

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

Die Rolle der Makrophagen bei der chronischen Uratnephropathie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Markus Sellmayr

aus Ulm

2023

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. Stefanie Steiger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Neuhofer
Prof. Dr. Peter Weyrich
PD Dr. Thomas Nickel

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2023

Eidesstattliche Versicherung

Von Markus Sellmayr

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

Die Rolle der Makrophagen bei der chronischen Uratnephropathie

selbständig 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.

Folgende Personen haben an der Durchführung dieser Arbeit mitgewirkt:

- Dr. Andreas Brink und Dr. Barbara Lenz, Pharma Research and Early Development, Pharmaceutical Sciences, Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Schweiz
Sie haben das MALDI-MS Imaging der Nierenschnitte durchgeführt.
- Dr. Maria Lucia Angelotti and Prof. Paola Romagnani, Excellence Centre for Research, DE-NOTHE, University of Florence and Nephrology and Dialysis Unit, Meyer Children's University Hospital, Florenz, Italien
Sie haben Färbung von Granulomen und Nierenschnitten durchgeführt und Bilder mittels Konfokal Mikroskopie zur Verfügung gestellt.
- Dr. Ferenc Tajti und Dr. Julio Saez-Rodriguez, Division of Nephrology and Clinical Immunology und Faculty of Medicine, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen University, Joint Research Centre for Computational Biomedicine (JRC-COMBINE), Aachen
Sie haben die humanen Microarray Genexpression Daten generiert.
- Janina Mandelbaum und Dan Draganovici, Abteilung für Nephrologie, LMU Klinikum München
Sie fertigten die histologischen Schnitte an und führten die Genotypisierung der Versuchstiere durch.

Taufkirchen, 25.02.2023

Ort, Datum

Markus Sellmayr

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2017 bis März 2019 in der Abteilung für Nephrologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Ludwig-Maximilians-Universität Klinikums durchgeführt. Die Arbeit wurde von Frau Priv.-Doz. Dr. Stefanie Steiger betreut.

Förderung des Projekts:

Diese Arbeit wurde durch das Förderprogramm Forschung und Lehre (FöFoLe) der Ludwig-Maximilians-Universität unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Gudermann gefördert.

Aus dem Projekt hervorgegangene und andere Veröffentlichungen:

Auszeichnung:

- Young Investigator Award 2018 der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (04/2018)

Publikationen:

- Sellmayr M, Hernandez Petzsche MR, Ma Q, Krüger N, Liapis H, Brink A, Lenz B, Angelotti ML, Gnemmi V, Kuppe C, Kim H, Bindels EMJ, Tajti F, Saez-Rodriguez J, Lech M, Kramann R, Romagnani P, Anders HJ, Steiger S. Only hyperuricemia with crystalluria but not asymptomatic hyperuricemia drives progression of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2020 Dec; 31(12):2773-2792.
- Ma Q, Honarpisheh M, Li C, Sellmayr M, Lindenmeyer M, Böhlend C, Romagnani P, Anders HJ, Steiger S. Soluble uric acid is an intrinsic negative regulator of monocyte activation in monosodium urate crystal-induced tissue inflammation. *J Immunol*. 2020 Aug 1; 205(3):789-800.
- Ma Q, Immler R, Pruenster M, Sellmayr M, Li C, von Brunn A, von Brunn B, Ehmman RK, Wölfel R, Napoli M, Li Q, Romagnani P, Böttcher RT, Sperandio M, Anders HJ, Steiger S. Soluble uric acid inhibits β 2 integrin-mediated neutrophil recruitment in innate immunity. *Blood*. 2022 Mar 18; DOI: 10.1182/blood.2021011234

Vorträge:

- Pathomechanismen der chronischen Uratnephropathie - Etablierung eines Mausmodells. Junge Niere, 13.05.2017.
- Auswirkungen des Makrophagen-Phänotyps auf die Progression der Hyperurikämie-assoziierten CKD, DGIM-Kongress, 15.04.2018.
- Tragen Harnsäure-Granulome zur Progression der CKD bei? Die Rolle unterschiedlicher Makrophagen-Phänotypen in der chronischen Niereninsuffizienz. Nephrologisches Forum Fellows' Night, 12.06.2018.
- Tragen Harnsäure-Granulome zur Progression der CKD bei? Die Rolle unterschiedlicher Makrophagen-Phänotypen in der chronischen Niereninsuffizienz. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 30.09.2018.

Poster:

- Sellmayr M, Ma Q, Petzsche M, Gnemmi V, Preitner F, Thorens B, Anders HJ, Steiger S. Auswirkungen des Makrophagen-Phänotyps auf die Progression der Hyperurikämie-assoziierten CKD, DGIM-Kongress, 14.-17.04.2018.
- Sellmayr M, Ma Q, Petzsche M, Gnemmi V, Preitner F, Thorens B, Lenz B, Brink A, Anders HJ, Steiger S. Macrophage polarization and granuloma formation in hyperuricemia-associated CKD. ERA-EDTA Congress, 24-27.05.2018.

Meiner lieben Familie in tiefer Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	X
Abstract	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1. Die chronische Uratnephropathie.....	1
1.1.1. Die chronische Niereninsuffizienz.....	1
1.1.2. Harnsäuremetabolismus und asymptomatische Hyperurikämie.....	2
1.1.3. Hyperurikämie bei Gichtarthritis.....	3
1.1.4. Hyperurikämie bei Niereninsuffizienz.....	4
1.2. Zelluläre und molekulare Mechanismen der chronischen Uratnephropathie.....	6
1.2.1. Makrophagenpolarisation.....	6
1.2.2. Zentrale Zytokine bei der Differenzierung von Makrophagen.....	9
1.2.3. Bildung von Riesenzellen.....	10
1.3. Zielsetzung.....	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Tierhaltung.....	17
2.2. Geräte und Materialien.....	18
2.3. Chemikalien.....	21
2.4. Zytokine und Inhibitoren.....	23
2.5. Murine Antikörper für Durchflusszytometrie.....	24
2.6. Primer für die qRT-PCR.....	24
2.7. Sonstige Materialien.....	25
2.8. Software.....	27
2.9. Tierhaltung und Vorgehen.....	27
2.10. Zellkulturexperimente.....	27
2.10.1. Isolierung von Peritonealmakrophagen und deren Kultivierung.....	27
2.10.2. Isolierung und Differenzierung muriner Knochenmarkszellen.....	29
2.10.3. Mikroskopische Bestimmung der Anzahl der Zellen und der Kerne.....	30
2.11. Mausmodell zur chronischen Uratnephropathie und Untersuchungstechniken.....	31
2.11.1. Modellinduktion.....	31
2.11.2. Transkutane GFR-Messung.....	33
2.11.3. Messung der Nierenretentionsparameter.....	35
2.11.4. Anfertigung von Gefrierschnitten.....	38
2.11.5. Auswertung der histologischen Schnitte.....	38

2.12. qRT-PCR.....	39
2.12.1. RNA-Isolierung.....	39
2.12.2. Konversion von RNA in cDNA.....	41
2.12.3. qRT-PCR.....	41
2.13. Durchflusszytometrie.....	43
2.13.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie.....	43
2.13.2. Zellzyklus-Analyse mit der Durchflusszytometrie.....	43
2.13.3. Bestimmung des Makrophagen-Typs mit der Durchflusszytometrie.....	45
2.14. Statistische Methoden.....	46
3. Ergebnisse.....	48
3.1. Untersuchungen zur Makrophagen-vermittelten Riesenzellbildung.....	48
3.1.1. Untersuchungen zur Riesenzellbildung bei Peritonealmakrophagen.....	48
3.1.1.1. Tofacitinib inhibiert die IL-4-vermittelte Riesenzellbildung bei Peritonealmakrophagen.....	48
3.1.1.2. Stattic nicht aber Tofacitinib induziert einen G0/G1-Arrest bei IL-4- aktivierten Makrophagen.....	52
3.1.1.3. IL-4 reduziert die Expression von IL-10 und p27 in Peritonealmakro- phagen, während IL-10 und IL-13 zu einer Hochregulation von p21 führen.....	54
3.1.2. Untersuchungen zur Riesenzellbildung bei <i>in vitro</i> differenzierten Makro- phagen.....	56
3.1.2.1. Tofacitinib bewirkt eine Inhibierung der IL-4-getriggerten Riesen- zellbildung bei <i>in vitro</i> aus Monozyten-differenzierten Makrophagen.....	56
3.1.2.2. Peritonealmakrophagen bilden unter Stimulation mit IL-4 mehr Riesenzellen als <i>in vitro</i> differenzierte Makrophagen.....	61
3.2. Die chronische Uratnephropathie im Mausmodell.....	65
3.2.1. Alb-creERT2;Glut9lox/lox Mäuse entwickeln nach Gabe einer fettreichen Diät mit Inosin eine Hyperurikämie und Niereninsuffizienz.....	65
3.2.2. Saurer Urin-pH führt zur Bildung von Harnsäurekristallen in Alb-cre ERT2;Glut9lox/lox Mäusen mit fettreicher Diät und Inosin.....	67
3.2.3. Hyperurikämie mit Kristallurie verursacht einen Tubulusschaden, eine Entzün- dungsreaktion und Granulomabildung in Alb-creERT2;Glut9lox/lox Mäusen.....	70

3.2.4. Harnsäurekristall-Granulome bilden sich nach Manifestation einer interstitiellen Fibrose in Alb-creERT2;Glut9lox/lox Mäusen.....	75
3.3. JAK/STAT Inhibition mit Tofacitinib hat keinen Einfluss auf die Granulombildung und Progression der chronischen Uratnephropathie.....	79
3.4. Adenosin-Behandlung von Mäusen mit manifester chronischer Uratnephropathie.....	85
3.4.1. Titration einer wirksamen Adenosin-Dosis.....	86
3.4.2. Adenosin-Behandlung verlangsamt die Progression einer bestehenden chronischen Niereninsuffizienz im Rahmen der chronischen Uratnephropathie.....	87
3.4.3. Adenosin-Behandlung hat keinen Einfluss auf den Urin-pH.....	88
3.4.4. Adenosin-Behandlung inhibiert Tubulusschaden, Entzündung und Fibrose in Mäusen mit chronischer Uratnephropathie.....	89
3.4.5. Adenosin-Behandlung begünstigt die Polarisation von M2-Makrophagen in Mäusen mit chronischer Uratnephropathie.....	93
4. Diskussion.....	96
4.1. Überblick.....	96
4.2. Tofacitinib hemmt die IL-4-getriggerte Riesenzellbildung aus Makrophagen.....	98
4.3. Harnsäurekristallgranulome entstehen als Folge einer zugrundeliegenden Fibrose und tragen zu Progression der Niereninsuffizienz bei.....	99
4.4. Adenosin nicht aber Tofacitinib inhibiert die Progression der chronischen Uratnephropathie im Mausmodell.....	101
4.5. Limitationen der Studie.....	103
4.6. Zusammenfassung und Ausblick.....	104
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	106
Literaturverzeichnis.....	109
Lebenslauf.....	123
Danksagung.....	124

Zusammenfassung

Eine Korrelation zwischen der Hyperurikämie und dem chronischen Nierenversagen (CKD) ist seit langem bekannt. Allerdings bleibt bis heute die Frage ungeklärt, welches die Ursache und welches die Folge ist und ob ein erhöhter Harnsäurespiegel zur Progression der CKD beiträgt. Aufgrund der ungeklärten Kausalität wird von einigen Autoren auch das Krankheitsbild der chronischen Uratnephropathie an sich bestritten. Nach deren Ansicht steht an erster Stelle die Manifestation einer CKD, was über eine zunehmende Insuffizienz der Nierenfunktion zur Erhöhung des Harnsäurespiegels führt, also lediglich die Verschlechterung der renalen Funktion widerspiegelt. Aus Humanbiopsien ist bekannt, dass es im Rahmen einer CKD unter hyperurikämischen Bedingungen zur Bildung renaler Harnsäurekristall-assoziiierter Granulome kommen kann, deren Auswirkung auf die Progression der CKD noch nicht im Detail verstanden ist.

