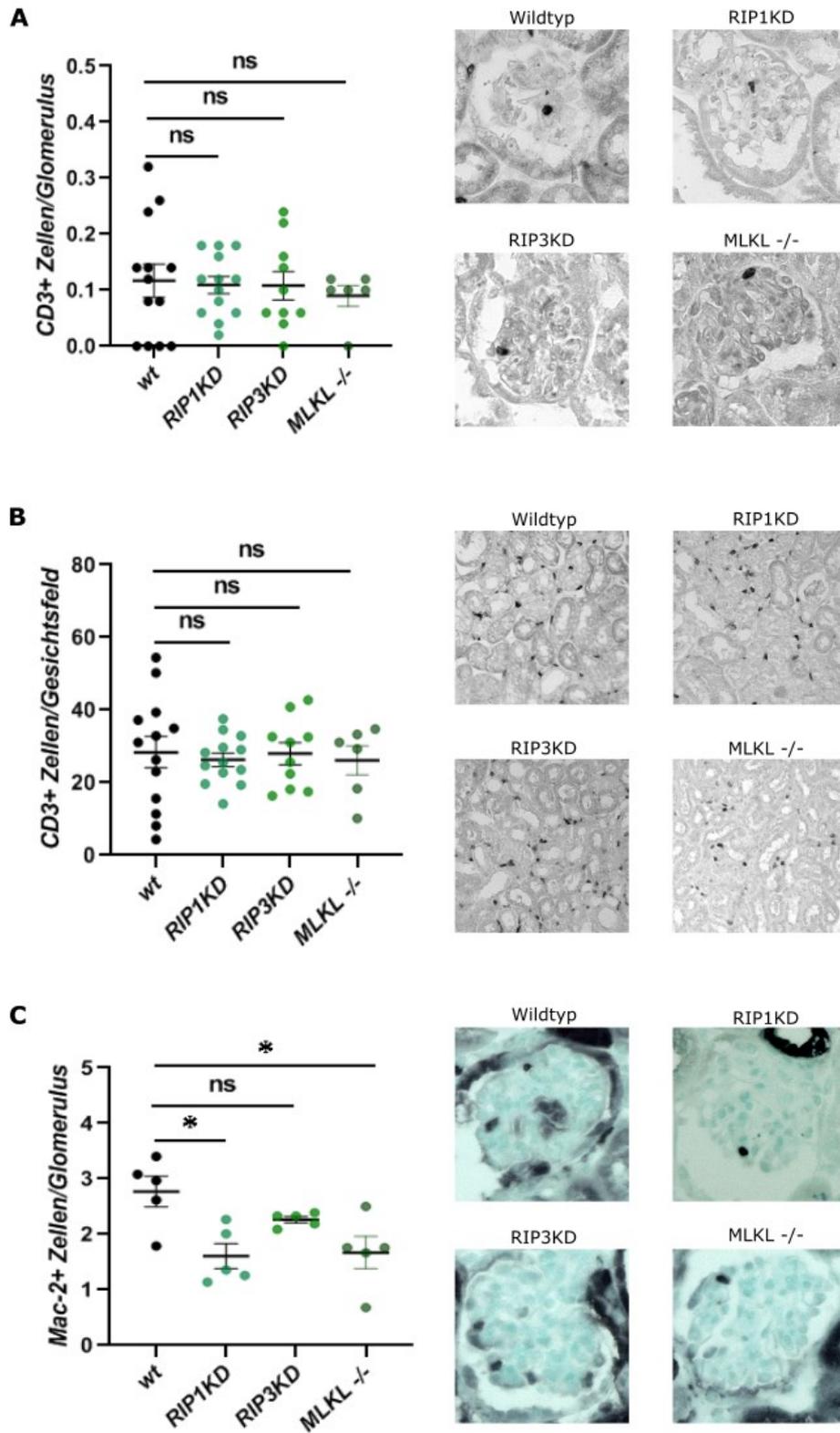


Abbildung 18: Fortsetzung nächste Seite

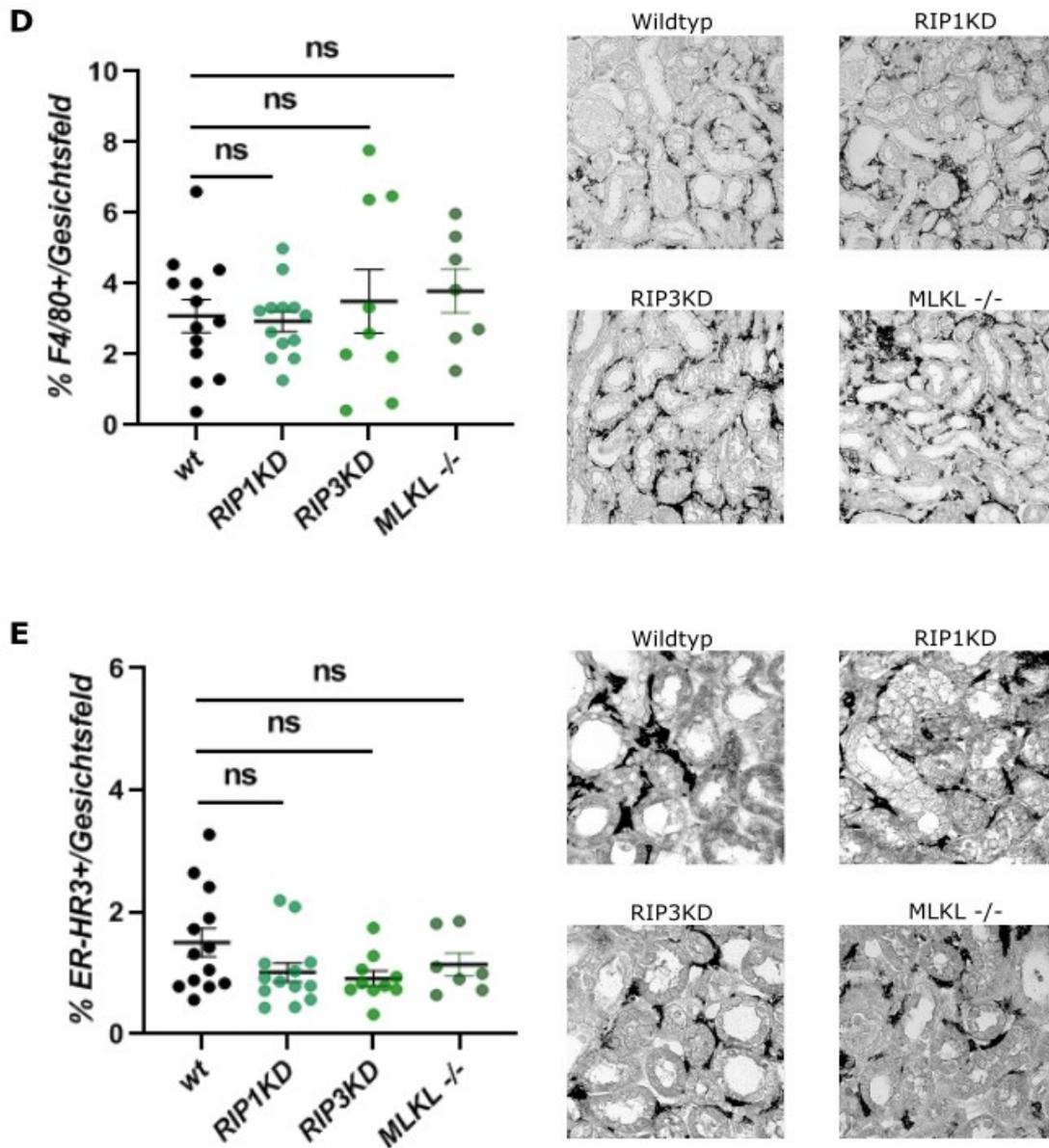


Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse der Leukozyteninfiltration

Hinsichtlich der glomerulären (A) und tubulointerstitiellen (B) Infiltration von $CD3^+$ T-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. Im RIPK1kd- sowie MLKL-/- Genotyp waren signifikant weniger $Mac2^+$ glomeruläre Makrophagen (C) als beim Wildtyp nachzuweisen. Hier wiesen die RIPK3kd-Tiere keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren auf. Die Infiltration von $F4/80^+$ Makrophagen (D) sowie $ER-HR3^+$ Makrophagen (E) in das Tubulointerstitium erfolgte bei allen untersuchten Genotypen in gleichem Maße. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM, $n \geq 5$ je Gruppe, $*p < 0,05$

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im RIPK1kd-Genotyp die verminderte glomeruläre Schädigung, einhergehend mit verbesserten funktionellen Parametern, auch mit einer vor allem glomerulär betonten geringeren Makrophageninfiltration korreliert.

3.7 Expression von Entzündungsmediatoren in der Niere

Die Rekrutierung von Immunzellen in geschädigtes Gewebe wird wesentlich durch proinflammatorische Zytokine und Chemokine gesteuert. Die Expression dieser Entzündungsmediatoren im Gesamtnierengewebe wurde mittels quantitativer *Real Time*-PCR untersucht (**Abbildung 19**).

Im RIPK1kd-Genotyp zeigte sich eine tendenziell verminderte mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 sowie eine signifikant verminderte Expression des eine Rekrutierung von Makrophagen bewirkenden Zytokins IL-1 β , während bezüglich des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 kein Unterschied zu den Kontrolltieren festzustellen war. Zudem war die mRNA-Expression der für die Leukozytenrekrutierung wichtigen Chemokine CCL2 tendenziell und CCL5 signifikant vermindert. Bei der Expression des für die Rekrutierung von Effektor-T-Zellen wichtigen Chemokins CXCL-10 konnte kein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Immunhistochemie, bei der sich eine vergleichbare renale Infiltration von CD3⁺ T-Zellen in beiden Gruppen zeigte.

Bei den RIPK3kd-Mäusen konnte ebenfalls eine tendenziell verminderte Expression der Zytokine TNF α und IL-6 sowie eine signifikant verminderte Expression des Zytokins IL-1 β nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich eine Tendenz zur verminderten Expression der Chemokine CCL-2, CCL-5 und CXCL10, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wurde auch hier vergleichbar zu den Kontrolltieren exprimiert.

In den MLKL-defizienten Tieren konnte eine signifikant verminderte Expression von IL-6 sowie CCL5 im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Auch die Expression von TNF α , IL-1 β sowie CCL2 war tendenziell vermindert, während CXCL10 in einem mit den Kontrolltieren vergleichbarem Maße exprimiert wurde. Auch bezüglich des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen festzustellen.

In der Zusammenschau zeigte sich eine insgesamt verminderte renale Entzündungsreaktion im RIPK1kd-Genotyp, mit verminderter glomerulärer Makrophagen-Infiltration sowie verminderter renaler Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. Interessanterweise zeigte sich eine tendenziell, zum

Teil auch signifikant verminderte Expression proinflammatorischer Mediatoren auch in nephritischen Nieren der RIPK3kd- und MLKL-defizienten Mäuse.

Um auszuschließen, dass diese Unterschiede auf eine verminderte systemisch Immunreaktion mit reduzierter adaptiver Immunantwort auf das nephrotoxische Serum zurückzuführen sind, wurden im Anschluss die lokale und systemische T-Zell-Aktivierung, die Bildung autologer Antikörper sowie die glomeruläre Immunkomplexablagerung in den vier Genotypen untersucht.