In einem innovativen Mausmodell, das auf dem induzierbaren Knockdown des hepatischen Harnsäuretransporters Glut9 basiert, konnten wir zeigen, dass eine Hyperurikämie in Kombination mit einer fettreichen Ernährung zur Ausbildung einer CKD führt. Diese Niereninsuffizienz gleicht histomorphologisch den bekannten Befunden aus humanen Nierenbiopsien, die durch eine tubulointerstitielle Fibrose und die Ausbildung von Granulomen gekennzeichnet sind. Da mit den Harnsäuregranulomen die Ausbildung sogenannter Riesenzellen assoziiert ist, ging es nun darum, Faktoren zu identifizieren, die *in vitro* zur Entwicklung von Riesenzellen aus Makrophagen beitragen bzw. diese inhibieren und gegebenenfalls auch *in vivo* an der Granulomentstehung beteiligt sind. Die Gabe des JAK/STAT-Inhibitors Tofacitinib blieb ohne Einfluss auf den Zellzyklus der inkubierten Makrophagen. Doch mit seiner Hilfe war es uns dennoch möglich, die IL-4-getriggerte Riesenzellbildung aus M2-polarisierten Makrophagen zuverlässig zu unterdrücken. Allerdings führte die *in vivo*-Gabe von Tofacitinib in unserem Tiermodell weder zur Reduktion der Anzahl der renalen Granulome noch hatte sie einen Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf der CKD. Wir vermuteten daher, dass wir durch das Forcieren einer antientzündlichen M2-Makrophagen-Polarisation die Entwicklung der Granulome verhindern bzw. verlangsamen könnten und somit die Progression der CKD insgesamt verlangsamt werden könnte. Deshalb wurden Mäuse mit einer Hyperurikämie-assoziierten CKD mit Adenosin behandelt, einem Wirkstoff, der *in vitro* gezeigt hat, dass er die Veränderung des Makrophagen-Typs vom proentzündlichen M1- zum antientzündlichen M2-Typ bewirken kann. Unsere Daten zeigten, dass eine Adenosin-Therapie zu einer signifikant besseren Nierenfunktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe beiträgt. Beurteilt wurde die Nierenfunktion der Tiere anhand der Parameter GFR, BUN und Serum-Kreatinin-Spiegel. Außerdem

fanden wir in den Nieren der behandelten Tiere einen geringeren Grad an Fibrose und eine reduzierte Anzahl von Granulomen. Immunhistochemische Färbungen und durchflusszytometrische Analysen der Nieren ergaben zudem eine reduzierte Makrophagen-Infiltration. Dies war mit einer erhöhten Anzahl an renalen antientzündlichen M2-Makrophagen verbunden, bei einer gleichzeitig reduzierten Zahl proentzündlicher M1-Makrophagen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Adenosin die renale Entzündung sowie die Anzahl der Granulome reduziert und somit die funktionelle und strukturelle Progression der Nierenschädigung im Tiermodell verlangsamt. Da dies im Umkehrschluss bedeutet, dass die Harnsäuregranulome mit einer schlechteren Prognose der CKD assoziiert sind, konnten diese als potentielles therapeutisches Target in der Behandlung der chronischen Uratnephropathie identifiziert werden.

Abstract

That a correlation between hyperuricemia and chronic kidney disease (CKD) exists has been known for a long time. However, it remains unclear whether hyperuricemia is the cause or the consequence of CKD and whether increased serum uric acid levels contribute to CKD progression. While causality has not been proven yet, some authors even deny the concept that chronic urate nephropathy really exists. They believe that an already established CKD can lead to hyperuricemia due to an impaired kidney function. Therefore, increased uric acid levels may only serve as a marker for the decline in kidney function and do not promote kidney injury. From human biopsies it is known that CKD-related hyperuricemia can eventually lead to the precipitation of uric acid crystals, which in turn contribute to uric acid crystal granuloma formation in the kidney. However, the impact of uric acid crystal granulomas on the progression of CKD is not well understood.

Using an innovative mouse model based on an inducible knockdown of the hepatic uric acid transporter Glut9 we could now show that hyperuricemia with crystalluria induces kidney injury, inflammation and interstitial fibrosis. This was due to a drop in urinary pH after feeding mice an acidogenic diet, which promoted the precipitation of uric acid crystals and eventually caused uric acid crystal granuloma formation. Morphological similarities of tubulointerstitial fibrosis and granuloma formation were observed in human kidney biopsies from CKD patients. Uric acid crystal granulomas are known for their association with giant cell formation, therefore we aimed to identify factors that promote or inhibit the differentiation of macrophages into giant cells *in vitro* and are involved in granuloma formation *in vivo*. We found that the JAK/STAT inhibitor tofacitinib had no effect on the cell cycle of cultured macrophages but suppressed IL-4-mediated giant cell formation in M2-like macrophages. However, treating hyperuricemic mice with crystalluria with tofacitinib did not reduce the number of granulomas and slow down CKD progression. Next, we focussed on whether accelerating an anti-inflammatory M2-like macrophage phenotype could prevent or slow down granuloma formation and

consequently CKD progression. *In vitro* studies have shown that adenosine can switch proinflammatory M1-like into an anti-inflammatory M2-like macrophage phenotype. Treating mice with adenosine significantly improved kidney function compared to the vehicle control group as indicated by an increased glomerular filtration rate and decreased serum blood urea nitrogen and creatinine levels. Moreover, we observed significantly less interstitial fibrosis and a reduced number of granuloma in the kidneys of adenosine-treated mice. Immunohistochemical stainings and FACS analyses of murine kidney samples also showed reduced macrophage infiltration combined with an increased number of anti-inflammatory M2-like macrophages but less proinflammatory M1-like macrophages in adenosine-treated mice.

In summary, we could show that uric acid crystal granulomas comprised of M1-like macrophages form late in the process after interstitial fibrosis has already been established and contribute to the progression of CKD in mice. Unlike tofacitinib, adenosine treatment reduced the number of granulomas and therefore improved kidney function and structural abnormalities of kidney injury. Thus, uric acid crystal granulomas are associated with a worse outcome and prognosis in CKD and may represent a potential therapeutic target in the treatment of chronic urate nephropathy.

Abkürzungsverzeichnis

ADAM9	<i>A Disintegrin and A Metalloprotease 9</i>
AK	Antikörper
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
A _x R	Adenosinrezeptor
αSMA	<i>alpha-Smooth Muscle Actin</i>
BUN	<i>Blood Urea Nitrogen</i>
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFU-GM	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Forming Unit</i>
CKD	<i>Chronic Kidney Disease</i> (chronisches Nierenversagen)
CT	<i>Chamber Temperature</i>
CT-Wert	<i>Cycle Threshold</i>
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAP12	<i>DNAX-Activating Protein 12</i>
DBA	<i>Dolichos Biflorus Agglutinin</i>
DC	<i>Dendritic Cells</i>
DC-STAMP	<i>Dendrocyte Expressed Seven Transmembrane Protein</i>
DDR	<i>DNA Damage Response</i>
DEGAM	Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ENTPD1	Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	Fetales Bovines Serum
FcR	Fc-Rezeptor

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FSP-1	<i>Ferroptosis Suppressor Protein 1</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
Glut9	Glukosetransporter 9
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HFD	<i>High Fat Diet</i>
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen DR
HU	Hyperurikämie
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
KCNN4	<i>Potassium Calcium-Activated Channel Subfamily N Member 4</i>
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
KG	Körpergewicht
KIM-1	<i>Kidney Injury Molecule-1</i>
KO	<i>knockout</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen 1</i>
LPS	Lipopolysacharid
LTA	<i>Lotus Tetragonolobus Agglutinin</i>
MALDI-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Massenspektrometrie</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex Class II</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSU	Monosodiumurat

M _x	Makrophagen-Subpopulation
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Factor 88</i>
NFATc1	<i>Nuclear Factor of Activated T Cells 1</i>
NF _κ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NIC	<i>Network Interface Controller</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
NT5E	Ekto-5'-Nukleotidase
OT	<i>Object Temperature</i>
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff Reaction</i>
pH	potentia hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PS	Penicillin/Streptomycin
PTPRC	Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C
P2X ₇	P2X-Purinrezeptor 7
(qRT-)PCR	<i>Real-Time Quantitative PCR</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RCT	<i>Randomized Controlled Trial</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
rRNA	ribosomale RNA
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SIRP _α	<i>Signal Regulatory Protein α</i>
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
THP	Tamm Horsfall Protein
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TREM2	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2</i>
T _x	T-Zell-Subpopulation
UV	ultraviolett

VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
ZO-1/2	Zonula occludens-1/2

1. Einleitung

1.1. Die chronische Uratnephropathie

1.1.1. Die chronische Niereninsuffizienz

Als chronische Niereninsuffizienz bzw. *Chronic Kidney Disease* (CKD) wird eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen bezeichnet, die negative Auswirkungen auf die strukturelle und funktionelle Integrität der Niere haben [1]. Von der KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) wird die CKD definiert als eine für mindestens 3 Monate andauernde, die Gesundheit beeinträchtigende Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) auf < 60 ml/min/1,73 m² und/oder eine strukturelle Schädigung der Niere [2]. Zu den häufigsten Ursachen einer CKD zählen der Diabetes mellitus, die Hypertonie und die Glomerulonephritis [3]. Daneben gibt es jedoch noch weitere Risikofaktoren, wie z.B. die symptomatische Hyperurikämie, die ebenfalls, wenn auch seltener, zu einer chronischen Niereninsuffizienz führen kann [4]. Man geht davon aus, dass die weltweite Prävalenz der CKD zurzeit bei etwa 10-15% liegt und diese in der Zukunft weiter ansteigen wird [5]. Die KDIGO definiert innerhalb der CKD in Abhängigkeit von der GFR und dem Grad einer persistierenden Albuminurie vier verschiedene Prognosegruppen, von einem geringem bis hin zu einem sehr hohen Risiko (Abb. 1).