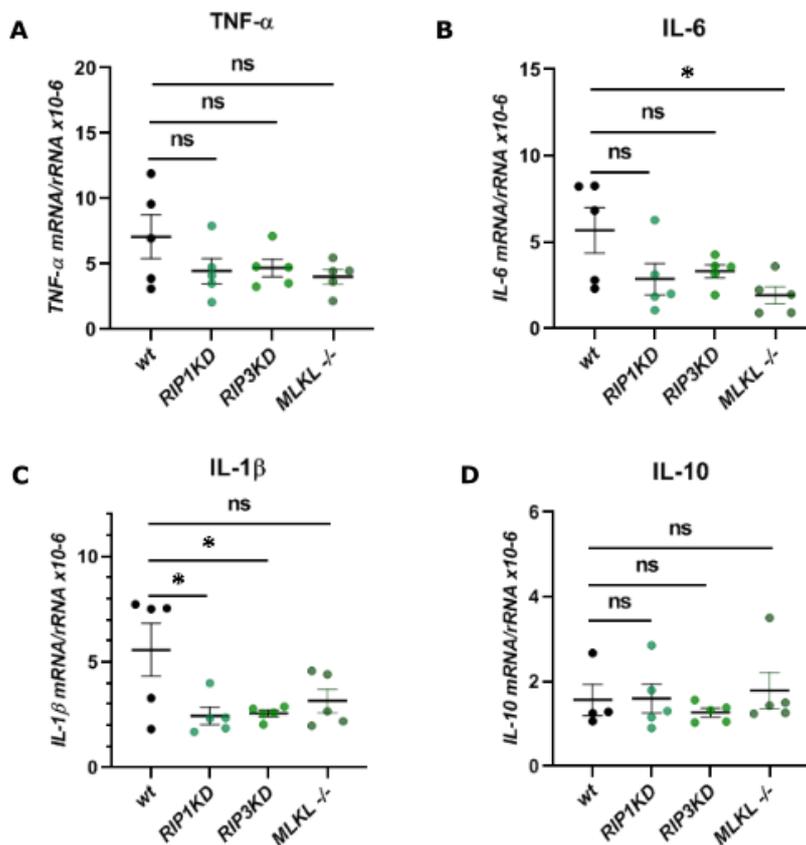


Abbildung 19: Fortsetzung nächste Seite

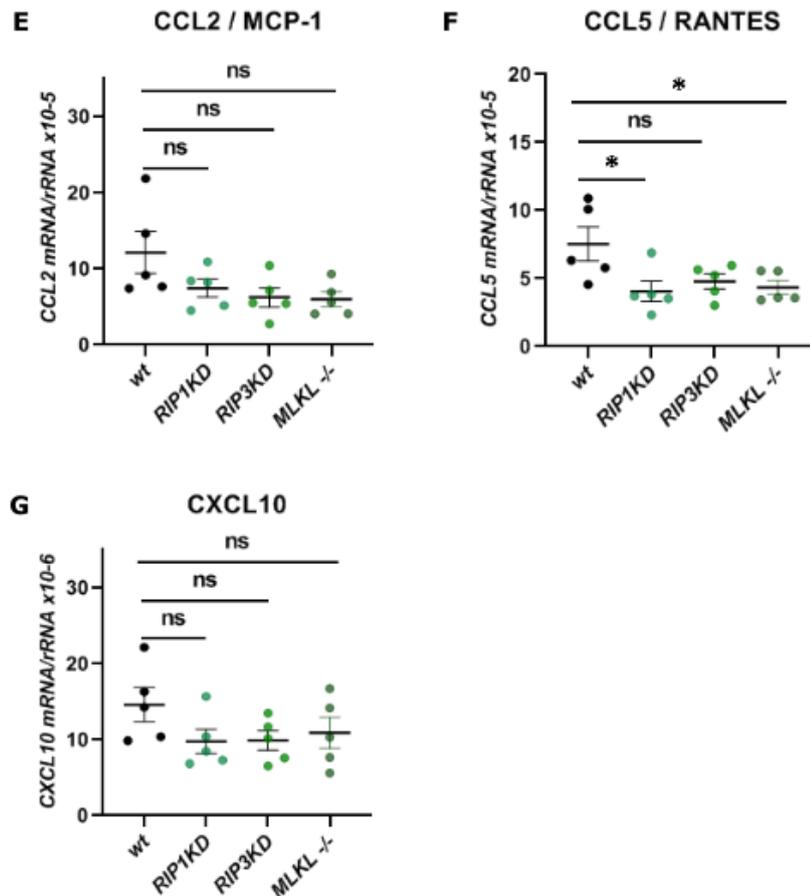


Abbildung 19: Renale mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren an Tag 14 der NTN
 Es wurden die Expression der proinflammatorischen Mediatoren TNF- α , IL-6, IL-1 β , CCL2, CCL5 und CXCL10 sowie des antiinflammatorischen IL-10 untersucht. Die RIPK1kd- und MLKL-/- Tiere zeigten tendenziell eine verminderte Expression proinflammatorischer Mediatoren. Dies war bei den RIPK3kd-Tieren weniger stark ausgeprägt. Hinsichtlich des antiinflammatorischen IL-10 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM, n=5 je Gruppe, *p<0,05

3.8 Lokale und systemische T-Zell-Aktivierung

Entscheidend in der autologen Phase der nephrotoxischen Serumnephritis ist die gegen die glomerulär abgelagerten heterologen Antikörper gerichtete adaptive Immunantwort. Besonders die Rolle Th1-abhängiger Effektormechanismen mit Aktivierung nephritogener T-Zellen, nachfolgender Aktivierung von Makrophagen sowie die T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung wurden hier als essentiell beschrieben [19, 47]. Zur Charakterisierung der adaptiven Immunantwort in den einzelnen Genotypen wurde aus diesem Grunde an Tag 14 der NTN die T-Zell-

Aktivierung mittels des Aktivierungsmarkers CD69 durchflusszytometrisch untersucht [43]. Durch die Analyse von T-Zellen sowohl in den lokoregionären Lymphknoten, als auch in der Milz wurde die lokale und die systemischen T-Zell-Aktivierung analysiert.

Da die Injektion der Präimmunisierungslösung im Modell der autologen NTN subkutan in die Leisten der Mäuse erfolgte, wurde für die Analyse der lokalen T-Zell-Aktivierung paraaortale Lymphknoten entnommen und durchflusszytometrisch untersucht (**Abbildung 20**). Hier zeigte sich bei den RIPK1kd-Mäusen ein signifikant erniedrigter Anteil sowohl an aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten als auch an aktivierten CD8⁺ T-Lymphozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Analyse der T-Zellen in der Milz zeigte, dass hinsichtlich der systemischen T-Zell-Aktivierung kein signifikanter Unterschied zwischen RIPK1kd- und Wildtyp-Mäusen bestand.

Bei den RIPK3kd- sowie MLKL-*Knockout*-Tieren zeigte sich hinsichtlich der lokalen T-Zell-Aktivierung durchflusszytometrisch kein signifikanter Unterschied. Während die systemische T-Zell-Aktivierung bei den MLKL-*Knockout*-Mäusen ebenfalls vergleichbar mit den Wildtyp-Kontrolltieren erfolgte, war interessanterweise bei den RIPK3kd-Tieren der Anteil aktivierter CD8⁺ T-Lymphozyten im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt. Bezüglich der aktivierten CD4⁺ T-Zellen zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass bei vergleichbarer systemischer T-Zellaktivierung vermindert aktivierte lokoregionäre T-Lymphozyten in nephritischen RIPK1kd-Mäusen zur geringeren renalen Inflammation beitragen könnten.

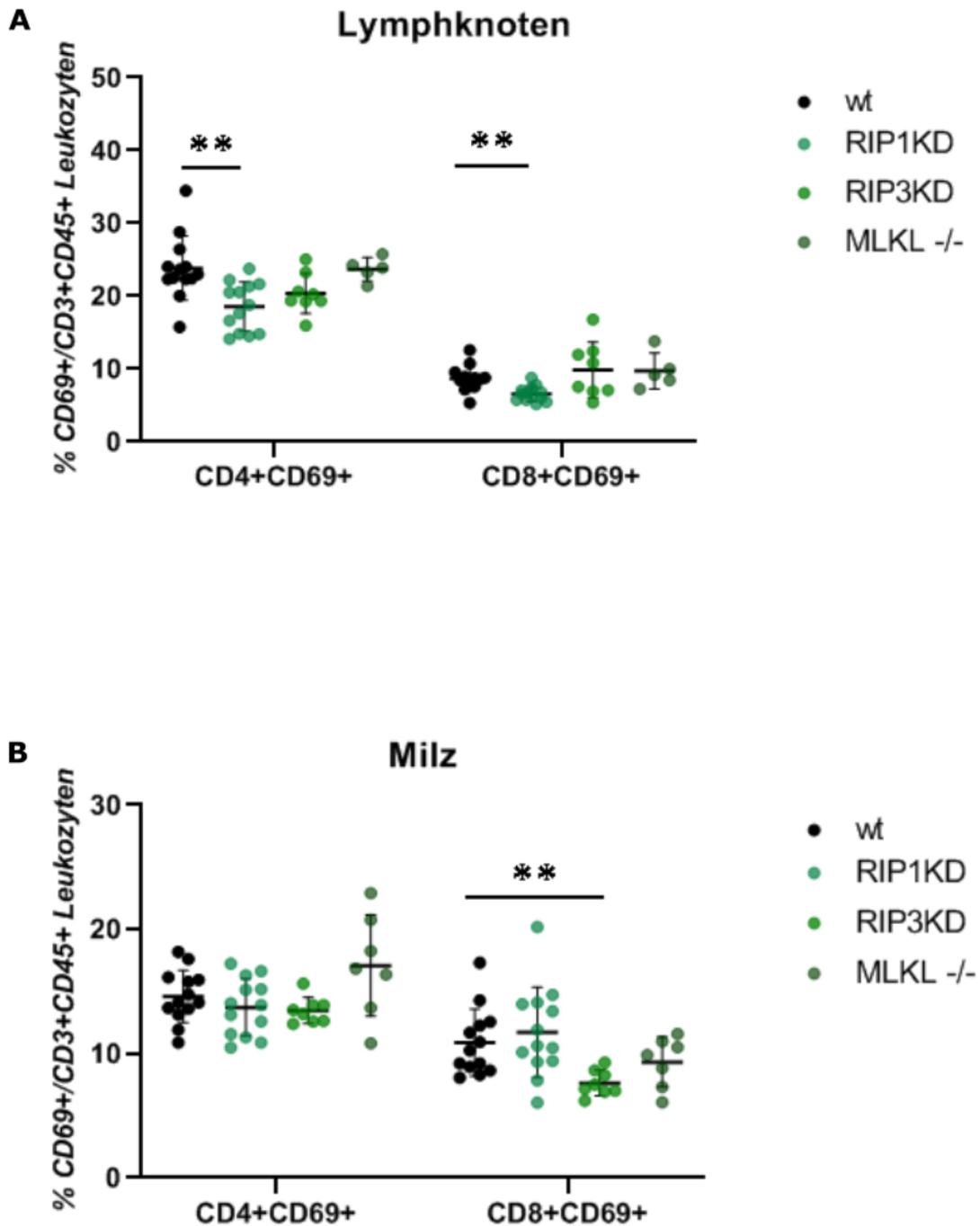


Abbildung 20: Analyse der lokalen und systemischen T-Zell-Aktivierung

Die Analyse der lokalen (A) und systemischen (B) T-Zell-Aktivierung erfolgte durchflusszytometrisch mithilfe des Aktivierungsmarkers CD69. In den paraaortalen Lymphknoten zeigte sich bei den RIPK1kd-Tieren signifikant weniger aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, während bei den RIPK3kd- und MLKL^{-/-} Tieren hier kein signifikanter Unterschied nachweisbar war. In der Milz waren bei den RIPK3kd-Tieren signifikant weniger aktivierte CD8⁺ T-Lymphozyten nachweisbar, während sich hinsichtlich der CD4⁺ Zellen kein signifikanter Unterschied zeigte. Auch bei den RIPK1kd- und MLKL^{-/-} Tieren war in hinsichtlich der T-Zell-Aktivierung in der Milz kein signifikanter Unterschied nachweisbar. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM, n≥7 je Gruppe, *p<0,05, **p<0,01

3.9 Humorale Immunantwort auf das nephrotoxische Serum

Die Bildung und glomeruläre Ablagerung autologer Antikörper gegen die glomerulär abgelagerten heterologen Antikörper des nephrotoxischen Serums trägt zur glomerulären Schädigung in der autologen Phase der nephrotoxischen Serumnephritis bei [19]. Um zu überprüfen, ob diese adaptive Immunantwort in allen Genotypen in gleicher Weise erfolgte, wurden die im Blut zirkulierenden autologen anti-Schaf-Immunglobuline mittels ELISA quantifiziert. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen RIPK1kd-, RIPK3kd-, sowie MLKL-defizienten Tieren und Wildtyp-Tieren festgestellt werden. Es zeigten sich sogar tendenziell erhöhte IgG-Spiegel bei den RIPK1kd-Mäusen (**Abbildung 21**). Dies spricht dafür, dass in den einzelnen Genotypen eine vergleichbare humorale Immunantwort in der autologen Phase der NTN vorliegt.

Zudem wurde die glomeruläre Ablagerung von murinen autologen IgG-Antikörpern mittels Immunhistochemie untersucht. Auch hier war kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen nachweisbar (**Abbildung 21**). Da die Bildung und glomeruläre Ablagerung der autologen Immunglobuline gegen das nephrotoxische Serum bei allen Genotypen in gleichem Maße erfolgte, kann somit davon ausgegangen werden, dass Unterschiede im Verlauf der Glomerulonephritis zwischen den einzelnen Genotypen nicht auf Veränderungen der adaptiven humoralen Immunantwort zurückzuführen sind.

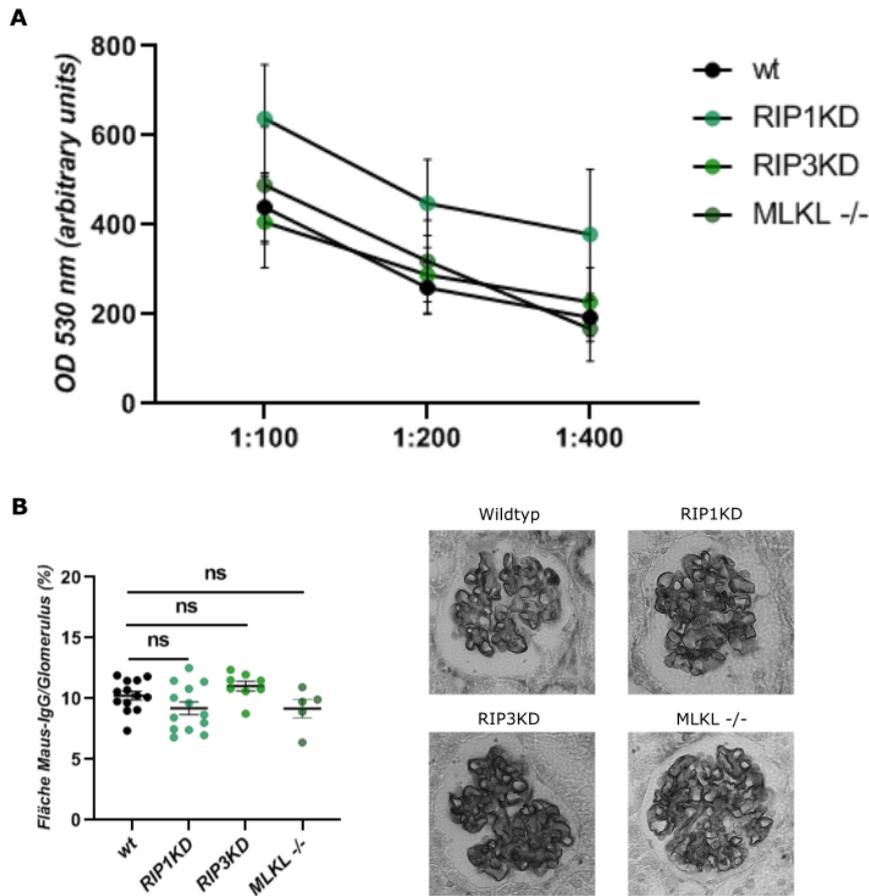


Abbildung 21: Analyse der adaptiven Immunantwort auf das nephrotoxische Serum

Es wurden die Titer der autologen Anti-Schaf-IgG-Antikörper mittels ELISA bestimmt (A). Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen, mit einer Tendenz zu höheren Antikörper-Titern bei den RIP1kd-Tieren. Zudem wurden die glomeruläre Ablagerung der autologen IgG-Antikörper immunhistochemisch analysiert. Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen nachweisbar. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar, $n \geq 7$ je Gruppe

4 Diskussion und Ausblick

Zelltod ist einer der wesentlichen Mechanismen des menschlichen Körpers, um physiologische Prozesse wie Wachstum oder Aufrechterhaltung einer Homöostase, aber beispielsweise auch die Abwehr von Pathogenen zu ermöglichen. Andererseits spielen verschiedene Arten von Zelltod auch pathophysiologisch eine zentrale Rolle in einer Vielzahl von Erkrankungen. In den letzten Jahren wurde hierbei besonders Mechanismen der regulierten Nekrose zunehmend untersucht und deren Bedeutung in einer Reihe von Krankheitsmodellen nachgewiesen [26]. Ein besonders gut charakterisierter Mechanismus hierunter ist die durch die Proteinkinasen RIPK1 und RIPK3 sowie das Effektormolekül MLKL vermittelte Nekroptose.

In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen konnte die Nekroptose bereits als pathophysiologisch relevanter Mechanismus identifiziert werden. Dies umfasst unter anderem neurologische [48, 49] und kardiovaskuläre Erkrankungen [50] sowie Infektionskrankheiten [51, 52], aber auch diverse Neoplasien [53, 54]. Auch in Tiermodellen für verschiedene Nierenerkrankungen finden sich Hinweise auf eine wesentliche Beteiligung der Nekroptose [55-58].

Die Tatsache, dass Nekroptose zur Freisetzung immunogener Zellbestandteile führt, und auf der anderen Seite ihrerseits durch proinflammatorische Mediatoren wie beispielsweise TNF α oder IFN γ ausgelöst werden kann, verdeutlicht die enge Verknüpfung zwischen reguliertem Zelltod und Inflammation [21, 31, 59]. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Nekroptose auch bei chronisch entzündlichen Nierenerkrankungen pathophysiologisch relevant sein könnte. In dieser Arbeit sollte deshalb die funktionelle Bedeutung der Nekroptose in der autologen nephrotoxischen Serumnephritis, einem Mausmodell für eine chronische Immunkomplex-Glomerulonephritis, charakterisiert werden. Dem liegt die Hypothese zugrunde, dass verminderte Nekroptose und konsekutiv verminderter Inflammationsreaktion zu einem verbesserten Verlauf der Glomerulonephritis führt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Rolle der Nekroptose anhand von RIPK1kd-, RIPK3kd- sowie MLKL-defizienten transgenen Mäusen analysiert. Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur interpretiert und diskutiert werden.

4.1 Vermehrte Proteinexpression von RIPK1 und RIPK3 in der NTN

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit, mit der nach der Induktion von Zelltod dieser in Form von Nekroptose auftritt, unter anderem vom RIPK3-Expressionsniveau abhängig ist [58, 60-62]. So kann neben Apoptosehemmern auch eine gesteigerte Expression von RIPK3 dazu führen, dass anstelle von Apoptose vermehrt Nekroptose abläuft [60, 61, 63].

Übereinstimmend hiermit konnte in verschiedenen Tiermodellen, in denen die Nekroptose als pathophysiologisch relevanter Mechanismus identifiziert wurde, eine deutlich gesteigerte Expression sowohl von RIPK1 als auch RIPK3 im jeweils betroffenen Organ nachgewiesen werden [62, 64]. In der Niere wurde eine gesteigerte Expression im Rahmen von akuten tubulointerstitiellen Nierenerkrankungen, aber auch nach subtotaler Nephrektomie, einem Modell für die chronische Niereninsuffizienz, beschrieben [55, 57, 58, 65].

In dieser Arbeit wurde deshalb zunächst in Wildtyp-Mäusen die renale Proteinexpression von RIPK1 und RIPK3 im Rahmen der NTN mittels Western Blot des Gesamtnierenlysats quantifiziert und mit jener von gesunden Tieren verglichen. Es zeigte sich eine signifikant gesteigerter Proteingehalt sowohl von RIPK1 als auch RIPK3 in nephritischen Nieren mit NTN. Dies kann in Übereinstimmung mit den oben angeführten Studien als Hinweis auf im Rahmen der NTN vermehrt auftretende renale Nekroptose gewertet werden. Linkermann et al. zeigten jedoch anhand des Ischämie-Reperusions-Modells der Niere, dass regulierter Zelltod auch innerhalb eines Modells durch mehrere unabhängige Signalwege vermittelt werden kann [57]. Um die pathophysiologische Relevanz der Nekroptose im NTN-Modell zu analysieren, wurde nun anhand von RIPK1kd-, RIPK3kd- und MLKL-defizienten Mäusen untersucht, ob sich eine funktionelle Blockade der Nekroptose im Modell der autologen NTN protektiv auf Funktion und Morphologie der Niere auswirkt.

4.2 Einfluss von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf renalen Zelltod in der NTN

Nach der dieser Arbeit zugrundeliegenden Hypothese sollte sich ein Fehlen der Kinaseaktivitäten von RIPK1 und RIPK3 sowie der Pseudokinase MLKL durch verminderte Nekroptose protektiv auf den Verlauf der NTN auswirken. Aus diesem Grund wurde das Ausmaß des regulierten Zelltodes in der Niere mittels TUNEL-Färbung kompartimentspezifisch analysiert. Hierbei ist zu bedenken, dass die TUNEL-Färbung DNA-Fragmente detektiert und somit nicht nur spezifisch Nekroptose, sondern auch Apoptose, andere Formen des regulierten Zelltodes wie beispielsweise Ferroptose, aber auch Nekrose nachweist [66, 67].

Korrelierend mit dem geringeren Ausmaß der Albuminurie sowie der Glomerulosklerose zeigte sich bei den RIPK1^{kd}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp glomerulär eine signifikant verminderte Anzahl an TUNEL⁺ Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie (**Abbildung 13**). Auch tubulointerstitiell war bei den RIPK1^{kd}-Mäusen die Anzahl an TUNEL⁺ Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren signifikant vermindert (**Abbildung 13**). Dies erscheint plausibel, da vermehrte Proteinurie zu vermehrten tubulären Rückresorption, der Überladung von Tubuluszellen mit Proteinen und konsekutiv zu Inflammationsreaktionen und tubulärem Zelltod führt [68]. Über diesen Mechanismus könnte so nun auch die verminderte Proteinurie im RIPK1^{kd}-Genotyp protektiv auf Tubuluszellen wirken.

Entgegen der ursprünglichen Hypothese zeigte sich jedoch bei den RIPK3^{kd}-Tieren weder glomerulär noch tubulointerstitiell eine signifikante Reduktion der TUNEL⁺ Zellen. Dies stimmt mit mehreren bereits veröffentlichten Ergebnissen überein, die den Einfluss eines kompletten RIPK3-*Knockouts* auf den Verlauf einer autologen nephrotoxischen Serumnephritis analysierten [69, 70]. Spezifisch glomerulär [69] sowie kompartmentunabhängig [70] konnte in diesen Arbeiten kein verminderter TUNEL⁺ Zelltod bei den RIPK3-*Knockout*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Die Autoren vermuten, dass, obwohl möglicherweise im pathophysiologischen Kontext der NTN relevant, ein Fehlen von RIPK3 hier durch alternative Mechanismen kompensiert werden konnte [69]. Dies erscheint plausibel, insbesondere da die in Wildtyptieren nachgewiesene Induktion von RIPK3 auf Proteinebene vermuten lässt, dass im Rahmen der NTN durchaus RIPK3-vermittelte Nekroptose stattfindet. Zudem konnten

mehrere Studien zeigen, dass RIPK3-vermittelte Nekroptose und Caspase-8 vermittelte Apoptose konkurrierende Mechanismen bei der Vermittlung von Zelltod sind, die sich gegenseitig inhibieren [60, 63, 71]. Im Gegensatz zu komplett RIPK3-defizienten *Knockout*-Mäusen könnte in RIPK3kd-Mäusen verminderte Nekroptose durch das Fehlen der RIPK3-Kinaseaktivität durch verstärkte Apoptose kompensiert worden sein, die unabhängig von der RIPK3-Kinaseaktivität vermittelt wird.

Die Anzahl an TUNEL⁺ Zellen im MLKL^{-/-} Genotyp war zwar glomerulär und tubulointerstitiell tendenziell vermindert, allerdings erreichte dies knapp nicht das Signifikanzniveau (**Abbildung 13**). Dies könnte darauf hinweisen, dass eine MLKL-Defizienz schlechter durch andere Mechanismen des Zelltodes kompensiert werden kann als ein Fehlen der RIPK3-Kinaseaktivität. Dies ist insofern interessant, als dass lange die Phosphorylierung von MLKL durch RIPK3 als zentrale Voraussetzung für Nekroptose galt. Günther et al. beschrieben jedoch 2016 im Rahmen eines autoinflammatorischen Hepatitis-Modells eine zuvor unbekannte, RIPK3-unabhängige Funktion von MLKL [72]. In diesem Modell konnte ein durch RIPK1 und MLKL, nicht jedoch RIPK3 vermittelter Signalweg als pathophysiologisch relevanter Mechanismus des regulierten Zelltodes identifiziert werden. Diese Form des Zelltodes könnte somit auch im Verlauf der NTN eine mögliche Erklärung für die tendenzielle Verminderung der TUNEL⁺ Zellen in MLKL-defizienten Mäusen sein. Dennoch war diese deutlich weniger stark ausgeprägt als bei den RIPK1kd-Mäusen.

Möglicherweise tragen mehrere unterschiedliche Mechanismen des regulierten Zelltodes unabhängig voneinander zur Pathophysiologie der nephrotoxischen Serumnephritis bei. So konnte beispielsweise beim Ischämie-Reperusionsmodell der Niere bereits eine pathophysiologische Relevanz sowohl für die Nekroptose, als auch, in geringerem Ausmaß, für die sogenannte *Mitochondrial Permeability Transition* (MPT) nachgewiesen werden [57]. Hier zeigte eine kombinierte Blockade sowohl von Nekroptose als auch MPT den größten protektiven Effekt. An der Folsäure-induzierten Nephropathie konnte zudem eine sequentielle Beteiligung von zunächst Ferroptose und im Verlauf auch RIPK1- und RIPK3-abhängiger Nekroptose aufgezeigt werden [73, 74]. So besteht die Möglichkeit, dass einzelne Signalwege des regulierten Zelltodes

auch im Rahmen der Pathophysiologie weiterer Erkrankungen sich gegenseitig ergänzen und gegebenenfalls bei Ausfall eines einzelnen Signalweges kompensieren.

Die Tatsache, dass ein Fehlen der RIPK1-Kinaseaktivität zu stärkeren Reduktion des renalen Zelltodes führt, als dies im RIPK3^{kd}- und MLKL^{-/-} Genotyp zu beobachten war, führt zu der Frage, welcher pathophysiologisch relevante Mechanismus von der RIPK1-Kinaseaktivität, nicht aber von der RIPK3-Kinaseaktivität oder dem Effektormolekül MLKL abhängig ist. Da in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass die Kinaseaktivität von RIPK1 nicht nur Nekroptose, sondern unter bestimmten Umständen auch Apoptose vermitteln kann [27, 41, 75, 76], bleibt die RIPK1-vermittelte Apoptose auch hier als möglicher pathophysiologisch relevanter Mechanismus zu bedenken. Hierfür spricht, dass die Kinaseaktivität von RIPK3 ebenso wie MLKL nicht für Apoptose erforderlich sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Kinaseaktivität von RIPK1 ebenfalls eine Rolle bei der Produktion proinflammatorischer Chemokine und Zytokine spielt [38, 41, 77]. Da eine verminderte Inflamationsreaktion ihrerseits wiederum zu vermindertem Zelltod führt, könnte dies ebenfalls einen Mechanismus darstellen, mit dem die signifikante Reduktion an TUNEL⁺ Zellen im RIPK1^{kd}-Genotyp erklärbar wäre.

4.3 Einfluss von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf renale Funktion und Gewebeschädigung

Die RIPK1^{kd}-Mäuse entwickelten im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant verminderte Albuminurie an Tag 7 und Tag 14 der NTN, während das Ausmaß der Albuminurie bei den RIPK3^{kd}- sowie MLKL-defizienten Mäusen mit jenem der Wildtyp-Tiere vergleichbar war (**Abbildung 14**). Passend hierzu im Sinne eines verminderten nephrotischen Syndroms im RIPK1-Genotyp zeigte sich das Gesamtprotein im Serum signifikant höher als bei den Wildtyp-Tieren, während das Gesamtcholesterin signifikant erniedrigt war (**Abbildung 15**). Dies lässt auf eine verminderte Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere im RIPK1^{kd}-Genotyp schließen. Das Gesamtprotein im Serum der RIPK3^{kd}-Tiere zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp, während es bei den MLKL^{-/-} Tieren sogar sig-

nifikant erniedrigt war. Das Serumcholesterin zeigte sich bei RIPK3kd- und MLKL-Tieren signifikant erniedrigt. Die Analyse der mRNA-Expression von Nephrin, das in geschädigten Podozyten vermindert exprimiert wird, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die verminderte Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere im RIPK1kd-Genotyp eher durch einen protektiven Effekt auf glomeruläre Endothelzellen hervorgerufen wird. Linkermann et al. konnten in glomerulären Endothelzellen, nicht aber in Podozyten hohe Expressionsniveaus von RIPK1 und RIPK3 sowie eine erhöhte Anfälligkeit für RIPK1- und RIPK3-vermittelte Nekroptose nachweisen [56]. Dies könnte darauf hinweisen, dass der primär vom protektiven Effekt der fehlenden RIPK1-Kinaseaktivität betroffene glomeruläre Zelltyp glomeruläre Endothelzellen sind. Zu bedenken bleibt dennoch, dass sich in RIPK3kd- und MLKL-defizienten Mäusen kein protektiver Effekt bezüglich Albuminurie zeigte, sodass zumindest die RIPK3- und MLKL-vermittelte Nekroptose hier nicht als einziger pathophysiologisch relevanter Prozess gewertet werden kann und sehr wahrscheinlich nicht-nekroptotische Funktionen von RIPK1 wie RIPK1-vermittelte Apoptose ebenfalls eine Rolle spielen.