Mit zunehmender Erkrankungsdauer kommt es zu einer immer stärker werdenden Fibrosierung der Nieren, was als Korrelat eines fehlgeschlagenen Versuchs der Wundheilung des chronisch geschädigten Nierenparenchyms aufgefasst werden kann [3]. Durch den fortschreitenden Verlust an funktionsfähigem Parenchym kommt es zu den typischen Begleiterscheinungen einer reduzierten Filtrationsleistung der Niere, wie z.B. das akute Nierenversagen, ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Infektionen, geistige Beeinträchtigungen und eine geringere körperliche Belastbarkeit [1]. Die CKD hat somit Folgen für verschiedenste Organsysteme und ist daher eine Systemerkrankung des gesamten Körpers und nicht nur die Erkrankung eines einzelnen Organs [6]. Die schwerste Form der Niereninsuffizienz ist schließlich das potentiell tödliche terminale Nierenversagen, das nur noch durch eine Nierenersatztherapie, das heißt Dialyse oder Nierentransplantation behandelt werden kann [5]. Allerdings kann mit diesen Verfahren nur ein Teil der Funktionen einer gesunden Niere ersetzt werden, sodass auch unter Therapie die Gefahr von metabolischen und/oder Elektrolytentgleisungen besteht [7]. Unter letzteren ist vor allem die Entgleisung des Kaliumspiegels zu nennen, die mit einem erhöhten Risiko für schwere kardiale Komplikationen und einer erhöhten Mortalität einhergeht [7].

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

Green, low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); yellow, moderately increased risk; orange, high risk; red, very high risk.

Abbildung 1: CKD-Prognose-Score der KDIGO in Abhängigkeit von GFR und Albuminurie [8].

1.1.2. Harnsäuremetabolismus und asymptomatische Hyperurikämie

Sowohl die DNA als auch die RNA bestehen zu großen Teilen aus den Purinen Adenin und Guanin. Bei der Degradierung der Nukleinsäuren werden neben den weiteren Bestandteilen auch die Nukleoside dieser beiden Purine, Adenosin und Guanosin, freigesetzt. Dabei stammen etwa zwei Drittel der abgebauten Purine aus endogenen Nukleinsäuren, nur ein kleiner Teil wird über die Nahrung zugeführt [9] und kann somit potenziell diätetisch beeinflusst werden. Adenosin und Guanosin werden enzymatisch über die Adenosin-Desaminase, die Purinnukleosid-Phosphorylase und die Xanthin-Oxidoreduktase bzw. über die Purinnukleosid-Phosphorylase und die Guanin-Desaminase zu Xanthin abgebaut [10]. Es folgt die Oxidation des Xanthins zur Harnsäure über die Xanthin-Oxidoreduktase [11]. Die meisten Säugetiere wandeln die schlecht lösliche Harnsäure anschließend noch mit Hilfe der Urikase in das sehr gut wasserlösliche Allantoin um. Beim Menschen und den höheren Primaten endet der Purinstoffwechsel hingegen mit der Harnsäure, da sie im Verlauf der Evolution das Enzym Urikase verloren haben

[12]. Dadurch erreichen sie im Vergleich zu den Lebewesen, die die Harnsäure zu Allantoin abbauen können, einen um ein Vielfaches erhöhten Harnsäurespiegel im Blut, dessen evolutionärer Nutzen allerdings bis heute unklar ist [13].

Die Hyperurikämie ist definiert als eine Erhöhung des Harnsäurespiegels im Serum von $\geq 6,8$ mg/dl [14] als Folge einer Nierenfunktionseinschränkung (häufigste Ursache) oder genetischer Mutationen von Harnsäuretransportern. Eine epidemiologische Untersuchung an US-Amerikanern kam zu dem Schluss, dass ihre Prävalenz bei 21,2% für Männer und 21,6% für Frauen liegt [15]. Damit liegt sie etwa doppelt so hoch, wie die für die CKD geschätzte Prävalenz [5]. Zudem wurde in den letzten Jahren eine stetige Zunahme an hyperurikämischen Personen registriert, was unter anderem auf Änderungen des Lebensstiles und der Ernährungsgewohnheiten, sowie auf eine gestiegene Lebenserwartung und die im Zusammenhang mit der demographischen Entwicklung immer älter werdende Gesellschaftsstruktur zurückgeführt wird [16]. Damit verbunden ist auch ein Anstieg in der Häufigkeit von Begleiterkrankungen, wie z.B. der Gicht [17] [18]. Zudem nimmt die Bedeutung der Hyperurikämie als kardiovaskulärer Risikofaktor [16] [19] durch die steigende Prävalenz immer weiter zu. Allerdings liegt bis heute keine einheitliche Empfehlung zur Behandlung einer asymptomatischen Hyperurikämie vor [2] [19] [20]. So empfiehlt etwa die Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin (DEGAM) aufgrund der unklaren Studienlage und potentieller Nebenwirkungen der Therapie aktuell keine generelle Behandlung einer asymptomatischen Hyperurikämie [21].

1.1.3. Hyperurikämie bei Gichtarthritis

Gicht ist eine Systemerkrankung, die durch Gewebeablagerungen von Monosodiumuratkristallen (MSU) gekennzeichnet ist [18]. Ihre Prävalenz liegt in westlichen Ländern bei 3-6% bei Männern bzw. 1-2% bei Frauen und nimmt mit dem Alter zu [22]. Überschreitet der Harnsäurespiegel im Serum 6,8 mg/dl, wird das Löslichkeitsprodukt der Harnsäure überschritten und es kommt zur Bildung von MSU [23]. Diese lagern sich im Gewebe ab und führen zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems, insbesondere von Makrophagen, die die ausgefallenen MSU phagozytieren [23]. Co-Stimulation mit freien Fettsäuren oder Lipopolysacchariden führt dabei zur Produktion und Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β aus den Makrophagen, das ein Hauptmediator der weiteren Entzündungsreaktion ist [23]. Kommt es zu einer Chronifizierung dieser Inflammation, führt dies zu teilweise irreversiblen Veränderungen wie Knochenerosionen, Knorpelschäden oder der Ausbildung von Tophi [22]. Während

akute Gichtattacken mit NSAR, Kortikosteroiden und Colchicin behandelt werden, haben Medikamente wie Allopurinol, Febuxostat und Probenecid, die zu einer Senkung des Harnsäurespiegels führen, ihren Stellenwert in der langfristigen Behandlung der Gicht [24].

Obwohl die Bildung von MSU unter hyperurikämischen Bedingungen der wichtigste Pathomechanismus im Rahmen der Gichtentstehung ist, entwickeln nur etwa 5% der Menschen mit einem Harnsäurespiegel von >9 mg/dl eine Gicht, während die Hyperurikämie bei der überwiegenden Mehrheit asymptomatisch bleibt [22]. Das bedeutet, dass noch weitere Faktoren, wie zum Beispiel die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen [18].

1.1.4. Hyperurikämie bei Niereninsuffizienz

Im Rahmen des sog. Tumorlysesyndroms kommt es durch Chemo- bzw. Strahlentherapie zu einem ausgeprägten Gewebeabbau [25] [26]. Dies führt dazu, dass aus den zerfallenden Zellen große Mengen an DNA sowie RNA freigesetzt werden, deren Purine anschließend zur Harnsäure verstoffwechselt werden [26]. Dadurch steigt der Harnsäurespiegel im Blut sprunghaft an, sodass die Löslichkeitsschwelle in der Niere überschritten wird und die Harnsäure intratubulär auskristallisieren kann [27]. Daneben gibt es noch weitere schädigende, Kristall-unabhängige Wirkungen der Harnsäure, wie z.B. die Initiierung einer Entzündungsreaktion oder ein herabgesetzter renaler Blutfluss [25]. Im schlimmsten Falle entwickelt sich dadurch ein akutes Nierenversagen, das als akute Uratnephropathie beschrieben ist [26].

Epidemiologische und experimentelle Daten legen nahe, dass auch ein isolierter chronisch erhöhter Harnsäurespiegel die Entwicklung einer Nierenschädigung, in diesem Fall eine chronische Niereninsuffizienz, begünstigt und zusätzlich das kardiovaskuläre Risiko bei CKD-Patienten erhöht [4]. Diese Form der CKD, auf Grund ihrer Ätiologie auch als chronische Uratnephropathie bezeichnet, manifestiert sich durch die Bildung von Harnsäurekristallen, die letztlich zur tubulointerstitielle Fibrose und Glomerulosklerose beitragen [28]. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Unterscheidung in asymptomatische und symptomatische Hyperurikämie. Erstere ist eine isolierte Erhöhung des Harnsäurespiegels ohne Harnsäurekristallablagerungen und ohne Beeinträchtigung der Nierenfunktion. Kommt es durch Änderung der Löslichkeitsschwelle oder weitere Risikofaktoren zu einem Ausfall von Harnsäurekristallen und einer Verschlechterung der Nierenfunktion geht die asymptomatische in eine symptomatische Hyperurikämie über. Inwieweit die Hyperurikämie hierbei zur Progression der CKD kausal beiträgt,

ist Gegenstand aktueller Forschung. [29] Auf der einen Seite gibt es auf Grundlage kleiner single-center Studien Hinweise dafür, dass eine asymptomatische Hyperurikämie zur Verstärkung der Niereninsuffizienz beiträgt [30] [31] [32] [33] [34]. Auf der anderen Seite konnten randomisierte kontrollierte Multizenterstudien nicht belegen, dass eine Senkung des Harnsäurespiegels zu einer Verlangsamung der CKD führt [35] [36] [37] [38] [39]. Abschließende experimentelle oder klinische Daten liegen bisher nicht vor (Abb. 2).