Auch histomorphologisch zeigte sich bei den RIPK1kd-Mäusen eine verminderte glomeruläre Schädigung im Sinne einer verminderten Glomerulosklerose in der PAS-Färbung, während diese bei den RIPK3kd-Tieren dem Wildtyp vergleichbar ausgeprägt und bei den MLKL-defizienten Tieren nur tendenziell vermindert nachweisbar war (**Abbildung 16**). Des Weiteren zeigte sich bei den RIPK1kd-Tieren eine signifikant verminderte mRNA-Expression von TIMP-2 sowie eine tendenziell verminderte Expression von NGAL, was auf eine verminderte tubuläre Schädigung in diesen Tieren hinweist (**Abbildung 17**). Diese könnte durch eine verminderte Schädigung von Tubuluszellen bei RIPK1-Kinasedefizienz, aber auch indirekt als Folge der verminderten Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere und konsekutiv verminderten Proteinurie auftreten. So beschrieben Ruggenenti et al., dass eine vermehrte glomeruläre Filtration von Proteinen zu einer übermäßigen tubulären Proteinrückresorption und in der Folge zur vermehrten tubulären Expression inflammatorischer Gene sowie Zelltod und Narbenbildung führt [68]. Hierzu passend zeigten sich auch die renale mRNA-Expression der Fibrosemarker Fibronectin und Prokollagen I im

RIPK1kd-Genotyp, aber interessanterweise auch bei den MLKL-defizienten Tieren an Tag 14 der NTN signifikant vermindert (**Abbildung 17**).

Bezüglich der Serumwerte von Kreatinin und Harnstoff unterschied sich keiner der untersuchten Genotypen signifikant vom Wildtyp (**Abbildung 15**). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die funktionelle Beeinträchtigung der Nieren an Tag 14 des NTN-Modells noch nicht so weit fortgeschritten ist, als dass sich Unterschiede bezüglich Proteinurie und Glomerulosklerose, die die RIPK1kd-Tiere im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, auch in einer verbesserten Nierenfunktion zeigen. Hierfür spricht, dass die chronische Nierenerkrankung durch einen fortschreitenden Nephronverlust gekennzeichnet ist [78, 79]. Zunächst können so die verbleibenden Nephronen durch Hyperfiltration den Ausfall eines Teils der Nephronen kompensieren, bei weiterem Progress ist dies nicht mehr möglich. Es ist denkbar, dass diese Kompensationsmechanismen auch im Rahmen des autologen NTN-Modells dazu führten, dass sich trotz verstärktem nephrotischen Syndrom sowie vermehrter Glomerulosklerose im Vergleich zum RIPK1kd-Genotyp noch kein Unterschied hinsichtlich der exkretorischen Nierenfunktion in den untersuchten Genotypen zeigte. Möglicherweise ändert sich dies bei Untersuchung zu späteren Zeitpunkten, insbesondere da das Ausmaß der Proteinurie einen unabhängigen Risikofaktor für die Progression einer chronischen Niereninsuffizienz darstellt [68, 80].

4.4 Einfluss von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf die Entzündungsreaktion in der NTN

Um zu analysieren, ob der reduzierte Zelltod sowie morphologische Schäden im RIPK1kd-Genotyp auch mit einer geringeren renalen Entzündungsreaktion einhergeht, wurde die renale Leukozyteninfiltration sowie die Expression proinflammatorischer Chemokine und Zytokine ausgewertet. Im RIPK3kd- sowie MLKL-/- Genotyp war hingegen bei ähnlichen funktionellen Parametern und vergleichbarem Ausmaß der Nierenschädigung mit einer dem Wildtyp vergleichbaren Entzündungsreaktion zu rechnen, da im Verlauf der NTN die Nierenschädigung mit dem Ausmaß der renalen Entzündungsreaktion korreliert [19].

Während bei der renalen Leukozyteninfiltration in der initialen heterologen Phase der NTN neutrophile Granulozyten überwiegen, dominieren in der autologen Phase monozytäre Phagozyten, dendritische Zellen sowie aktivierte T-Zellen, die aus dem lymphatischen Gewebe in die Niere migrieren [19, 47, 81, 82]. Die kompartimentspezifische immunhistochemische Analyse der infiltrierenden $CD3^+$ T-Zellen zeigte jedoch weder glomerulär noch tubulointerstitiell einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen (**Abbildung 18**). Auch die Untersuchung der tubulointerstitiellen $F4/80^+$ Makrophagen sowie $ER-HR3^+$ Makrophagen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen (**Abbildung 18**). Die glomerulären $Mac-2^+$ Makrophagen waren hingegen sowohl bei den $RIPK1kd$ - als auch bei den $MLKL$ -defizienten Mäusen signifikant vermindert, während sich bei den $RIPK3kd$ -Mäusen auch hier kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp zeigte (**Abbildung 18**). In $RIPK1kd$ -Mäusen korreliert somit in dem bei der NTN primär geschädigten renalen Kompartiment reduzierter glomerulärer Zelltod und Schaden mit einer verminderten glomerulären Makrophageninfiltration. Interessanterweise ist auch in $MLKL$ -defizienten Mäusen bei nichtsignifikantem Trend zu geringerem Zelltod und Glomerulosklerose die glomeruläre Makrophageninfiltration signifikant vermindert. In $RIPK3kd$ -Mäusen zeigte sich dagegen korrelierend mit den übrigen Auswertungen kein signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Tieren.

Bei Vergleich der Daten mit der Literatur zeigt sich, dass Makrophagen im allgemeinen und speziell die aus dem Knochenmark stammenden, $F4/80^- Mac-2^+$ Makrophagen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung des glomerulären Schadens in der Immunkomplex-Glomerulonephritis spielen [83, 84]. Sung et al. zeigten etwa, dass eine Blockade der $PD-L1^+ Mac-2^+$ Makrophagen mittels Antikörper mit signifikant geringerer Proteinurie einhergeht [84]. Dies steht im Einklang mit dem verminderten morphologischen Schaden und der verminderten Albuminurie bei den $RIPK1kd$ -Mäusen. Da auch bei den $MLKL$ -defizienten Mäusen eine verminderte glomeruläre Infiltration von $Mac-2^+$ Makrophagen zu sehen ist, obwohl bei diesen Mäusen nur eine tendenzielle Verminderung von Zelltod und Glomerulosklerose ohne Verringerung der Albuminurie nachweisbar war, liegt die Vermutung nahe, dass neben einer Blockade der $MLKL$ -abhängigen Nekroptose zusätzliche durch das Fehlen der $RIPK1$ -

Kinaseaktivität blockierte Mechanismen für den verbesserten RIPK1kd-Phänotyp verantwortlich sind.

Entscheidend für die Migration von Immunzellen zum Ort der Entzündung ist die lokale Expression proinflammatorischer Chemokine und Zytokine. Um zu analysieren, ob die verminderte Makrophageninfiltration bei den RIPK1kd-Mäusen mit einer verminderten Expression proinflammatorischer Mediatoren korreliert, wurde die renale mRNA-Expression von bestimmten Chemokinen und Zytokinen an Tag 14 der NTN mittels qPCR bestimmt.

Tatsächlich zeigte sich bei den RIPK1kd-, aber auch bei den MLKL-defizienten Tieren die renale Expression einiger proinflammatorischer Chemokine und Zytokine vermindert. In RIPK1kd-transgenen Tieren waren IL-1 β und CCL5, in MLKL-defizienten Mäusen IL-6 und CCL5 signifikant vermindert exprimiert. Auch in den weiteren untersuchten proinflammatorischen Mediatoren wie TNF α , CCL2 und CXCL10 zeigte sich eine tendenzielle, allerdings nichtsignifikante Verminderung der renalen Expression in den beiden Genotypen (**Abbildung 19**). Dies passt gut zu den Ergebnissen der TUNEL-Färbung, die eine signifikante Verminderung des renalen Zelltodes bei den RIPK1kd- und eine tendenzielle Verminderung bei den MLKL-defizienten Tieren nachweisen konnte. So werden durch verminderten Zelltod weniger immunogene Zellbestandteile freigesetzt, die im Rahmen der Nekroinflammation die nachfolgende Entzündungsreaktion mit Expression inflammatorischer Mediatoren und glomerulärer Makrophageninfiltration induzieren. Ebenso sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse in Einklang zu bringen mit weiteren Studien, die über eingeschränkte Chemokin- und Zytokin-Expression von RIPK1kd-Makrophagen berichten [41, 77, 85]. Hierbei scheint der Transkriptionsfaktor STAT1 eine wichtige Rolle zu spielen. Das Fehlen der RIPK1-Kinaseaktivität könnte somit auch unabhängig von vermindertem lokalem Zelltod zu einer verminderten renalen Expression entzündlicher Mediatoren führen. Da proinflammatorische Mediatoren sowohl von ortsständigen Zellen als auch von infiltrierenden Leukozyten gebildet werden, könnte schließlich auch die verminderte glomeruläre Infiltration von Mac-2⁺ Makrophagen zur verminderten mRNA-Expression dieser Mediatoren in RIPK1kd- und MLKL-defizienten Tieren beitragen. Doch auch in den RIPK3kd-Tieren zeigte sich interessanterweise eine tendenziell verminderte renale

mRNA-Expression von Chemokinen und Zytokinen, mit signifikant verminderter Expression von IL-1 β . Tatsächlich konnte für RIPK3 eine Nekroptose-unabhängige proinflammatorische Rolle nachgewiesen werden, die auf Aktivierung von NF- κ B beruht [86, 87] und zumindest teilweise auch von intakter RIPK3-Kinaseaktivität abhängt [88]. Chen et al. berichten von einer Nekroptose-unabhängigen proinflammatorischen Funktion von RIPK3, die durch Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms vermittelt wird [89]. Da in dieser Arbeit bei den RIPK3kd-Tieren kein verminderter immunogener Zelltod im Rahmen der NTN festgestellt werden konnte, könnte dies einen möglichen direkten RIPK3-abhängigen Mechanismus darstellen, der zur verminderten Expression proinflammatorischer Mediatoren führt, allerdings ohne Verringerung von Albuminurie und renaler Schädigung im Verlauf der NTN.

4.5 Einfluss von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf die systemische Immunantwort

Entscheidend für die autologe Phase der NTN ist die systemische adaptive Immunantwort auf die glomerulär abgelagerten, heterologen Antikörper [19]. Diese beruht wesentlich auf einer ausreichenden systemischen T-Zell-vermittelten B-Zell-Aktivierung sowie der Bildung und glomerulären Ablagerung autologer Antikörper. Um auszuschließen, dass der verbesserte Phänotyp in den RIPK1kd-Mäusen durch eine ungenügende Induktion der autologen NTN zustande kam, wurden in der vorliegenden Arbeit Parameter der systemischen Immunantwort ebenfalls untersucht. Obwohl die durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Aktivierung in den lokoregionären Lymphknoten eine verminderte Aktivierung im RIPK1kd-Genotyp gezeigt hatte, ergab die Untersuchung der T-Zell-Aktivierung in der Milz als Marker der systemischen T-Zell-Aktivierung keinen Unterschied zwischen RIPK1kd- sowie MLKL-defizienten und Wildtyp-Tieren (**Abbildung 20**). In den RIPK3kd-Tieren zeigte sich hingegen eine erniedrigte Anzahl an aktivierten CD8⁺ T-Zellen. Bei vergleichbarer glomerulärer und tubulointerstitieller T-Zell-Infiltration in nephritischen Nieren aller Genotypen scheint jedoch die verminderte Aktivierung lokoregionärer T-Zellen in RIPK1kd-Mäusen beziehungsweise systemischer CD8⁺ T-Zellen in RIPK1kd-Mäusen die lokale Immunantwort in den NTN-Nieren nicht zu beeinflussen. Hierfür spricht auch, dass

systemisch in allen Genotypen eine vergleichbare Bildung autologer Antikörper nachgewiesen werden konnte, mit Tendenz zu höheren Antikörper-Titern im Serum der RIPK1kd-Tiere. Die immunhistochemische Analyse der glomerulär abgelagerten autologen Antikörper ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen (**Abbildung 21**). Diese Daten weisen darauf hin, dass insbesondere im RIPK1kd-Genotyp eine den Wildtyp-Tieren vergleichbare Induktion der autologen nephrotoxischen Serumnephritis stattgefunden hat.

Eine Studie an Triple-defizienten Mäusen, denen RIPK1, RIPK3 sowie Caspase-8 fehlte, zeigte, dass RIPK1 nicht für die normale Entwicklung und Homöostase myeloischer und lymphozytärer Immunzellen benötigt wird [90]. Dies legt ebenso wie die oben beschriebenen Ergebnisse nahe, dass in RIPK1kd-Tieren kein intrinsischer Defekt der systemischen Immunantwort vorliegt, die den Verlauf der NTN abschwächen könnte. Vielmehr scheint dem gebesserten Phänotyp bei den RIPK1kd-Tieren verminderter Zelltod ebenso wie eine verminderte lokale Entzündungsreaktion mit verringerter Expression proinflammatorischer Mediatoren sowie Makrophageninfiltration zugrunde zu liegen.