Als Endprodukt im humanen Purin-Stoffwechsel wird die Harnsäure in gesunden Personen zu einem Großteil über die Nieren ausgeschieden. Folglich kommt es bei einer Einschränkung der Nierenfunktion ebenfalls zu einem Anstieg des Harnsäurespiegels im Blut, allerdings sekundär [40]. Aus diesem Grund wurde lange Zeit kontrovers diskutiert, ob ein erhöhter Harnsäurespiegel ursächlich für eine CKD sein kann oder nur Ausdruck der Niereninsuffizienz ist, und ein solcher kausaler Zusammenhang von zahlreichen Publikationen negiert [41] [42]. Selbst in aktuellen Leitlinien wird das Krankheitsbild mit Verweis auf diese Studien in Frage gestellt [21]. Eine Studie zur Erhebung der Prävalenz der chronischen Uratnephropathie, die an humanen Nierenbiopsien durchgeführt wurde, kam zu dem Ergebnis, dass 0,1% der Proben Zeichen einer chronischen Uratnephropathie aufweisen. Charakteristisch für diese ist eine tubulointerstitielle Fibrose und die Entstehung von Granulomen, die u.a. aus mehrkernigen Riesenzellen bestehen. (unveröffentlichte Daten aus der Doktorarbeit von Moritz Roman Hernandez Petzsche, 2020)

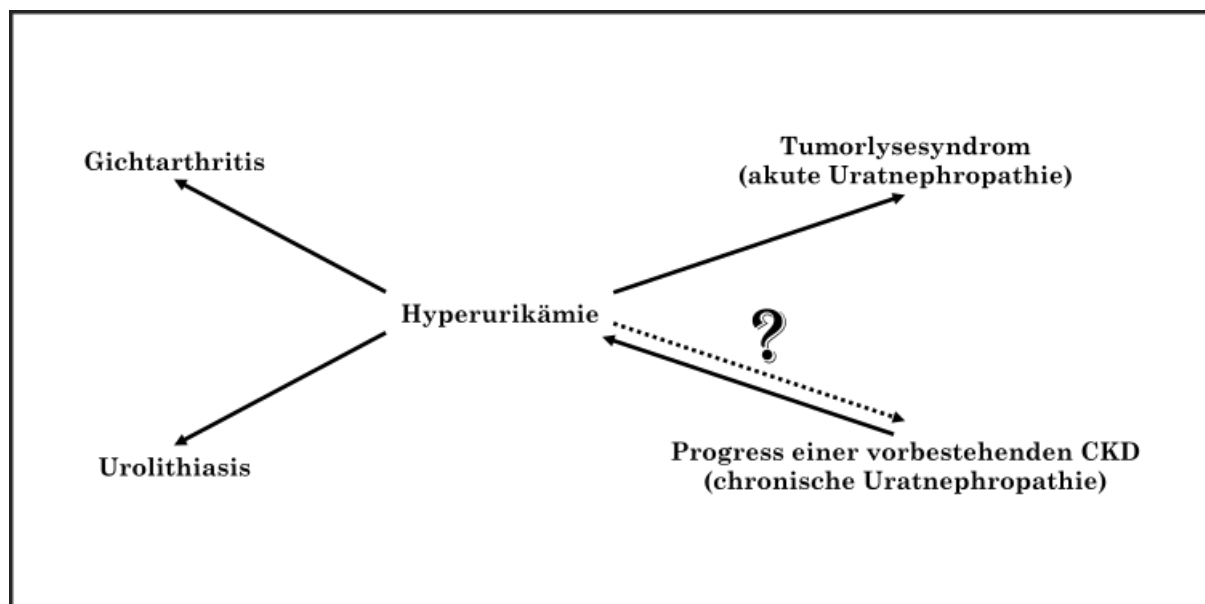


Abbildung 2: Darstellung von Erkrankungen mit einem kausalen Einfluss der Hyperurikämie. [43] [44] [45] [46]

1.2. Zelluläre und molekulare Mechanismen der chronischen Uratnephropathie

1.2.1. Makrophagenpolarisation

Im Verlauf der Progression einer chronischen Niereninsuffizienz kommt es mit der Zeit zu Entzündungsreaktionen in den Nieren und in der Folge zu einem fibrotischen Umbau funktionellen Gewebes. An diesen Reaktionen sind maßgeblich verschiedene Makrophagen-Populationen mitbeteiligt [47]. Unterschiedlich polarisierte Makrophagen spielen in der Progression der CKD zu unterschiedlichen Zeiten eine dominante Rolle, wobei sich die Umgebungsbedingungen und die Makrophagen gegenseitig beeinflussen. Entzündungsreaktionen und Zellnekrosen begünstigen die Bildung eines proinflammatorischen M1-Typs, die Aufnahme apoptotischer Zellen hingegen die Bildung antiinflammatorischer M2c-Makrophagen, während ein unzureichender Heilungsprozess zur Induktion profibrotischer M2a-Makrophagen führt [47]. Umgekehrt bewirken M1-Makrophagen eine Aggravierung des Zellschadens, unterstützen M2c-Makrophagen den Heilungsprozess und M2a-Makrophagen den fibrotischen Umbau des Gewebes [47]. Die einzelnen Makrophagen-Typen unterscheiden sich durch die unterschiedliche Expression von Oberflächenmolekülen und Proteinen/Transkriptionsfaktoren, so sind M2-Makrophagen im Gegensatz zu M1-Makrophagen beispielsweise durch die STAT 6 (*signal transducer and activator of transcription*) -abhängige Produktion von CD206 und Arginase-1 charakterisiert [48].

Entzündungsreaktionen beinhalten die Rekrutierung von Leukozyten inklusive der Makrophagen. Am Ort der Infektion werden diese mit PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) und/oder DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) konfrontiert, die über ihre Rezeptoren zur M1-Polarisierung der Makrophagen führen. Diese zeigt sich in der Produktion und Sekretion von IL-1, IL-12, IL-23, TNF- α , Matrixmetalloproteasen (MMPs) und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), sowie der verstärkten Ausbildung von iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase), MHC-II-Molekülen und IL-1-Rezeptoren [49] [50]. Stimulation von Makrophagen mit Wachstumsfaktoren (TGF, EGF), IL-4 und IL-13 bewirkt die Ausbildung eines M2a-Typs, der eine Rolle in der klassischen T_H2-Immunantwort spielt [51] [52]. Diese Zytokine werden hierbei hauptsächlich von aktivierten T-Zellen, aber auch von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten freigesetzt [48]. *In vitro* Studien zeigen, dass Makrophagen, die mit IL-4 und IL-13 stimuliert werden, STAT 6-abhängig Fibronectin und andere Bestandteile der extrazellulären Matrix produzieren, sowie Mannose-(CD206) und *Scavenger*-Rezeptoren, TGF, CTGF, IL-1R11, FIZZ und YM-1 ausbilden, das heißt M2a-polarisiert sind. Unklar bleibt, inwieweit dieser Mechanismus *in vivo* an der Progression der Fibrose beteiligt

ist. [49] [50] Die Exposition von Makrophagen mit Immunkomplexen, LPS (Lipopolysaccharide) oder Liganden von Toll-like-Rezeptoren (TLR) und IL-1R führt zu einer M2b-Polarisation, die durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6, sowie durch die Förderung der T_H2-Differenzierung und der Antikörperproduktion gekennzeichnet ist [51]. Im Verlauf der akuten Entzündungsreaktion durchlaufen zahlreiche der rekrutierten neutrophilen Granulozyten die Apoptose und werden von benachbarten Makrophagen phagozytiert. Dies stimuliert in den Makrophagen die Produktion antiinflammatorischer Zytokine, wie TGF- β (*Transforming Growth Factor*) und IL-10, die ihrerseits zu einer M2c-Polarisierung beitragen. Dieser Effekt wird durch die Sekretion von TGF- β und IL-10 durch regulatorische T-Zellen zusätzlich verstärkt [49]. Glukokortikoide unterstützen ebenfalls die Ausbildung eines M2c-Makrophagen-Typs [53]. Ein synergistisches Zusammenspiel aus Agonisten von Toll-like-Rezeptoren und des Adenosin-2A-Rezeptors (A_{2A}R) bewirkt die M2d-Polarisierung von Makrophagen, die durch eine gesteigerte Sekretion von IL-10 und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) charakterisiert ist [54]. Diese Makrophagen sind in Prozesse der Angiogenese und Tumorprogression involviert [55]. Darüber hinaus identifizierten aktuelle Studien eine fibrolytische Makrophagen-Subpopulation, die u.a. durch LPS zur Produktion von Matrixmetalloproteasen stimuliert werden und somit zur Regression einer Leberzirrhose beitragen (Abb. 3) [56] [57].

Schon seit längerem ist aus *in vitro* Studien bekannt, dass Adenosin die proinflammatorische Polarisation der Makrophagen inhibiert, indem es die Zytokinproduktion und die Induktion der iNOS unterdrückt [58]. Adenosin entsteht dabei durch Hydrolyse aus Adenosintriphosphat (ATP), vermittelt durch die M1-Oberflächenmoleküle CD39 und CD73. ATP ist als Zellschädigungsmarker zunächst an einer verstärkten Bildung von M1-Makrophagen beteiligt. Sobald diese an ihrer Oberfläche CD39, die Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1 (ENTPD1), und CD73, die Ekto-5'-Nukleotidase (NT5E), ausbilden, beginnt die Bildung von Adenosin und somit die selbstinduzierte Inhibierung der Entzündungsreaktion über den Adenosin-2A-Rezeptor [59] [60]. *Garcia et al.* konnten zeigen, dass die Aktivierung dieses Rezeptors die Infiltration weiterer Makrophagen in die Nieren, sowie ein Fortschreiten der Niereninsuffizienz und der Fibrosierung der Nieren unterdrückt [61]. Neben der regulierenden Wirkung auf die M1-Makrophagen über A_{2A}R beeinflusst Adenosin über A_{2B}R auch die alternative Makrophagen-Aktivierung hin zum antiinflammatorischen M2-Typ [62]. Darüber hinaus wird durch Adenosin zusätzlich die IL-4 und IL-13 abhängige M2-Polarisation verstärkt [58].

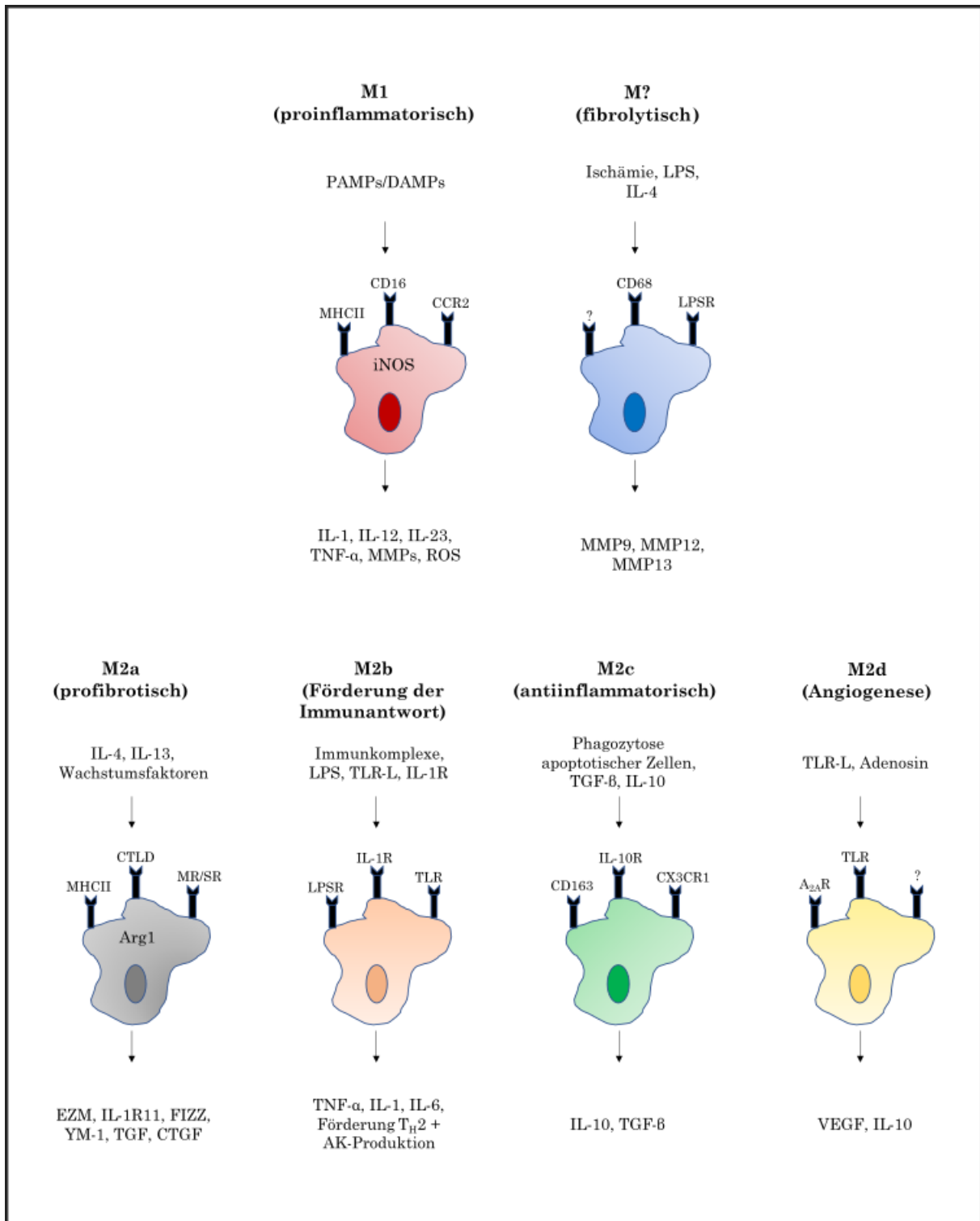


Abbildung 3: Übersicht über die verschiedenen Makrophagen-Subpopulationen.

Darstellung inklusive der Faktoren, die für die Polarisation notwendig sind, und der Faktoren, die von den polarisierten Makrophagen produziert und freigesetzt werden. [50] [52] [57] [49] [56] [51]

1.2.2. Zentrale Zytokine bei der Differenzierung von Makrophagen

Die Interleukine (IL) 4 und 13 sind die charakteristischen Zytokine einer Entzündungsreaktion vom Typ 2, die entweder durch Parasiten oder durch Allergene ausgelöst wird [63]. IL-4 treibt dabei die B-Zell-Differenzierung voran und bewirkt einen Antikörperklassenwechsel hin zur vermehrten Produktion von IgG1 und IgE. Über die Ausbildung des profibrotischen M2a-Makrophagentyps spielt IL-4 auch in der T-Zell-Differenzierung eine entscheidende Rolle, etwa bei der Bildung von T_H2 , T_H9 und T_{reg} [64] [51]. Außerdem reguliert es die Synthese von IgE [65], kann vor Wurminfektionen schützen und leistet einen wichtigen Beitrag zu verschiedenen Homöostase- und Reparaturmechanismen [64]. Neben den T_H2 -Zellen werden IL-4 und IL-13 auch in Makrophagen, Mastzellen, natürlichen Killerzellen, sowie eosinophilen und basophilen Granulozyten synthetisiert [66]. Da IL-13 teilweise über die gleichen Rezeptoren wie IL-4 wirkt, sind sich die beiden Zytokine in ihrer funktionellen Wirkung sehr ähnlich [67].

Interleukin-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin mit einer zentralen Funktion bei der Begrenzung entzündlicher und autoimmuner Prozesse, das von einer Vielzahl von Zellen der erworbenen und angeborenen Immunantwort freigesetzt wird, z.B. von T-Zellen (T_H1 , T_H2 , T_H17 , T_{reg} , T_c), B-Zellen, dendritischen Zellen (DC), Makrophagen, Mastzellen, natürlichen Killerzellen (NK), von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten [68]. Bei Makrophagen führt die Stimulation von Toll-like-Rezeptoren zur Aktivierung verschiedener MAPKs (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) sowie NF- κ B und somit zu einer erhöhten Produktion und Sekretion von IL-10 [68]. Freigesetztes IL-10 bindet an den IL-10-Rezeptor, der von Makrophagen, DCs, NKs, T_{reg} und B-Zellen exprimiert wird [69]. Die Hauptfunktion von IL-10 ist es, die Entzündungsreaktion zu unterdrücken bzw. zu begrenzen und den durch eine überschießende Inflammation bedingten Kollateralschaden im Gewebe zu minimieren [70]. Jedoch trägt dieser Mechanismus bei bestimmten Infektionen zu einer beeinträchtigten Eliminierung der Pathogene und zur Entstehung von chronischen Entzündungen bei [70].

TNF (Tumornekrosefaktor)- α gilt aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Regulation der Expression proinflammatorischer Zytokine als das Schlüsselmolekül der Entzündungsreaktion [71]. Daneben steigert es die Produktion von Prostaglandinen sowie des Plättchenaktivierenden Faktors und steuert eine Vielzahl der Funktionen der Makrophagen [71]. Diese zentrale Stellung im Inflammationsgeschehen erklärt die Beteiligung von TNF- α an den verschiedensten tumorösen, neurologischen, kardiovaskulären, pulmonalen, autoimmunen und metabolischen Erkrankungen [72].

1.2.3. Bildung von Riesenzellen

Typische Beispiele für mehrkernige Riesenzellen, die aus Monozyten(-vorläufern) bzw. Makrophagen entstehen, sind Fremdkörper-Riesenzellen, Langhans-Riesenzellen und Osteoklasten [73]. Fremdkörper-Riesenzellen entstehen an der Grenzfläche zwischen implantierten Prothesen und Biomaterialien oder wenn der Fremdkörper-Partikel zu groß für die Phagozytose durch einen einzelnen Makrophagen ist [74]. Dagegen treten Langhans-Riesenzellen bei infektiösen Erkrankungen wie der Tuberkulose auf, die zur Ausbildung von Granulomen führen [75]. Osteoklasten sind physiologisch vorkommende Riesenzellen, die für die Knochenresorption und damit einhergehend für den kontinuierlich stattfindenden Knochenumbau verantwortlich sind [73]. Alle drei Riesenzell-Arten haben gemeinsam, dass in den Prozess ihrer Entwicklung die Verschmelzung von Vorläuferzellen involviert ist (Abb. 4) [75]. Der genaue Mechanismus ist allerdings bis heute nicht gänzlich aufgeklärt [76]. Grundsätzlich sind für die Zellfusion drei Schritte erforderlich, die Entwicklung der Fähigkeit zu verschmelzen, das heißt die Expression der für die Fusion benötigten Proteine (u.a. DC-STAMP, Cadherine, Mannose-Rezeptoren), die Migration und die interzelluläre Adhäsion in Kombination mit der Ausbildung eines gemeinsamen zytoplasmatischen Raums durch Verschmelzen der Zellmembranen [75]. Außerdem ist es unerlässlich, dass fusionierende Makrophagen vor der Verschmelzung Signale austauschen, die zur Aktivierung anderer Signalwege führen, wie sie beispielsweise aus der Phagozytose und anschließendem Abbau apoptotischer Zellen bekannt sind, da nach erfolgter Fusion beide Zellen als Einheit weiterleben sollen [77]. Hierfür ist ein bis heute nicht verstandener Selbsterkennungsmechanismus notwendig, in den möglicherweise eine SIRP α -CD47-Bindung involviert ist, die allerdings aufgrund der Komplexität des Fusionsgeschehens allein bei weitem nicht ausreichend ist [77].

Durch M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) stimulierte Monozyten sekretieren Chemokine, z.B. CCL2 und CCL3, die die gesteigerte Expression von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen (LFA-1, ICAM-1, E-Cadherin) und Proteinen, die die Fusion erleichtern (CD200, SIRP α /CD172a/MFR, CD47, CD36, E-Selectin, DC-STAMP, Matrix-Metallopeptidase 9), stimulieren [76]. Für die Verschmelzung essentiell ist hierbei insbesondere die Interaktion zwischen TREM2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) und seinem Co-Stimulus DAP12 (*DNAX-activating protein 12*), das das für die Fusion benötigte ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) trägt [78]. Außerdem scheint sowohl in die Entstehung von Osteoklasten als auch von Langhans- bzw. Fremdkörper-Riesenzellen der ATP-abhängige Ionenkanal P2X₇-Rezeptor involviert zu sein [74]. Seine Funktion liegt hierbei offenbar weniger

in der direkten Beteiligung an der Verschmelzung der Zellen als vielmehr in der Vorbereitung der Makrophagen auf die Fusion durch Feinregulierung hierfür notwendiger Signalwege [78]. Während in der Osteoklastogenese zahlreiche Modulatoren beschrieben wurden, die den regulierenden Einfluss von Calcium auf die Entstehung mehrkerniger Zellen vermitteln, gibt es kaum Daten zu ihrer Rolle in der Entstehung von (Langhans- bzw. Fremdkörper-)Riesenzellen [78]. Bis heute ist nur ein einziger gemeinsamer Regulator beschrieben, der Calcium-aktivierte Kalium-Kanal KCNN4, der die Translokation von NFATc1 (*nuclear factor of activated T-cells 1*) in den Nukleus und nachgeschaltete Akt-Aktivierung forciert [78]. Trotz gemeinsamer Mediatoren, die die myeloiden Zellen für eine Fusion kompetent machen, unterscheiden sich die nachgeschalteten Signalwege, sodass phänotypisch und funktional unterschiedliche mehrkernige Zellen entstehen [78].