4.6 Mechanismen der durch RIPK1-Kinaseaktivität vermittelten renalen Schädigung bei der NTN

In der vergleichenden Analyse der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Untersuchungen an weiteren Krankheitsmodellen ergibt sich kein einheitliches Bild bezüglich einer pathophysiologischen Rolle der Nekroptose bei entzündlichen Erkrankungen. Dies liegt unter anderem darin begründet, dass verschiedene *in vivo*-Methoden mit unterschiedlicher Spezifität existieren, um die Bedeutung der Nekroptose für die Pathophysiologie der jeweiligen Erkrankung zu analysieren. So werden etwa RIPK1kd- und RIPK3kd-transgene Mäuse, RIPK3-defiziente und MLKL-defiziente Mäuse ebenso wie die Behandlung der Versuchstiere mit RIPK1-Inhibitoren wie Nec-1, Nec-1s, Sorafenib, Wogonin oder Phenytoin verwendet. Da die Pseudokinase MLKL das eigentliche Effektormolekül der Nekroptose darstellt und bis dato keine weiteren Funktionen von MLKL beschrieben

wurden, sind MLKL-defiziente Mäuse das derzeit spezifischste experimentelle Instrument, um den Beitrag der Nekroptose zur jeweiligen Pathophysiologie zu analysieren. Dagegen wurden für RIPK1 sowie für RIPK3 mehrere nicht-nekroptotische Funktionen beschrieben. So kann die RIPK1-Kinaseaktivität nicht nur Nekroptose, sondern unter bestimmten Bedingungen auch Apoptose vermitteln [27, 59]. Auch RIPK3 kann, wenn überexprimiert, Caspase-8-abhängige Apoptose vermitteln [32, 59]. Zudem wurde sowohl für RIPK1 als auch für RIPK3 eine Beteiligung an der Expression von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen beschrieben [25, 32, 36, 59]. Werden nicht MLKL-defiziente Mäuse, sondern oben aufgeführte weitere Methoden verwendet, um die pathophysiologische Relevanz der Nekroptose zu evaluieren, kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass beobachtete Effekte auch durch Blockade nicht-nekroptotischer Funktionen der jeweiligen Moleküle mitverursacht werden.

Hill et al. zeigten 2018, dass RIPK3-defiziente Mäuse im Modell der autologen NTN nicht geschützt waren [69]. Dieser Phänotyp wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt, die bei Fehlen der Kinaseaktivität von RIPK3 ebenfalls keinen protektiven Effekt in RIPK3kd-Mäusen auf den Verlauf der NTN nachweisen. Dagegen tritt im RIPK1kd-Genotyp ein signifikant verbesserter Phänotyp mit verminderter Albuminurie und verminderter Glomerulosklerose auf, was mit vermindertem glomerulärem und tubulointerstitiellem Zelltod und abgeschwächter renaler Entzündung korrelierte. Dies spricht dafür, dass zumindest im Rahmen der autologen NTN nicht-nekroptotischen Funktionen von RIPK1 eine größere pathophysiologische Bedeutung zukommt. Ähnlich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und von Hill et al. [69] bezüglich der Rolle der RIP-Kinasen 1 und 3 in der NTN, wirkte sich auch beim *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)-Schlaganfall-Modell eine Inhibition der RIPK1-Kinase mittels Necrostatin-1, nicht aber ein RIPK3-*Knockout* protektiv auf den Phänotyp der Mäuse aus [48, 91]. Ein vergleichbarer Effekt wurde auch bei SHARPIN-defizienten Mäusen beobachtet, die mit RIPK1kd-Mäusen gekreuzt wurden [41]. Diese Mäuse waren vollständig geschützt gegen die mit einer SHARPIN-Defizienz assoziierten Entzündung von Haut, Lunge und Leber. Analog zum MCAO-Modell konnte ein vergleichbarer Effekt bei einem Einkreuzen der SHARPIN-defizienten Mäuse mit RIPK3-defizienten Mäusen nicht nachgewiesen werden [92]. Auch bei Administration von TNF und zVAD, was ein Schock-

ähnliches Syndrom auslöst, waren RIPK1kd-Mäuse deutlich mehr geschützt als RIPK3-defiziente Mäuse [41, 93]. So scheinen neben der NTN auch bei mehreren anderen Krankheitsmodellen RIPK1-abhängige Mechanismen von pathophysiologischer Bedeutung zu sein, die unabhängig von RIPK3-vermittelter Nekroptose oder Inflammation sind.

In verschiedenen Tiermodellen der akuten Nierenschädigung (AKI) konnte dagegen eine pathophysiologische Relevanz der Nekroptose nachgewiesen werden. So sind sowohl RIPK3-, als auch MLKL-defiziente Mäuse weniger stark von einer durch Cisplatin induzierten AKI betroffen [58]. Ebenso konnte durch Untersuchungen von RIPK3- und MLKL-defizienten *Knockout*-Mäusen eine Beteiligung der Nekroptose bei der akuten Oxalat-Nephropathie [55] gezeigt werden. Auch im Ischämie-Reperfusion-Modell der Niere zeigte sich eine Abschwächung des Nierenschadens in RIPK1kd-, RIPK3-defizienten und MLKL-defizienten Mäusen, wobei in den MLKL-*Knockout*-Mäusen deutlich geringere protektive Effekte als bei den RIPK1kd- sowie den RIPK3-*Knockout* Mäusen beobachtbar waren [91]. Auch letztere Daten weisen darauf hin, dass neben der letztendlich MLKL-vermittelten Nekroptose weitere RIPK1- und RIPK3-vermittelte Effekte in diesem Modell zur Nierenschädigung beitragen. Im Modell der Folsäure-induzierten akuten Nierenerkrankung konnte ebenfalls in der späten Phase des Modells (Stunde 96) ein protektiver Effekt nach Blockierung der Nekroptose durch die Behandlung der Versuchstiere mit Nec-1 sowie Nec-1s erzielt werden [73]. In den RIPK3-*Knockout*- sowie MLKL-*Knockout*-Mäusen zeigte sich ein vergleichbarer Effekt [74]. Dagegen führte Blockade mit Nec-1 oder Defizienz von RIPK3 oder MLKL in entsprechenden *Knockout*-Mäusen in der frühen Phase des Modells nach 48 Stunden zu keinem verbesserten Phänotyp. Der zu diesem Zeitpunkt auftretende Zelltod scheint vielmehr durch Ferroptose vermittelt zu sein [74]. Die im späteren Verlauf der akuten Folsäure-Nephropathie auftretende Nekroptose scheint dagegen im Sinne einer Nekroinflammation durch vermehrt exprimiertes proinflammatorisches TWEAK (*Tumor Necrosis Factor-like weak Inducer of Apoptosis*) induziert zu werden [73]. Schließlich konnten Sureshbabu et al. im Rahmen eines Sepsis-Modells sogar einen bis dahin unbekanntem Mechanismus nachweisen, mit dem RIPK3 unabhängig von MLKL über mitochondriale Dysfunktion zur akuten Nierenerkrankung beiträgt [94].

Die Rolle der Nekroptose in der chronischen Nierenerkrankung wurde anhand subtotal nephrektomierter Ratten untersucht [65]. In diesem Modell konnte durch Behandlung der Ratten mit Nec-1 eine signifikante Verbesserung von Nierenfunktion und Histomorphologie erreicht werden. Inwieweit diese Effekte jedoch spezifisch durch eine Hemmung der Nekroptose hervorgerufen werden und beispielsweise auch bei MLKL-defizienten Mäusen erkennbar wären und damit eindeutiger einer verminderten Nekroptose zuzuordnen sind, wurde noch nicht untersucht.

Analog zur Niere konnte auch im Ischämie-Reperusionsmodell des Herzens ein protektiver Effekt sowohl für die Behandlung mit Nec-1, als auch in RIPK3-*Knockout*-Mäusen nachgewiesen werden [95, 96]. Des Weiteren wurde die Rolle der Nekroptose in mehreren entzündlichen Erkrankungen untersucht. Im Modell der Cerulein-induzierten Pankreatitis zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich eines protektierten Phänotyps in RIPK3-*Knockout*-Mäusen, während RIPK1*kd*-Mäuse in diesem Modell nicht geschützt waren [61, 91]. Im Modell der Dextransulfat- (*Dextran Sodium Sulfate*, DSS)-induzierten Colitis wirkte sich eine Behandlung mit Necrostatin-1 protektiv auf die Mäuse aus [54], während bei RIPK3-*Knockout*-Mäusen über einen dem Wildtyp vergleichbaren beziehungsweise in einer weiteren Studie sogar verschlechterten Phänotyp berichtet wurde [86, 91]. Für die TNF α -induzierte Sepsis zeigten sich analog zum Ischämie-Reperusionsmodell der Niere die protektiven Effekte bei den MLKL-*Knockout*-Mäusen ebenfalls deutlich geringer ausgeprägt als bei RIPK1*kd*- sowie RIPK3-*Knockout*-Mäusen [91].

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass im Gegensatz zur Rolle von MLKL, die auf Vermittlung von Nekroptose beschränkt zu sein scheint, die Kinasen RIPK1 und RIPK3 *in vivo* je nach pathophysiologischem Kontext und jeweils betroffenem Organsystem auch eine Reihe nicht-nekroptotischer Funktionen besitzen können. Untersuchungen an SHARPIN-defizienten Mäusen sowie mehrere weitere Maus-Modelle wie die DSS-induzierte Colitis und das MCAO-Schlaganfall-Modell wiesen einen größeren Effekt einer RIPK1-Inhibition im Vergleich zu RIPK3-Defizienz oder zu einem spezifisch die Nekroptose blockierenden MLKL-*Knockout* nach [41, 48, 91, 92]. In einigen weiteren Modellen wurden die an RIPK1*kd*- und RIPK3-*Knockout*-Mäusen, sowie nach Applikation von Necrosta-

tin-1 oder Necrostatin-1s nachgewiesenen protektiven Effekte noch nicht an MLKL-*Knockout*-Mäusen analysiert. Daher ist es problematisch, diese Effekte spezifisch einer verminderten Nekroptose zuzuordnen.

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse, Limitationen und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die Kinasefunktion von RIPK1 unabhängig von der Vermittlung einer RIPK3-abhängigen Nekroptose Zelltod und proinflammatorische Effekte induziert, die entscheidend an der Pathophysiologie der Immunkomplex-Glomerulonephritis beteiligt sind (**Abbildung 22**). Dies gilt nicht für die Kinasefunktion von RIPK3, die offenbar weder für die Induktion von Zelltod noch für inflammatorische Effekte im Verlauf der NTN erforderlich ist. Offensichtlich können durch RIPK3-Kinaseaktivität vermittelte Funktionen wie Nekroptose und inflammatorische Effekte im Verlauf der NTN durch alternative Mechanismen des regulierten Zelltodes kompensiert werden [60, 63, 69, 71]. Im Gegensatz zu RIPK3^{kd}-transgenen Mäusen legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die NTN bei MLKL-Defizienz etwas abgeschwächer verläuft. Hierauf weisen tendenziell, jedoch nicht signifikant reduzierter renaler Zelltod und Glomerulosklerose und die signifikant verminderte glomeruläre Makrophageninfiltration bei allerdings unbeeinflusster Albuminurie hin. Somit ist eine zusätzliche Rolle einer offenbar RIPK3-unabhängigen, MLKL-vermittelten Nekroptose im NTN-Modell nicht auszuschließen.

Entsprechend stellt eine Limitation der Arbeit die begrenzte Zahl der untersuchten Tiere in jedem Genotyp dar. Bei Einschluss einer größeren Tierzahl hätten sich möglicherweise mehr Anhaltspunkte für eine signifikante Verbesserung der NTN auch in MLKL-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ergeben.

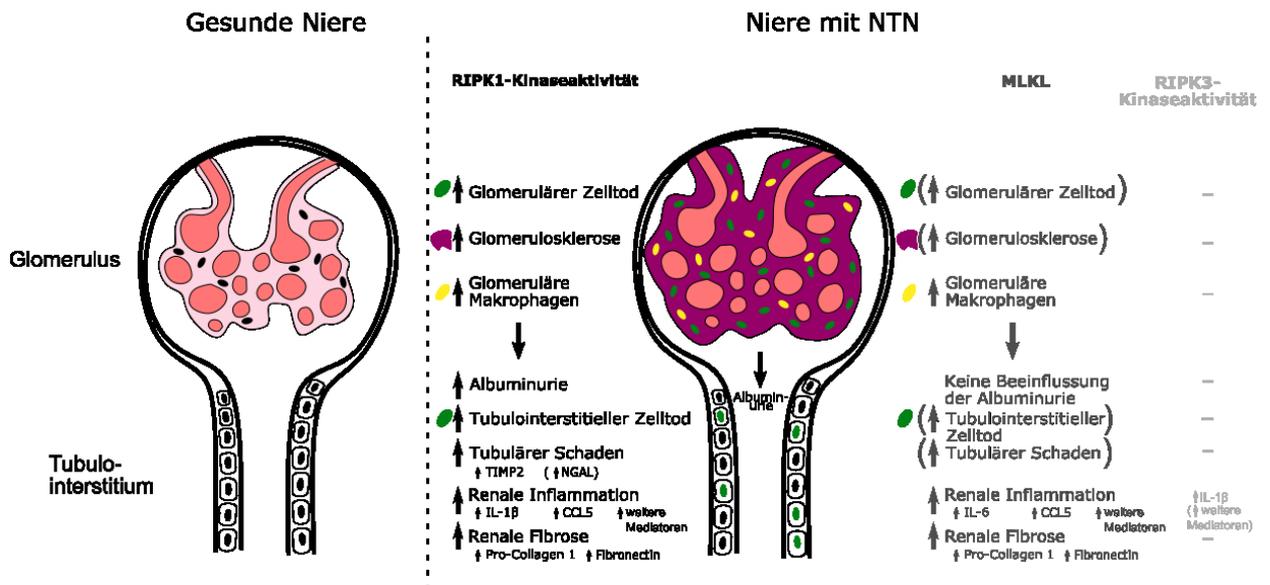


Abbildung 22: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Identifizierte pathophysiologische Effekte der RIPK1- und RIPK3-Kinasefunktion und von MLKL bei der NTN. Effekte in Klammern repräsentieren Ergebnisse mit nichtsignifikantem, jedoch deutlichem Trend.