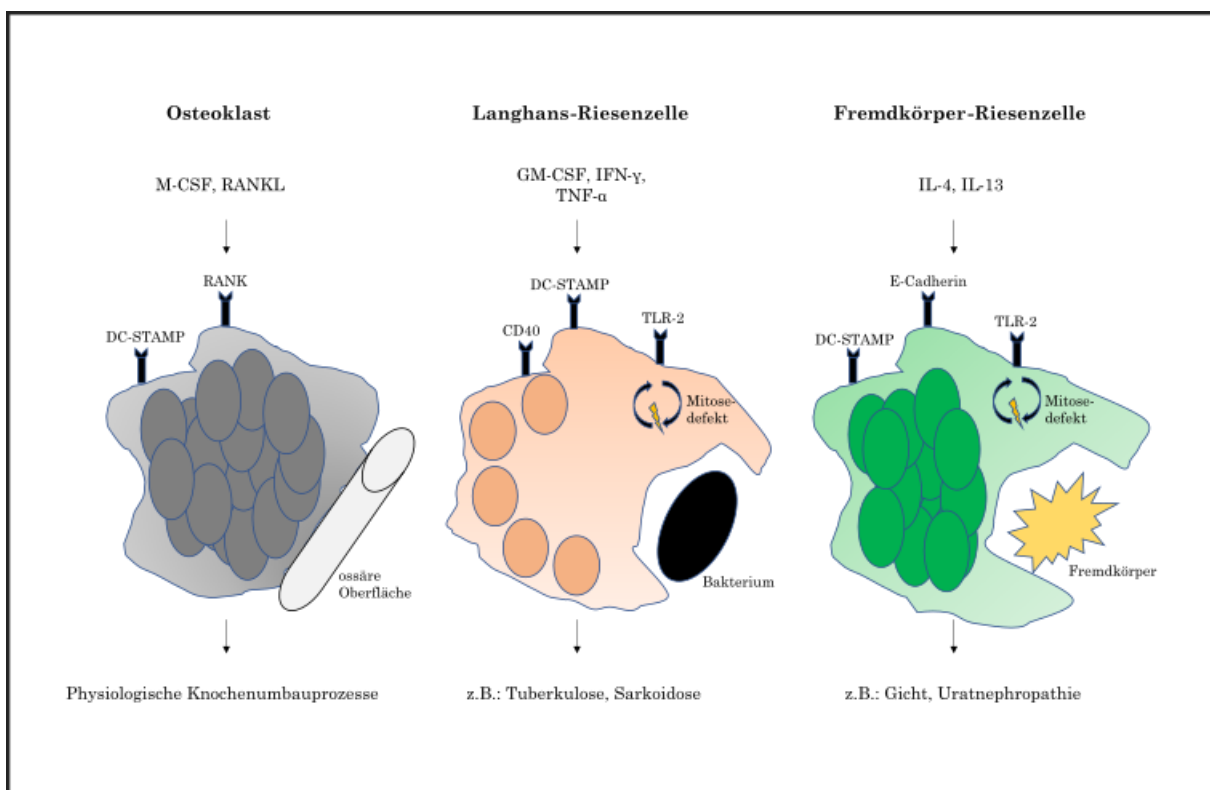


Abbildung 4: Übersicht über die Entstehung und Funktion mehrkerniger (Riesen-)Zellen.

Schematische Darstellung der Faktoren, die zur Bildung mehrkerniger Zellen führen, sowie der Funktion von Osteoklasten, Langhans- und Fremdkörper-Riesenzellen. [79] [74] [73] [76] [80] [75] [81] [82] [83]

Die Osteoklasten-Vorläufer CFU-GM (*colony-forming unit granulocyte/macrophage*) sind myeloide Zellen aus dem Knochenmark, die im Blut zirkulieren und schließlich über einen noch nicht gänzlich geklärten Mechanismus an ossäre Oberflächen binden, bei dem vermutlich die

Interaktion zwischen den Integrinen $\alpha_v\beta_3$ bzw. $\alpha_v\beta_5$ und Tripeptid-Sequenzen der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle spielt [74] [81] [84]. Die Differenzierung zu Osteoklasten wird hauptsächlich über zwei von Osteoblasten sekretierte Zytokine gesteuert, RANKL (*receptor activator of NF- κ B ligand*), dessen Produktion durch Parathormon und TNF- α gesteigert wird, und M-CSF [74] [79]. RANKL führt zum einen zur Induktion von JNK (c-Jun-N-terminalen Kinase) und zum anderen dazu, dass c-FOS und NFATc1 an den Promotor von DC-STAMP binden, das als transmembranöses Protein eine entscheidende Rolle bei der Entstehung mehrkerniger Osteoklasten spielt [75]. Zusätzlich bewirkt DC-STAMP die Aktivierung von NFAT- und Calcium-Signalwegen, die ebenfalls in die Osteoklastogenese involviert sind [75]. (Abb. 4)

Riesenzellen vom Langhans-Typ entstehen bei granulomatös-entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. der Tuberkulose oder der Sarkoidose, und sind durch eine geringere Anzahl von Kernen pro Zelle gekennzeichnet, das heißt typischerweise 3 bis 18 Kerne, die sich am Rande der Zelle zirkulär anordnen [73] [76] [80]. Gesteuert wird die Bildung der Langhans-Riesenzellen, bei der DC-STAMP und CD40 eine zentrale Rolle spielen, durch GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), Interferon-(IFN-) γ , IL-3 und TNF- α [73] [75] [79]. In Anwesenheit von proinflammatorischen, bakteriellen Glykolipiden werden Makrophagen, die sich in Granulomen befinden, dazu gebracht, über einen TLR-2-abhängigen und ADAM9- sowie β 1-Integrin-vermittelten Signalweg zu fusionieren [74]. Die Mechanismen, die zum Erwerb der Fusionskompetenz und dadurch zur Ausbildung von mehrkernigen Zellen führen, scheinen die gleichen zu sein, wie sie für die Fremdkörper-Riesenzellen beschrieben worden sind [74]. Dies ist umso wahrscheinlicher, als sich je nach Umgebungsbedingungen und Stimulation Langhans-Riesenzellen in Fremdkörper-Riesenzellen umwandeln können und umgekehrt (Abb. 4) [83].

Fremdkörper-Riesenzellen entstehen unter Stimulation mit aus Lymphozyten freigesetztem IL-4 und IL-13 aus Makrophagen, wenn nicht phagozytierbare Biomaterialien im Gewebe persistieren [81]. Sie sind durch eine große Anzahl von Kernen (>20 Kerne pro Zelle) charakterisiert, die sich ungeordnet im Inneren der Zellen verteilen [73] [76]. Im Gegensatz zu Osteoklasten, die nur an Knochensubstanz adhäreren, binden Fremdkörper-Riesenzellen an eine Vielzahl verschiedenster Materialien, die sich sowohl in ihrem hydrophilen bzw. hydrophoben Charakter als auch in ihren physikalischen bzw. chemischen Eigenschaften unterscheiden [74]. Das Ausmaß der Fremdkörper-Reaktion ist dabei von der Oberfläche des Fremdkörpers abhängig [73]. Gewebe, wie es als Gefäßersatz benutzt wird, bewirkt eine große Anzahl von Riesenzellen, während glatte Oberflächen, wie sie beispielsweise bei Brustimplantaten vorkommen, nur eine

geringe Anzahl von Riesenzellen und eine dünne Schicht aus Makrophagen hervorrufen [73]. Neben den chirurgisch in den Körper eingebrachten Fremdmaterialien können auch im Körper gebildete organische Substanzen, z.B. Harnsäurekristalle eine Fremdkörper-Reaktion provozieren [80]. Der Kontakt zwischen Fremdmaterial und zellulären Adhäsionsmolekülen, insbesondere β -Integrinen, führt zu Sekretion von IL-4 und IL-13 und dadurch zur Aktivierung weiterer Integrine [75]. Die initiale Anhaftung der Makrophagen an den Fremdkörper wird hierbei über β 2-Integrine vermittelt, während β 1-Integrine zusätzlich für die interzelluläre Adhäsion verantwortlich sind, zu der zusätzlich noch die STAT6-abhängig verstärkten E-Cadherin und DC-STAMP (*dendrocyte expressed seven transmembrane protein*) beitragen [74] [85]. Zur Familie der β 1-Integrine, die von Monozyten bzw. Makrophagen exprimiert werden, gehören die Fibronectin-Rezeptoren α ₄ β ₁ und α ₅ β ₁ sowie der Laminin-Rezeptor α ₆ β ₁ [85]. Zu den β 2-Integrinen zählen α _L β ₂, α _M β ₂, α _X β ₂ und α _D β ₂, wobei α _L β ₂ und α _D β ₂ hauptsächlich die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln, während an α _M β ₂ und α _X β ₂ eine Vielzahl von Liganden, wie z.B. Fragmente des Komplementfaktors C3, Fibrinogen, Gerinnungsfaktor X oder Kininogen, bindet und dadurch Zell-Partikel- bzw. Zell-Substrat-Interaktionen ermöglicht [85]. Zu Beginn der Zellfusion wird von den Makrophagen zusätzlich der CD44-Rezeptor hochreguliert, dessen intrazelluläre Komponente abgespalten wird, in den Zellkern migriert und dort den NF- κ B-Signalweg aktiviert [74]. Die entstandenen Riesenzellen exprimieren verschiedene Moleküle, darunter HLA-DR, die ihnen die Interaktion mit und die Stimulation von Lymphozyten ermöglichen [81]. Darüber hinaus steigt durch die Fusion einzelner Makrophagen zu mehrkernigen Riesenzellen deren Fähigkeit größere Partikel zu phagozytieren (Abb. 4) [80].

Es gibt Hinweise darauf, dass sich (Langhans-/Fremdkörper-)Riesenzellen im Gegensatz zu Osteoklasten nicht nur durch Fusion zweier verschiedener Zellen bilden, sondern, dass die Mehrkernigkeit zum Teil auf einem Defekt in der Mitose basiert, der Endoreplikation und eine fehlerhafte Zytokinese beinhaltet [82] [86]. Dieser wird durch den TLR-2 ausgelöst und führt zu einer Vervielfältigung der DNA, die durch Lösen der p53-abhängigen Proliferationsblockade polyploider Zellen möglich gemacht und durch Aktivierung der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response* (DDR)) stabilisiert wird [82]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass bakterielle Lipoproteine über den TLR-2 und das Adaptermoleküle MyD88 durch eine veränderte Mitose zur Vervielfältigung des Genoms und über den Transkriptionsfaktor Myc zur Aktivierung der DDR führen [86]. Die DDR sichert zusammen mit der Expression von DNA-Reparatur-Genen die genomische Stabilität der entstandenen mehrkernigen Zellen [82]. Außerdem fanden *Herrrtwich et al.* heraus, dass der über TLR-2-Myc-regulierte Replikationsstress die Progression des Zellzyklus in diploiden Makrophagen-Vorläuferzellen unterdrückt und

p53-Defizienz zu einem verstärkten Auftreten von polyploiden Makrophagen führt [86]. Somit muss das über Jahre verfolgte Konzept von der Fusion als alleinigem Mechanismus der Riesenzellentstehung ergänzt und in weiteren Studien untersucht werden, ob und wie die einzelnen Signalwege der Makrophagen-Differenzierung zusammenhängen, unter welchen Bedingungen es zu deren Aktivierung kommt und welche tatsächlich *in vivo* relevant sind [83].