Dennoch verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit die Komplexität bei der Regulation von Zelltod und Inflammation durch die RIP-Kinasen. Ähnlich wie die Studien an SHARPIN-defizienten Mäusen und Ergebnisse im MCAO-Schlaganfall-Modell sowie bei der TNF-induzierten Sepsis zeigt diese Arbeit, dass die Kinaseaktivität von RIPK1 im Kontext verschiedener Erkrankungen nicht nur über die Vermittlung von RIPK3-abhängiger Nekroptose, sondern auch über davon unabhängige Mechanismen zur Pathophysiologie entscheidend beiträgt. Hierbei sind als Mechanismen eine von der RIPK1-Kinaseaktivität abhängige Apoptose [97] ebenso wie die induzierte Expression proinflammatorischer Mediatoren zu diskutieren. Shutinoski et al. zeigten, dass in RIPK1kd-Makrophagen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 ebenso wie die Induktion der *c-Jun N-Terminal Kinase* (JNK) und damit die Expression bestimmter Chemokine sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beeinträchtigt ist [77]. Zudem konnte in derselben Arbeit nachgewiesen werden, dass unter bestimmten Umständen die Stabilität von RIPK1 von deren Kinaseaktivität abhängig ist.

Viele Studien, die die Rolle der Nekroptose in verschiedenen Krankheitsmodellen untersuchten, wurden bislang nur an RIPK1kd-transgenen sowie RIPK3-

defizienten Mäusen durchgeführt. Die Analyse von MLKL-defizienten Mäusen kann hier weitere Erkenntnisse zum jeweiligen Beitrag von Nekroptose und nicht-nekroptotischer Funktionen der RIP-Kinasen erbringen. In Bezug auf Immunkomplex-Glomerulonephritiden könnten weitere Analysen mit Antikörpern gegen phosphoryliertes MLKL sowie *Cleaved Caspase-3* als Nachweis für Nekroptose beziehungsweise Apoptose mehr Klarheit über die genaue Beteiligung der jeweiligen Mechanismen bringen. Zudem sollten weitere Mechanismen des regulierten Zelltodes, wie beispielsweise Ferroptose oder Pyroptose, am Modell der NTN untersucht werden. In Studien konnte bereits die synchrone oder sequentielle Beteiligung mehrerer unterschiedlicher Signalwege, die regulierte Nekrose vermitteln, in verschiedenen Krankheitsmodellen nachgewiesen werden [57, 73, 74, 98]. Es ist plausibel, dass auch bei der Vermittlung der NTN mehrere dieser Signalwege des regulierten Zelltodes eine Rolle spielen könnten.

Unabhängig von den molekularen Mechanismen, über die sich eine Inhibition der RIPK1-Kinaseaktivität in der nephrotoxischen Serumnephritis protektiv auswirkt, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die RIPK1- nicht jedoch die RIPK3-Kinaseaktivität ein potentielles therapeutisches Ziel zur Behandlung der Immunkomplex-Glomerulonephritis darstellt. Mit den Molekülen Necrostatin-1 beziehungsweise Necrostatin-1s stehen zudem bereits Hemmstoffe der RIPK1-Kinaseaktivität zur Verfügung. Dies könnte sich als eine vielsprechende therapeutische Strategie bei der Behandlung chronischer Glomerulonephritiden erweisen, die effektiver und mit weniger Nebenwirkungen verbunden ist als die derzeit angewandten supportiven und immunsuppressiven Therapeutika. Weitere Untersuchungen zur Spezifität der Necrostatine und dazu, ob durch Applikation dieser Stoffe ebenfalls ein positiver Effekt im NTN-Modell erzielt werden kann, sind daher notwendig.

Literaturverzeichnis

1. Hill, N.R., S.T. Fatoba, J.L. Oke, J.A. Hirst, C.A. O'Callaghan, D.S. Lasserson, and F.D. Hobbs, *Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - a Systematic Review and Meta-Analysis*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0158765.
2. *K/Doqi Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification*. Am J Kidney Dis, 2002. **39**(2 Suppl 1): p. S1-266.
3. International Society of Nephrology. *Kdigo 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. 2013; Available from: https://kdigo.org/wp-content/uploads/2017/02/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf.
4. Lozano, R., M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, V. Aboyans, J. Abraham, T. Adair, R. Aggarwal, S.Y. Ahn, M. Alvarado, H.R. Anderson, L.M. Anderson, K.G. Andrews, C. Atkinson, L.M. Baddour, S. Barker-Collo, D.H. Bartels, M.L. Bell, E.J. Benjamin, D. Bennett, K. Bhalla, B. Bikbov, A. Bin Abdulhak, G. Birbeck, F. Blyth, I. Bolliger, S. Boufous, C. Bucello, M. Burch, P. Burney, J. Carapetis, H. Chen, D. Chou, S.S. Chugh, L.E. Coffeng, S.D. Colan, S. Colquhoun, K.E. Colson, J. Condon, M.D. Connor, L.T. Cooper, M. Corriere, M. Cortinovis, K.C. de Vaccaro, W. Couser, B.C. Cowie, M.H. Criqui, M. Cross, K.C. Dabhadkar, N. Dahodwala, D. De Leo, L. Degenhardt, A. Delossantos, J. Denenberg, D.C. Des Jarlais, S.D. Dharmaratne, E.R. Dorsey, T. Driscoll, H. Duber, B. Ebel, P.J. Erwin, P. Espindola, M. Ezzati, V. Feigin, A.D. Flaxman, M.H. Forouzanfar, F.G. Fowkes, R. Franklin, M. Fransen, M.K. Freeman, S.E. Gabriel, E. Gakidou, F. Gaspari, R.F. Gillum, D. Gonzalez-Medina, Y.A. Halasa, D. Haring, J.E. Harrison, R. Havmoeller, R.J. Hay, B. Hoen, P.J. Hotez, D. Hoy, K.H. Jacobsen, S.L. James, R. Jasrasaria, S. Jayaraman, N. Johns, G. Karthikeyan, N. Kassebaum, A. Keren, J.P. Khoo, L.M. Knowlton, O. Kobusingye, A. Koranteng, R. Krishnamurthi, M. Lipnick, S.E. Lipshultz, S.L. Ohno, J. Mabweijano, M.F. MacIntyre, L. Mallinger, L. March, G.B. Marks, R. Marks, A. Matsumori, R. Matzopoulos, B.M. Mayosi, J.H. McAnulty, M.M. McDermott, J. McGrath, G.A. Mensah, T.R. Merriman, C. Michaud, M. Miller, T.R. Miller, C. Mock, A.O. Mocumbi, A.A. Mokdad, A. Moran, K. Mulholland, M.N. Nair, L. Naldi, K.M. Narayan, K. Nasser, P. Norman, M. O'Donnell, S.B. Omer, K. Ortblad, R. Osborne, D. Ozgediz, B. Pahari, J.D. Pandian, A.P. Rivero, R.P. Padilla, F. Perez-Ruiz, N. Perico, D. Phillips, K. Pierce, C.A. Pope, 3rd, E. Porrini, F. Pourmalek, M. Raju, D. Ranganathan, J.T. Rehm, D.B. Rein, G. Remuzzi, F.P. Rivara, T. Roberts, F.R. De Leon, L.C. Rosenfeld, L. Rushton, R.L. Sacco, J.A. Salomon, U. Sampson, E. Sanman, D.C. Schwebel, M. Segui-Gomez, D.S. Shepard, D. Singh, J. Singleton, K. Sliwa, E. Smith, A. Steer, J.A. Taylor, B. Thomas, I.M. Tleyjeh, J.A. Towbin, T. Truelsen, E.A. Undurraga, N. Venketasubramanian, L. Vijayakumar, T. Vos, G.R. Wagner, M. Wang, W. Wang, K. Watt, M.A. Weinstock, R. Weintraub, J.D. Wilkinson, A.D. Woolf, S. Wulf, P.H. Yeh, P. Yip, A. Zabetian, Z.J. Zheng, A.D. Lopez,

- C.J. Murray, M.A. AlMazroa and Z.A. Memish, *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*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2095-128.
5. Go, A.S., G.M. Chertow, D. Fan, C.E. McCulloch, and C.Y. Hsu, *Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization*. N Engl J Med, 2004. **351**(13): p. 1296-305.
 6. Herzog, C.A., R.W. Asinger, A.K. Berger, D.M. Charytan, J. Diez, R.G. Hart, K.U. Eckardt, B.L. Kasiske, P.A. McCullough, R.S. Passman, S.S. DeLoach, P.H. Pun, and E. Ritz, *Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease. A Clinical Update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (Kdigo)*. Kidney Int, 2011. **80**(6): p. 572-86.
 7. Frei, U. and H.-J. Schober-Halstenberg, *Nierenersatztherapie in Deutschland, Jahresbericht 2005/2006*. 2006, QuaSi Niere GmbH: Berlin.
 8. *Jahresbericht 2018 Zur Qualität in Der Dialyse*. 2019, Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen: Berlin.
 9. *Jahresbericht Organspende Und Tranplantation in Deutschland*. 2019, Deutsche Stiftung Organtransplantation: Frankfurt/Main.
 10. Rüter, C. and G. Wolf, *Prävention Der Diabetischen Nephropathie: Was Ist Praktisch Machbar?* Deutsches Ärzteblatt, 2015. **112**(17).
 11. Jha, V., G. Garcia-Garcia, K. Iseki, Z. Li, S. Naicker, B. Plattner, R. Saran, A.Y. Wang, and C.W. Yang, *Chronic Kidney Disease: Global Dimension and Perspectives*. Lancet, 2013. **382**(9888): p. 260-72.
 12. Klinker, R., H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, *Physiologie*. 2010, Stuttgart: Thieme Verlag.
 13. Kuhlmann, U., D. Walb, and F. Luft, *Nephrologie, Pathophysiologie - Klinik - Nierenersatzverfahren*. 2008, Stuttgart: Thieme Verlag.
 14. Kirchner, T., H.K. Müller-Hermelink, and A. Roessner, *Kurzlehrbuch Pathologie*. 2014, München: Elsevier, Urban & Fischer.
 15. Javid, B. and R.J. Quigg, *Treatment of Glomerulonephritis: Will We Ever Have Options Other Than Steroids and Cytotoxics?* Kidney Int, 2005. **67**(5): p. 1692-703.
 16. Ougaard, M.K.E., P.H. Kvist, H.E. Jensen, C. Hess, I. Rune, and H. Sondergaard, *Murine Nephrotoxic Nephritis as a Model of Chronic Kidney Disease*. Int J Nephrol, 2018. **2018**: p. 8424502.
 17. Dixon, F.J. and C.B. Wilson, *The Development of Immunopathologic Investigation of Kidney Disease*. Am J Kidney Dis, 1990. **16**(6): p. 574-8.
 18. Smadel, J.E., *Experimental Nephritis in Rats Induced by Injection of Anti-Kidney Serum : Iii. Pathological Studies of the Acute and Chronic Disease*. J Exp Med, 1937. **65**(4): p. 541-55.
 19. Hoppe, J.M. and V. Vielhauer, *Induction and Analysis of Nephrotoxic Serum Nephritis in Mice*. Methods Mol Biol, 2014. **1169**: p. 159-74.

20. Kay, C.F., *The Mechanism by Which Experimental Nephritis Is Produced in Rabbits Injected with Nephrotoxic Duck Serum*. J Exp Med, 1940. **72**(5): p. 559-72.
21. Linkermann, A., B.R. Stockwell, S. Krautwald, and H.J. Anders, *Regulated Cell Death and Inflammation: An Auto-Amplification Loop Causes Organ Failure*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(11): p. 759-67.
22. Kono, H. and K.L. Rock, *How Dying Cells Alert the Immune System to Danger*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 279-89.
23. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
24. Galluzzi, L., I. Vitale, J.M. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, T.M. Dawson, V.L. Dawson, W.S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D.R. Green, M.O. Hengartner, O. Kepp, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M.E. Peter, M. Piacentini, D.C. Rubinsztein, Y. Shi, H.U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, and G. Kroemer, *Molecular Definitions of Cell Death Subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death Differ, 2012. **19**(1): p. 107-20.
25. Grootjans, S., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Initiation and Execution Mechanisms of Necroptosis: An Overview*. Cell Death Differ, 2017. **24**(7): p. 1184-1195.
26. Linkermann, A. and D.R. Green, *Necroptosis*. N Engl J Med, 2014. **370**(5): p. 455-65.
27. Christofferson, D.E., Y. Li, and J. Yuan, *Control of Life-or-Death Decisions by Rip1 Kinase*. Annu Rev Physiol, 2014. **76**: p. 129-50.
28. Mandal, P., S.B. Berger, S. Pillay, K. Moriwaki, C. Huang, H. Guo, J.D. Lich, J. Finger, V. Kasparcova, B. Votta, M. Ouellette, B.W. King, D. Wisnoski, A.S. Lakdawala, M.P. DeMartino, L.N. Casillas, P.A. Haile, C.A. Sehon, R.W. Marquis, J. Upton, L.P. Daley-Bauer, L. Roback, N. Ramia, C.M. Dovey, J.E. Carette, F.K. Chan, J. Bertin, P.J. Gough, E.S. Mocarski, and W.J. Kaiser, *Rip3 Induces Apoptosis Independent of Pronecrotic Kinase Activity*. Mol Cell, 2014. **56**(4): p. 481-95.
29. Lawlor, K.E., N. Khan, A. Mildenhall, M. Gerlic, B.A. Croker, A.A. D'Cruz, C. Hall, S. Kaur Spall, H. Anderton, S.L. Masters, M. Rashidi, I.P. Wicks, W.S. Alexander, Y. Mitsuuchi, C.A. Benetatos, S.M. Condon, W.W. Wong, J. Silke, D.L. Vaux, and J.E. Vince, *Ripk3 Promotes Cell Death and Nlrp3 Inflammasome Activation in the Absence of Mlkl*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6282.
30. Galluzzi, L., O. Kepp, F.K. Chan, and G. Kroemer, *Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease*. Annu Rev Pathol, 2017. **12**: p. 103-130.
31. Chan, F.K., N.F. Luz, and K. Moriwaki, *Programmed Necrosis in the Cross Talk of Cell Death and Inflammation*. Annu Rev Immunol, 2015. **33**: p. 79-106.