Sowohl Langhans- als auch Fremdkörper-Riesenzellen entstehen in der Umgebung von Granulomen, die in ihrer einfachsten Form organisierte Ansammlungen von Makrophagen sind [87]. Die Bildung dieser Granulome wird durch verschiedene infektiöse Stoffe und Fremdkörper, aber auch durch entzündliche oder autoimmune Erkrankungen stimuliert [83]. Charakteristischerweise entstehen solche Formationen unter anderem bei der Tuberkulose, der Sarkoidose, dem Morbus Crohn, im Rahmen einer chronischen Uratnephropathie und als Tophus bei der Gicht [83] [88] [89]. Für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Granulomen ist TNF- α ein essentieller Faktor, wobei die genauen Mechanismen bis heute ungeklärt sind [78]. Je nach dem zugrundeliegenden Auslöser setzen sich Granulome aus einem unterschiedlichen Verhältnis an verschiedenen Makrophagen-Untergruppen (epitheloide Makrophagen, Schaumzellen, mono-, bi- und multinukleare Makrophagen, Langhans-Riesenzellen), Lymphozyten (T_H1-, T_H2-, T_H17-, B-, NK-Zellen) sowie aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten zusammen [83] [86]. Eine speziell in Granulomen vorkommende Art von Makrophagen sind die epitheloiden Makrophagen, die phänotypisch eine große Ähnlichkeit zu Epithelzellen aufweisen und wie diese Proteine von Desmosomen (Desmoplakin, Desmoglein, Desmocollin), Adhärens-Kontakten (E-Cadherin, Plakoglobin, α -, β -, δ -Catenin) und Tight junctions (ZO-1, ZO-2) exprimieren, sodass sie eine Grenzfläche ausbilden und das innere Milieu des Granuloms vom umgebenden Gewebe abkapseln können [90]. Das Abkapseln eines bestimmten Fremdkörpers oder Mikroorganismus im Sinne eines Granuloms spiegelt die Unfähigkeit der Makrophagen wider, jene durch Phagozytose und anschließende Lyse abzuräumen [83]. Alle im Granulom vorkommenden Zellen besitzen die Fähigkeit Zytokine (IL-4, IL-13, TGF- β 1, IL-1 β , IL-17A, IFN- γ , evtl. TNF- α) zu sekretieren, die Fibroblasten zur Produktion von Bestandteilen extrazellulärer Matrix anregen und somit den Prozess der Fibrose induzieren können, die durch ein Übergreifen auf das umgebende Gewebe zu einem weit über das Granulom hinausreichenden Gewebeschaden und einer Organdysfunktion führen kann [83]. Dieser durch Granulombildung induzierten Organschädigung steht der potenziell protektive Einfluss der Abkapselung und lokalen Kontrolle einer chronischen Infektion gegenüber, sodass bis heute ungeklärt bleibt, ob sich die Entstehung von Granulomen eher positiv oder negativ auf den Verlauf der diversen granulomatösen Erkrankungen auswirkt [78] [83]. Eine abschließende Beurteilung der Rolle

der Harnsäurekristallgranulome wird auch dadurch erschwert, dass bis heute ein geeignetes Tiermodell der granulomatösen Nephritis nicht verfügbar ist. Die Arbeitsgruppe um Frédéric Preitner hat zwar ein Mausmodell zur akuten Uratnephropathie etabliert [91] [13], allerdings steht ein chronisches Modell nach wie vor nicht zur Verfügung. Letzteres ist aber zur Untersuchung der längerfristigen Rolle der Makrophagen und der Granulomentstehung von entscheidender Bedeutung.

1.3. Zielsetzung

Eine Korrelation zwischen der Hyperurikämie und dem chronischen Nierenversagen (CKD) ist seit langem bekannt [4]. Allerdings konnte bis heute die Frage nach der Kausalität nicht abschließend geklärt werden, insbesondere ob ein erhöhter Harnsäurespiegel zur Progression der CKD beiträgt, wie es epidemiologische und experimentelle Daten nahelegen [31] [33] [34]. Charakterisiert ist diese als chronische Uratnephropathie bezeichnete CKD mit assoziierter Hyperurikämie durch medulläre Harnsäuregranulome, in deren Entstehung verschiedene Makrophagen-Populationen involviert sind und es möglicherweise zur Ausbildung von Riesenzellen kommt. Die genauen Mechanismen der Harnsäuregranulom-Entstehung und deren Auswirkung auf die weitere Progression der CKD sind jedoch bisher nicht verstanden (Abb.5). Die Klärung dieser offenen Fragen wird zudem dadurch erschwert, dass aktuell kein etabliertes Tiermodell für die chronische Uratnephropathie existiert.

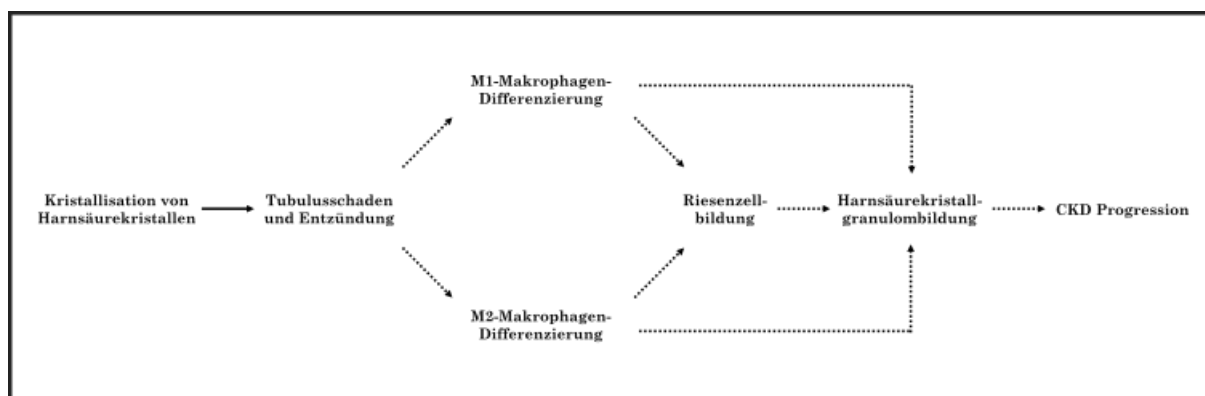


Abbildung 5: Ungeklärte Fragen in der Pathogenese der chronischen Uratnephropathie

Um einige der offenen Punkte zu klären, wurden in dieser Studie folgende Ziele verfolgt:

1. Zu untersuchen, welche Faktoren, z.B. Zytokine, die Bildung von Makrophagen-vermittelten Riesenzellen in vitro fördern.
2. Zu untersuchen, inwiefern eine zugrundeliegende CKD die Bildung renaler Harnsäurekristallgranulome im Tiermodell der chronischen Uratnephropathie begünstigt.
3. Zu testen, ob mittels spezifischer Inhibitoren die Bildung renaler Harnsäurekristallgranulome von proinflammatorischen Makrophagen in Mäusen unterdrückt werden kann, um letztlich die progressive interstitielle Uratnephropathie zu verlangsamen.

2. Material und Methoden

2.1. Tierhaltung

Tiere

Alb-creERT2; *Glut9*^{lox/lox}-Mäuse Mouse Metabolic Facility, Lausanne, CH

Tierhaltung

Einstreu, Espenholz Ssniff Spezialdiäten, Soest, D

Innenliegende Gitterdeckel Techniplast, Hamburg, D

Mouse House, rot Techniplast, Hamburg, D

PSU H-Temp Filterhauben Techniplast, Hamburg, D

PSU H-Temp Käfig Eurostandard Typ II Techniplast, Hamburg, D

Tränkeflaschen Techniplast, Hamburg, D

Futter (s. Tab. 1)

Chow-Futter Ssniff Spezialdiäten, Soest, D

fettreiches Futter (HFD) Ssniff Spezialdiäten, Soest, D

	Zusammensetzung	
Chow	Bruttoenergie (GE)	16,7 MJ/kg
	Umsetzbare Energie (UE)	13,6 MJ/kg
	<i>Rohnährstoffe</i>	
	Trockenmasse	87,9 %
	Rohprotein	22,0 %
	Rohfett	4,5 %
	Rohfaser	3,9 %
	Rohasche	6,8 %
	N freie Extraktstoffe	50,8 %
	Stärke	34,0 %
	Zucker	5,0 %
	<i>Mineralstoffe</i>	
	Calcium	1,00 %
	Phosphor	0,70 %
	Natrium	0,24 %
	Magnesium	0,21 %
	Kalium	1,02 %
	<i>Vitamine</i>	
	Vitamin A	2.000 IU/kg
	Vitamin D ₃	1.000 IU/kg
	Vitamin E	135 mg/kg
	Vitamin K (als MNB)	20 mg/kg

	Thiamin (B ₁)	86 mg/kg	
	Riboflavin (B ₂)	32 mg/kg	
	Pyridoxin (B ₆)	31 mg/kg	
	Cobalamin (B ₁₂)	150 µg/kg	
	Nikotinsäure	145 mg/kg	
	Pantothensäure	60 mg/kg	
	Folsäure	10 mg/kg	
	Biotin	700 µg/kg	
	Cholin-Chlorid	3.130 mg/kg	
	Inositol	100 mg/kg	
	Inosin	25,6 g/kg	
HFD		<i>Masse</i>	<i>Brennwert</i>
	Protein	22 %	17 %
	Kohlenhydrate	35 %	26 %
	Fett	35 %	58 %
	Casein, 80 Mesh	228 g	912 kcal
	DL-Methionin	2 g	8 kcal
	Maltodextrin 10	170 g	680 kcal
	Sucrose	175 g	700 kcal
	Sojaöl	25 g	225 kcal
	Kokosöl, hydriert	33,5 g	3002 kcal
	Mineral Mix S10001	40 g	0 kcal
	Natriumbicarbonat	10,5 g	0 kcal
	Kaliumcitrat, 1 H ₂ O	4 g	0 kcal
	Vitamin Mix V10001	10 g	40 kcal
	Cholin-Bitartrat	2 g	0 kcal
	Inosin	26,3 g	0 kcal
	FD&C Blue Dye #1	0,05 g	0 kcal
	Gesamt	1026,4 g	5567 kcal ≅ 5,4 kcal/g

Tabelle 1: Futterzusammensetzung

2.2. Geräte und Materialien

Durchflusszytometrie/FACS

FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg, D
FACSCanto™ II	BD Bioscience, Heidelberg, D
FACS-Tubes	BD Bioscience, Heidelberg, D

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA-Reader Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, D
---------------------------------	----------------------

Gefrierschnitte

Leica CM3000 – Cryostat	Leica Instruments GmbH, Nussloch, D
-------------------------	-------------------------------------