32. Shlomovitz, I., S. Zargrian, and M. Gerlic, *Mechanisms of Ripk3-Induced Inflammation*. *Immunol Cell Biol*, 2017. **95**(2): p. 166-172.
33. Zhao, H., T. Jaffer, S. Eguchi, Z. Wang, A. Linkermann, and D. Ma, *Role of Necroptosis in the Pathogenesis of Solid Organ Injury*. *Cell Death Dis*, 2015. **6**(11): p. e1975.
34. Jouan-Lanhouet, S., F. Riquet, L. Duprez, T. Vanden Berghe, N. Takahashi, and P. Vandenabeele, *Necroptosis, in Vivo Detection in Experimental Disease Models*. *Semin Cell Dev Biol*, 2014. **35**: p. 2-13.
35. Wu, J., Z. Huang, J. Ren, Z. Zhang, P. He, Y. Li, J. Ma, W. Chen, Y. Zhang, X. Zhou, Z. Yang, S.Q. Wu, L. Chen, and J. Han, *Mkl1 Knockout Mice Demonstrate the Indispensable Role of Mkl1 in Necroptosis*. *Cell Res*, 2013. **23**(8): p. 994-1006.
36. Newton, K., *Ripk1 and Ripk3: Critical Regulators of Inflammation and Cell Death*. *Trends Cell Biol*, 2015. **25**(6): p. 347-53.
37. Anders, H.J., *Necroptosis in Acute Kidney Injury*. *Nephron*, 2018. **139**(4): p. 342-348.
38. Wong, W.W., J.E. Vince, N. Lalaoui, K.E. Lawlor, D. Chau, A. Bankovacki, H. Anderton, D. Metcalf, L. O'Reilly, P.J. Jost, J.M. Murphy, W.S. Alexander, A. Strasser, D.L. Vaux, and J. Silke, *Ciaps and Xiap Regulate Myelopoiesis through Cytokine Production in an Ripk1- and Ripk3-Dependent Manner*. *Blood*, 2014. **123**(16): p. 2562-72.
39. Yabal, M., N. Müller, H. Adler, N. Knies, C.J. Groß, R.B. Damgaard, H. Kanegane, M. Ringelhan, T. Kaufmann, M. Heikenwälder, A. Strasser, O. Groß, J. Ruland, C. Peschel, M. Gyrd-Hansen, and P.J. Jost, *Xiap Restricts Tnf- and Rip3-Dependent Cell Death and Inflammasome Activation*. *Cell Rep*, 2014. **7**(6): p. 1796-808.
40. Vince, J.E., W.W. Wong, I. Gentle, K.E. Lawlor, R. Allam, L. O'Reilly, K. Mason, O. Gross, S. Ma, G. Guarda, H. Anderton, R. Castillo, G. Häcker, J. Silke, and J. Tschopp, *Inhibitor of Apoptosis Proteins Limit Rip3 Kinase-Dependent Interleukin-1 Activation*. *Immunity*, 2012. **36**(2): p. 215-27.
41. Berger, S.B., V. Kasparcova, S. Hoffman, B. Swift, L. Dare, M. Schaeffer, C. Capriotti, M. Cook, J. Finger, A. Hughes-Earle, P.A. Harris, W.J. Kaiser, E.S. Mocarski, J. Bertin, and P.J. Gough, *Cutting Edge: Rip1 Kinase Activity Is Dispensable for Normal Development but Is a Key Regulator of Inflammation in Sharpin-Deficient Mice*. *J Immunol*, 2014. **192**(12): p. 5476-80.
42. Murphy, J.M., P.E. Czabotar, J.M. Hildebrand, I.S. Lucet, J.G. Zhang, S. Alvarez-Diaz, R. Lewis, N. Lalaoui, D. Metcalf, A.I. Webb, S.N. Young, L.N. Varghese, G.M. Tannahill, E.C. Hatchell, I.J. Majewski, T. Okamoto, R.C. Dobson, D.J. Hilton, J.J. Babon, N.A. Nicola, A. Strasser, J. Silke, and W.S. Alexander, *The Pseudokinase Mkl1 Mediates Necroptosis Via a Molecular Switch Mechanism*. *Immunity*, 2013. **39**(3): p. 443-53.
43. Ziegler, S.F., F. Ramsdell, and M.R. Alderson, *The Activation Antigen Cd69*. *Stem Cells*, 1994. **12**(5): p. 456-65.

44. Liu, Y.L., C.C. Hsu, H.J. Huang, C.J. Chang, S.H. Sun, and A.M. Lin, *Gallic Acid Attenuated Lps-Induced Neuroinflammation: Protein Aggregation and Necroptosis*. *Mol Neurobiol*, 2020. **57**(1): p. 96-104.
45. Guida, N., G. Laudati, A. Serani, L. Mascolo, P. Molinaro, P. Montuori, G. Di Renzo, L.M.T. Canzoniero, and L. Formisano, *The Neurotoxicant Pcb-95 by Increasing the Neuronal Transcriptional Repressor Rest Down-Regulates Caspase-8 and Increases Ripk1, Ripk3 and Mkl1 Expression Determining Necroptotic Neuronal Death*. *Biochem Pharmacol*, 2017. **142**: p. 229-241.
46. Liu, Y., *Cellular and Molecular Mechanisms of Renal Fibrosis*. *Nat Rev Nephrol*, 2011. **7**(12): p. 684-96.
47. Tipping, P.G. and S.R. Holdsworth, *T Cells in Crescentic Glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(5): p. 1253-63.
48. Degtarev, A., Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G.D. Cuny, T.J. Mitchison, M.A. Moskowitz, and J. Yuan, *Chemical Inhibitor of Nonapoptotic Cell Death with Therapeutic Potential for Ischemic Brain Injury*. *Nat Chem Biol*, 2005. **1**(2): p. 112-9.
49. Northington, F.J., R. Chavez-Valdez, E.M. Graham, S. Razdan, E.B. Gauda, and L.J. Martin, *Necrostatin Decreases Oxidative Damage, Inflammation, and Injury after Neonatal Hi*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011. **31**(1): p. 178-89.
50. Zhang, T., Y. Zhang, M. Cui, L. Jin, Y. Wang, F. Lv, Y. Liu, W. Zheng, H. Shang, J. Zhang, M. Zhang, H. Wu, J. Guo, X. Zhang, X. Hu, C.M. Cao, and R.P. Xiao, *Camkii Is a Rip3 Substrate Mediating Ischemia- and Oxidative Stress-Induced Myocardial Necroptosis*. *Nat Med*, 2016. **22**(2): p. 175-82.
51. González-Juarbe, N., R.P. Gilley, C.A. Hinojosa, K.M. Bradley, A. Kamei, G. Gao, P.H. Dube, M.A. Bergman, and C.J. Orihuela, *Pore-Forming Toxins Induce Macrophage Necroptosis During Acute Bacterial Pneumonia*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(12): p. e1005337.
52. Robinson, N., S. McComb, R. Mulligan, R. Dudani, L. Krishnan, and S. Sad, *Type I Interferon Induces Necroptosis in Macrophages During Infection with Salmonella Enterica Serovar Typhimurium*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(10): p. 954-62.
53. Koks, C.A., A.D. Garg, M. Ehrhardt, M. Riva, L. Vandenberk, L. Boon, S. De Vleeschouwer, P. Agostinis, N. Graf, and S.W. Van Gool, *Newcastle Disease Virotherapy Induces Long-Term Survival and Tumor-Specific Immune Memory in Orthotopic Glioma through the Induction of Immunogenic Cell Death*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E313-25.
54. Liu, Z.Y., B. Wu, Y.S. Guo, Y.H. Zhou, Z.G. Fu, B.Q. Xu, J.H. Li, L. Jing, J.L. Jiang, J. Tang, and Z.N. Chen, *Necrostatin-1 Reduces Intestinal Inflammation and Colitis-Associated Tumorigenesis in Mice*. *Am J Cancer Res*, 2015. **5**(10): p. 3174-85.
55. Mulay, S.R., J. Desai, S.V. Kumar, J.N. Eberhard, D. Thomasova, S. Romoli, M. Grigorescu, O.P. Kulkarni, B. Popper, V. Vielhauer, G. Zuchtriegel, C. Reichel, J.H. Brasen, P. Romagnani, R. Bilyy, L.E.

- Munoz, M. Herrmann, H. Liapis, S. Krautwald, A. Linkermann, and H.J. Anders, *Cytotoxicity of Crystals Involves Ripk3-Mlkl-Mediated Necroptosis*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 10274.
56. Linkermann, A., J.H. Brasen, N. Himmerkus, S. Liu, T.B. Huber, U. Kunzendorf, and S. Krautwald, *Rip1 (Receptor-Interacting Protein Kinase 1) Mediates Necroptosis and Contributes to Renal Ischemia/Reperfusion Injury*. *Kidney Int*, 2012. **81**(8): p. 751-61.
57. Linkermann, A., J.H. Brasen, M. Darding, M.K. Jin, A.B. Sanz, J.O. Heller, F. De Zen, R. Weinlich, A. Ortiz, H. Walczak, J.M. Weinberg, D.R. Green, U. Kunzendorf, and S. Krautwald, *Two Independent Pathways of Regulated Necrosis Mediate Ischemia-Reperfusion Injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(29): p. 12024-9.
58. Xu, Y., H. Ma, J. Shao, J. Wu, L. Zhou, Z. Zhang, Y. Wang, Z. Huang, J. Ren, S. Liu, X. Chen, and J. Han, *A Role for Tubular Necroptosis in Cisplatin-Induced Aki*. *J Am Soc Nephrol*, 2015. **26**(11): p. 2647-58.
59. Newton, K. and G. Manning, *Necroptosis and Inflammation*. *Annu Rev Biochem*, 2016. **85**: p. 743-63.
60. Lin, J., H. Li, M. Yang, J. Ren, Z. Huang, F. Han, J. Huang, J. Ma, D. Zhang, Z. Zhang, J. Wu, D. Huang, M. Qiao, G. Jin, Q. Wu, Y. Huang, J. Du, and J. Han, *A Role of Rip3-Mediated Macrophage Necrosis in Atherosclerosis Development*. *Cell Rep*, 2013. **3**(1): p. 200-10.
61. Zhang, D.W., J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B.J. Lu, S.C. Lin, M.Q. Dong, and J. Han, *Rip3, an Energy Metabolism Regulator That Switches Tnf-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis*. *Science*, 2009. **325**(5938): p. 332-6.
62. He, S., L. Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao, and X. Wang, *Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to Tnf-Alpha*. *Cell*, 2009. **137**(6): p. 1100-11.
63. Han, J., C.Q. Zhong, and D.W. Zhang, *Programmed Necrosis: Backup to and Competitor with Apoptosis in the Immune System*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(12): p. 1143-9.
64. Trichonas, G., Y. Murakami, A. Thanos, Y. Morizane, M. Kayama, C.M. Debouck, T. Hisatomi, J.W. Miller, and D.G. Vavvas, *Receptor Interacting Protein Kinases Mediate Retinal Detachment-Induced Photoreceptor Necrosis and Compensate for Inhibition of Apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(50): p. 21695-700.
65. Zhu, Y., H. Cui, H. Gan, Y. Xia, L. Wang, Y. Wang, and Y. Sun, *Necroptosis Mediated by Receptor Interaction Protein Kinase 1 and 3 Aggravates Chronic Kidney Injury of Subtotal Nephrectomised Rats*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **461**(4): p. 575-81.
66. Grasl-Kraupp, B., B. Ruttkay-Nedecky, H. Koudelka, K. Bukowska, W. Bursch, and R. Schulte-Hermann, *In Situ Detection of Fragmented DNA (Tunel Assay) Fails to Discriminate among Apoptosis, Necrosis, and Autolytic Cell Death: A Cautionary Note*. *Hepatology*, 1995. **21**(5): p. 1465-8.

67. Galluzzi, L., S.A. Aaronson, J. Abrams, E.S. Alnemri, D.W. Andrews, E.H. Baehrecke, N.G. Bazan, M.V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, D.E. Bredesen, C. Brenner, M. Castedo, J.A. Cidlowski, A. Ciechanover, G.M. Cohen, V. De Laurenzi, R. De Maria, M. Deshmukh, B.D. Dynlacht, W.S. El-Deiry, R.A. Flavell, S. Fulda, C. Garrido, P. Golstein, M.L. Gougeon, D.R. Green, H. Gronemeyer, G. Hajnoczky, J.M. Hardwick, M.O. Hengartner, H. Ichijo, M. Jaattela, O. Kepp, A. Kimchi, D.J. Klionsky, R.A. Knight, S. Kornbluth, S. Kumar, B. Levine, S.A. Lipton, E. Lugli, F. Madeo, W. Malomi, J.C. Marine, S.J. Martin, J.P. Medema, P. Mehlen, G. Melino, U.M. Moll, E. Morselli, S. Nagata, D.W. Nicholson, P. Nicotera, G. Nunez, M. Oren, J. Penninger, S. Pervaiz, M.E. Peter, M. Piacentini, J.H. Prehn, H. Puthalakath, G.A. Rabinovich, R. Rizzuto, C.M. Rodrigues, D.C. Rubinsztein, T. Rudel, L. Scorrano, H.U. Simon, H. Steller, J. Tschopp, Y. Tsujimoto, P. Vandenabeele, I. Vitale, K.H. Vousden, R.J. Youle, J. Yuan, B. Zhivotovsky, and G. Kroemer, *Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Cell Death in Higher Eukaryotes*. *Cell Death Differ*, 2009. **16**(8): p. 1093-107.
68. Ruggenti, P., P. Cravedi, and G. Remuzzi, *Mechanisms and Treatment of Ckd*. *J Am Soc Nephrol*, 2012. **23**(12): p. 1917-28.
69. Hill, N.R., H.T. Cook, C.D. Pusey, and R.M. Tarzi, *Ripk3-Deficient Mice Were Not Protected from Nephrotoxic Nephritis*. *BMC Nephrol*, 2018. **19**(1): p. 61.
70. Corradetti, C., N.R. Jog, S. Gallucci, M. Madaio, S. Balachandran, and R. Caricchio, *Immune-Mediated Nephropathy and Systemic Autoimmunity in Mice Does Not Require Receptor Interacting Protein Kinase 3 (Ripk3)*. *PLoS One*, 2016. **11**(9): p. e0163611.
71. Oberst, A., C.P. Dillon, R. Weinlich, L.L. McCormick, P. Fitzgerald, C. Pop, R. Hakem, G.S. Salvesen, and D.R. Green, *Catalytic Activity of the Caspase-8-Flip(L) Complex Inhibits Ripk3-Dependent Necrosis*. *Nature*, 2011. **471**(7338): p. 363-7.
72. Gunther, C., G.W. He, A.E. Kremer, J.M. Murphy, E.J. Petrie, K. Amann, P. Vandenabeele, A. Linkermann, C. Poremba, U. Schleicher, C. Dewitz, S. Krautwald, M.F. Neurath, C. Becker, and S. Wirtz, *The Pseudokinase Mkl1 Mediates Programmed Hepatocellular Necrosis Independently of Ripk3 During Hepatitis*. *J Clin Invest*, 2016. **126**(11): p. 4346-4360.
73. Martin-Sanchez, D., M. Fontecha-Barriuso, S. Carrasco, M.D. Sanchez-Niño, A.V. Mässenhausen, A. Linkermann, P. Cannata-Ortiz, M. Ruiz-Ortega, J. Egido, A. Ortiz, and A.B. Sanz, *Tweak and Ripk1 Mediate a Second Wave of Cell Death During Aki*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(16): p. 4182-4187.
74. Martin-Sanchez, D., O. Ruiz-Andres, J. Poveda, S. Carrasco, P. Cannata-Ortiz, M.D. Sanchez-Niño, M. Ruiz Ortega, J. Egido, A. Linkermann, A. Ortiz, and A.B. Sanz, *Ferroptosis, but Not Necroptosis, Is Important in Nephrotoxic Folic Acid-Induced Aki*. *J Am Soc Nephrol*, 2017. **28**(1): p. 218-229.
75. Wang, L., F. Du, and X. Wang, *Tnf-Alpha Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways*. *Cell*, 2008. **133**(4): p. 693-703.

76. Polykratis, A., N. Hermance, M. Zelic, J. Roderick, C. Kim, T.M. Van, T.H. Lee, F.K.M. Chan, M. Pasparakis, and M.A. Kelliher, *Cutting Edge: Ripk1 Kinase Inactive Mice Are Viable and Protected from Tnf-Induced Necroptosis in Vivo*. J Immunol, 2014. **193**(4): p. 1539-1543.
77. Shutinoski, B., N.A. Alturki, D. Rijal, J. Bertin, P.J. Gough, M.G. Schlossmacher, and S. Sad, *K45a Mutation of Ripk1 Results in Poor Necroptosis and Cytokine Signaling in Macrophages, Which Impacts Inflammatory Responses in Vivo*. Cell Death Differ, 2016. **23**(10): p. 1628-37.
78. Bienaime, F., G. Canaud, K. El Karoui, M. Gallazzini, and F. Terzi, *Molecular Pathways of Chronic Kidney Disease Progression*. Nephrol Ther, 2016. **12 Suppl 1**: p. S35-8.
79. Kriz, W. and M. LeHir, *Pathways to Nephron Loss Starting from Glomerular Diseases-Insights from Animal Models*. Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 404-19.
80. Cravedi, P., P. Ruggenenti, and G. Remuzzi, *Proteinuria Should Be Used as a Surrogate in Ckd*. Nat Rev Nephrol, 2012. **8**(5): p. 301-6.
81. Schrijver, G., M.J. Bogman, K.J. Assmann, R.M. de Waal, H.C. Robben, H. van Gasteren, and R.A. Koene, *Anti-Gbm Nephritis in the Mouse: Role of Granulocytes in the Heterologous Phase*. Kidney Int, 1990. **38**(1): p. 86-95.
82. Hochheiser, K., D.R. Engel, L. Hammerich, F. Heymann, P.A. Knolle, U. Panzer, and C. Kurts, *Kidney Dendritic Cells Become Pathogenic During Crescentic Glomerulonephritis with Proteinuria*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(2): p. 306-16.
83. Duffield, J.S., P.G. Tipping, T. Kipari, J.F. Cailhier, S. Clay, R. Lang, J.V. Bonventre, and J. Hughes, *Conditional Ablation of Macrophages Halts Progression of Crescentic Glomerulonephritis*. Am J Pathol, 2005. **167**(5): p. 1207-19.
84. Sung, S.J., Y. Ge, C. Dai, H. Wang, S.M. Fu, R. Sharma, Y.S. Hahn, J. Yu, T.H. Le, M.D. Okusa, W.K. Bolton, and J.R. Lawler, *Dependence of Glomerulonephritis Induction on Novel Intrglomerular Alternatively Activated Bone Marrow-Derived Macrophages and Mac-1 and Pd-L1 in Lupus-Prone Nzm2328 Mice*. J Immunol, 2017. **198**(7): p. 2589-2601.
85. Christofferson, D.E., Y. Li, J. Hitomi, W. Zhou, C. Upperman, H. Zhu, S.A. Gerber, S. Gygi, and J. Yuan, *A Novel Role for Rip1 Kinase in Mediating Tnfalpha Production*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e320.
86. Moriwaki, K., S. Balaji, T. McQuade, N. Malhotra, J. Kang, and F.K. Chan, *The Necroptosis Adaptor Ripk3 Promotes Injury-Induced Cytokine Expression and Tissue Repair*. Immunity, 2014. **41**(4): p. 567-78.
87. Moriwaki, K. and F.K. Chan, *The Inflammatory Signal Adaptor Ripk3: Functions Beyond Necroptosis*. Int Rev Cell Mol Biol, 2017. **328**: p. 253-275.
88. Najjar, M., D. Saleh, M. Zelic, S. Nogusa, S. Shah, A. Tai, J.N. Finger, A. Polykratis, P.J. Gough, J. Bertin, M. Whalen, M. Pasparakis, S. Balachandran, M. Kelliher, A. Poltorak, and A. Degterev, *Ripk1 and*

- Ripk3 Kinases Promote Cell-Death-Independent Inflammation by Toll-Like Receptor 4*. *Immunity*, 2016. **45**(1): p. 46-59.
89. Chen, H., Y. Fang, J. Wu, H. Chen, Z. Zou, X. Zhang, J. Shao, and Y. Xu, *Ripk3-Mlkl-Mediated Necroinflammation Contributes to Aki Progression to Ckd*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(9): p. 878.
90. Kaiser, W.J., L.P. Daley-Bauer, R.J. Thapa, P. Mandal, S.B. Berger, C. Huang, A. Sundararajan, H. Guo, L. Roback, S.H. Speck, J. Bertin, P.J. Gough, S. Balachandran, and E.S. Mocarski, *Rip1 Suppresses Innate Immune Necrotic as Well as Apoptotic Cell Death During Mammalian Parturition*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(21): p. 7753-8.
91. Newton, K., D.L. Dugger, A. Maltzman, J.M. Greve, M. Hedehus, B. Martin-McNulty, R.A. Carano, T.C. Cao, N. van Bruggen, L. Bernstein, W.P. Lee, X. Wu, J. DeVoss, J. Zhang, S. Jeet, I. Peng, B.S. McKenzie, M. Roose-Girma, P. Caplazi, L. Diehl, J.D. Webster, and D. Vucic, *Ripk3 Deficiency or Catalytically Inactive Ripk1 Provides Greater Benefit Than Mlkl Deficiency in Mouse Models of Inflammation and Tissue Injury*. *Cell Death Differ*, 2016. **23**(9): p. 1565-76.
92. Kumari, S., Y. Redouane, J. Lopez-Mosqueda, R. Shiraishi, M. Romanowska, S. Lutzmayer, J. Kuiper, C. Martinez, I. Dikic, M. Pasparakis, and F. Ikeda, *Sharpin Prevents Skin Inflammation by Inhibiting Tnfr1-Induced Keratinocyte Apoptosis*. *Elife*, 2014. **3**.
93. Duprez, L., N. Takahashi, F. Van Hauwermeiren, B. Vandendriessche, V. Goossens, T. Vanden Berghe, W. Declercq, C. Libert, A. Cauwels, and P. Vandenabeele, *Rip Kinase-Dependent Necrosis Drives Lethal Systemic Inflammatory Response Syndrome*. *Immunity*, 2011. **35**(6): p. 908-18.
94. Sureshbabu, A., E. Patino, K.C. Ma, K. Laursen, E.J. Finkelsztein, O. Akchurin, T. Muthukumar, S.W. Ryter, L. Gudas, A.M.K. Choi, and M.E. Choi, *Ripk3 Promotes Sepsis-Induced Acute Kidney Injury Via Mitochondrial Dysfunction*. *JCI Insight*, 2018. **3**(11).
95. Luedde, M., M. Lutz, N. Carter, J. Sosna, C. Jacoby, M. Vucur, J. Gautheron, C. Roderburg, N. Borg, F. Reisinger, H.J. Hippe, A. Linkermann, M.J. Wolf, S. Rose-John, R. Lüllmann-Rauch, D. Adam, U. Flögel, M. Heikenwalder, T. Luedde, and N. Frey, *Rip3, a Kinase Promoting Necroptotic Cell Death, Mediates Adverse Remodelling after Myocardial Infarction*. *Cardiovasc Res*, 2014. **103**(2): p. 206-16.
96. Oerlemans, M.I., J. Liu, F. Arslan, K. den Ouden, B.J. van Middelaar, P.A. Doevendans, and J.P. Sluijter, *Inhibition of Rip1-Dependent Necrosis Prevents Adverse Cardiac Remodeling after Myocardial Ischemia-Reperfusion in Vivo*. *Basic Res Cardiol*, 2012. **107**(4): p. 270.
97. Duprez, L., M.J. Bertrand, T. Vanden Berghe, Y. Dondelinger, N. Festjens, and P. Vandenabeele, *Intermediate Domain of Receptor-Interacting Protein Kinase 1 (Ripk1) Determines Switch between Necroptosis and Ripk1 Kinase-Dependent Apoptosis*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(18): p. 14863-72.
98. Linkermann, A., R. Skouta, N. Himmerkus, S.R. Mulay, C. Dewitz, F. De Zen, A. Prokai, G. Zuchtriegel, F. Krombach, P.S. Welz, R. Weinlich, T.

Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M. Pasparakis, M. Bleich, J.M. Weinberg, C.A. Reichel, J.H. Bräsen, U. Kunzendorf, H.J. Anders, B.R. Stockwell, D.R. Green, and S. Krautwald, *Synchronized Renal Tubular Cell Death Involves Ferroptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(47): p. 16836-41.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Menschen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben, bedanken.

Insbesondere sind dies meine Familie, meine Eltern Renate und Josef, meine Schwester Sonja sowie mein Partner Jonathan, die mich nicht nur auf diesem Weg stets liebevoll und voller Vertrauen unterstützen und begleiten. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Professor Dr. Volker Vielhauer für seine ausgezeichnete Betreuung und den unermüdlichen Einsatz für seine Arbeitsgruppe. Er vermittelte stets nicht nur fachliche Expertise und wissenschaftliche Sorgfalt, sondern immer auch die Begeisterung für die experimentelle medizinische Forschung. Der Einblick in dieses Gebiet, den er mir ermöglichte, war eine außerordentlich bereichernde Zeit für mich.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Nuru Eltrich für seine Unterstützung in der täglichen Laborarbeit. Mit großer Geduld brachte er mir die labortechnischen Methoden bei und hatte bei organisatorischen und technischen Problemen stets rasch Lösungen bereit. Mein Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden John Hoppe (ihm besonders für einige dem Teaching im Labor gewidmete Wochenenden), Manuela Mertsch, Alexander Blaut, Julia Krappe, Moritz Lux, Anja Wilkening und Bao Vi Nguyen für ihre Unterstützung und besonders auch für die schöne gemeinsame Zeit im und außerhalb des Labors.

Herrn Professor Dr. Hans-Joachim Anders möchte ich für die großzügige Mitbenutzung seines Labors danken. Bei Dr. Julian Marschner und Privatdozentin Dr. Stefanie Steiger bedanke ich mich herzlich für die enge Zusammenarbeit und das offene Ohr bei methodischen und technischen Problemen aller Art. Ich bedanke mich außerdem bei Jana Mandelbaum und Dan Draganovici für die hervorragende technische Unterstützung.

Zuletzt danke ich dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der medizinischen Fakultät der LMU München für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und für die Möglichkeit, am Promotionsstudiengang „Systembiologische Medizin“ teilnehmen zu dürfen.

Eidesstattliche Versicherung

Lindenthal, Alexandra Vera

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Die funktionelle Rolle von RIPK1-, RIPK3- und MLKL-vermitteltem Zelltod 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, 12.01.2023

Ort, Datum

Alexandra Lindenthal

Unterschrift