Adhäsionsobjektträger, SuperFrost®	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tissue Freezing Medium	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, D
<i>Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)</i>	
Abdecktücher, steril, Raucodrape®	Lohmann und Rauscher GmbH & Co KG, Rengsdorf, D
Batterien für NIC-Devices	MediBeacon GmbH, Mannheim, D
Ladegerät für Batterien der NIC-Devices	MediBeacon GmbH, Mannheim, D
Leukoplast® Rollenpflaster	BSN medical GmbH, Hamburg, D
Mulltupfer	Nobamed Paul Danz, Wetter, D
NIC-Kidney Patches 3 x 3 cm	MediBeacon GmbH, Mannheim, D
SurgiVet vaporizer	Smiths Medical, Grasbrunn, D
Transdermaler GFR Monitor	MediBeacon GmbH, Mannheim, D
Vintage Classic Klingen für Rasierhobel	Wilkinson Sword GmbH, Solingen, D
Werkbank mit Chemikalienabzug	Nunc GmbH, Langenselbold, D
<i>Mikroskopie</i>	
Axiocam HR	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, D
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
HE-Färbung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Lichtmikroskop Leitz DM IL	Leica Microsysteme, Solms, D
Lichtmikroskop Zeiss Axioplan 2	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, D
Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA
OptiScan II™	Prior Scientific Instruments Ltd., Cambridge, UK
Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>Pipetten</i>	
Einkanalpipetten 20 µl	Gilson, Middleton, USA
Einkanalpipetten 200 µl	Gilson, Middleton, USA
Einkanalpipetten 1000 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen 20 µl	Peske, Aindling-Arnhofen, D

Pipettenspitzen 200 µl	Peske, Aindling-Arnhofen, D
Pipettenspitzen 1000 µl	Peske, Aindling-Arnhofen, D
Pipettierhilfe Pipetus – classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Serologische Pipetten 5 ml	BD Bioscience, Heidelberg, D
Serologische Pipetten 10 ml	BD Bioscience, Heidelberg, D
Serologische Pipetten 25 ml	BD Bioscience, Heidelberg, D
<i>Real-time PCR</i>	
BioStab PCR Optimizer	Biomol GmbH, Hamburg, D
DirectPCR® Lysis Reagent Tail	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Einbettkassetten	NeoLab, Heidelberg, D
Klebefolie	Roche, Basel, CH
LightCycler 480 Multiwell-Platte 96	Roche, Basel, CH
LightCycler 480 Real-Time PCR System	Roche, Basel, CH
PureLink™ RNA Mini Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
Quali-PCR-Tubes	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, D
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, D
Spektrophotometer NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<i>Waagen</i>	
BP 110 S	Sartorius, Göttingen, D
Mettler PJ 3000	Mettler-Toledo, Greifensee, CH
<i>Zellkultur</i>	
Brutschrank Heraeus Typ B 5060 EC – CO ₂	Heraeus Sepatech, München, D
Gas Incubation System for CO ₂ and O ₂	ibidi GmbH, Martinsried, D
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe, D
Permanox® Chamber Slides™ 1-well	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Permanox® Chamber Slides™ 8-well	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Petrischalen [div Größen]	TPP, Trasandigen, CH
UV-Licht	Bachhofer Laborgeräte, Reutlingen, D
Steril Card Hood Class II Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, ME, USA
Temperature Controller	ibidi GmbH, Martinsried, D
Zellsieb, steril, 70 µm	Corning Science, Kaiserslautern, D

Zentrifugen

Zentrifuge Heraeus, Minifuge T	VWR Internation, Darmstadt, D
Zentrifuge Heraeus, Sepatech Biofuge A	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Centrifuge 5418 C	Eppendorf, Hamburg, D
Universal 16	Hettich, Bäch, CH

2.3. Chemikalien

AccuCheck Counting Beads	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, D
Acrylamid	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Agarose	Invitrogen Ltd., Waltham, USA
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Anti-phospho-Ser/Thr-Pro, MPM-2, Cy5	EMD Millipore Corporation, Temecula, CA, USA
Aqua ad injectabile	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, D
destilliertes Wasser (DNase/RNase frei)	GIBCO/Invitrogen, Paisley, Scotland, UK
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
DNase I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
DNase-free RNase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
dNTP Set	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Essigsäure 99-100 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol 96 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Fetales Bovines Serum (FBS)	Summit Biotechnology, Fort Collins, USA
FITC-Sinistrin	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Formalin 4%	Morphisto GmbH, Frankfurt, DE
Hexanukleotid-Mix	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH,

Hoechst 33342	Schnelldorf, D ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isofluran Forene [®]	Abbott, Wiesbaden, D
Kollagenase	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Low MW DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt, D
Lysing Matrix D, 2 mL Tube	MP Biomedicals, Eshwege, D
Magnesiumchlorid 25 mM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Methylgrün	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumazid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumacetat trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Nuclear Fast Red Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Nycodenz [®]	Axis-Shield Diagnostics Ltd., Dundee, UK
Paraplast [®]	Merck KGaA, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin (PS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
peqGREEN DNA/ RNA Farbstoff	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Periodsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Propidiumiodid (PI)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Proteinase K	Qiagen GmbH, Hilden, D
Pyronin Y	SIGMA-ALDRICH GmbH, Schnelldorf, D
Rasburikase	EBiosciences, San Diego, USA
Ribonuklease A, aus bovinem Pankreas	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Schnelldorf, D
RNA later	Life Technologies, Darmstadt, D
RNase Away [®]	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
RNasin [®]	Promega GmbH, Walldorf, D
RPMI 1640 Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

RPMI 1640 Medium (Phenolrot-frei)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Schiffs Reagenz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Silbernitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Sonnenblumenöl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
SuperScript TM III Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
SybrGreen I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Taq DNA-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt, D
Thioglykolat	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
UltraPure TM DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
VECTASHIELD [®] Hardset Antifade	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, D
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol	Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, UK
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
3,3'-Diaminobenzidine	Merck KGaA, Darmstadt, D
5x Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
6x DNA Loading	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
10x Standard Taq Reaction Puffer	New England BioLabs, Frankfurt, D

2.4. Zytokine und Inhibitoren

Interferon- γ (INF- γ)	Selleck Chemicals, München, D
Interleukin-10 (IL-10)	Selleck Chemicals, München, D
Interleukin-13 (IL-13)	Selleck Chemicals, München, D
Tofacitinib	Selleck Chemicals, München, D
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	Selleck Chemicals, München, D

Recombinant Mouse Soluble RANK Ligand (rm sRANKL)	ImmunoTools, Friesoythe, D
Recombinant Murine Interleukin-4 (rm IL-4) Stattic	ImmunoTools, Friesoythe, D Selleck Chemicals, München, D

2.5. Murine Antikörper für Durchflusszytometrie

CD4-APC	BioLegend, Fell, D
CD8-PE	BioLegend, Fell, D
CD11b-V450	BioLegend, Fell, D
CD11c-PE/Cy7	BioLegend, Fell, D
CD45-PE/Cy5	BioLegend, Fell, D
CD206-FITC	BD Bioscience, Heidelberg, D
Cx3Cr1-PE	BioLegend, Fell, D
F4/80-APC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Gr1-PE/Cy7	BioLegend, Fell, D
Ly6C-PE/Cy7	BioLegend, Fell, D
Ly6G-FITC	BioLegend, Fell, D
MHCII-BV510 (I-A/I-E)	BioLegend, Fell, D
Mouse BD Fc Block TM	BD Bioscience, Heidelberg, D
Zombie NIR-APC/Cy7	BioLegend, Fell, D

2.6. Primer für die qRT-PCR

PCRPrimer (s. Tab. 2)	Metabion, Martinsried, D
-----------------------	--------------------------

Maus Zielgen	Forward-Sequenz (5' - Seq - 3')	Reverse-Sequenz (5' - Seq - 3')
<i>Bax</i>	AGGATGCGTCCACCAAGAAGCT	TCCGTGTCCACGTCAGCAATCA
<i>Cdk 2</i>	TCATGGATGCCTCTGCTCTCAC	TGAAGGACACGGTGAGAATGGC
<i>Cdk 4</i>	CATACCTGGACAAAGCACCTCC	GAATGTTCTCTGGCTTCAGGTCC
<i>Collagen 1</i>	ACATGTTTCAGCTTTGTGGACC	TAGGCCATTGTGTATGCAGC
<i>Cyclin D₁</i>	GCAGAAGGAGATTGTGCCATCC	AGGAAGCGGTCCAGGTAGTTCA
<i>Cyclin E₁</i>	AAGCCCTCTGACCATTGTGTCC	CTAAGCAGCCAACATCCAGGAC
<i>Cyclin E₂</i>	GTACTGTCTGGAGGAATCAGCC	CCAAACCTCCTGTGAACATGCC
<i>Fibronectin 1</i>	GGAGTGGCACTGTCAACCTC	ACTGGATGGGGTGGGAAT
<i>Fsp-1</i>	CAGCACTTCCTCTCTTTGG	TTTGTGGAAGGTGGACACAA
<i>Il-4</i>	ATCATCGGCATTTTGAACGAGGTC	ACCTTGGAAGCCCTACAGACGA
<i>Il-6</i>	TGATGCACTTGCAGAAAACA	ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC
<i>Il-10</i>	CGGGAAGACAATAACTGCACCC	CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
<i>Il-13</i>	AACGGCAGCATGGTATGGAGTG	TGGGTCCTGTAGATGGCATTGC
<i>Jak 1</i>	CTGTCTACTCCATGAGCCAGCT	CCTCATCCTTGTAGTCCAGCAG
<i>Jak 2</i>	GCTACCAGATGGAAACTGTGCG	GCCTCTGTAATGTTGGTGAGATC
<i>Jak 3</i>	AGGTCGTGGATGGTGAGACACA	AACACCAGGTGCGGGTAGGATA
<i>Kim-1</i>	TCAGCTCGGGAATGCACAA	TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT
<i>p21</i>	TCGCTGTCTTGCCTCTGGTGT	CCAATCTGCGCTTGGAGTGATAG
<i>p27</i>	AGCAGTGTCCAGGGATGAGGAA	TTCTTGGGCGTCTGCTCCACAG
<i>Stat 3</i>	AGGAGTCTAACAACGGCAGCCT	GTGGTACACCTCAGTCTCGAAG
<i>Stat 6</i>	ACGACAACAGCCTCAGTGTGGA	CAGGACACCATCAAACCACTGC
<i>Tnf-α</i>	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
<i>18s rna</i>	GCAATTATTCCCATGAACG	AGGGCCTCACTAAACCATCC

Tabelle 2: Oligonukleotidsequenzen der zur Analyse der Genexpressionen verwendeten murinen PCR-Primer.

2.7. Sonstige Materialien

BD Microlance™ 3, 16-30 G

Becton, Dickinson, Franklin Lakes, USA

BD Plastipak™ Blasenspritze 1 ml

Becton, Dickinson, Franklin Lakes, USA

BD Plastipak™ Blasenspritze 2 ml

Becton, Dickinson, Franklin Lakes, USA

BD Plastipak™ Blasenspritze 5 ml

Becton, Dickinson, Franklin Lakes, USA

BD Plastipak™ Blasenspritze 10 ml

Becton, Dickinson, Franklin Lakes, USA

Einwegskalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., JPN
Creatinine FS	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, D
Eppendorf-Tubes 1,5 ml	TPP, Trasadingen, CH
Eppendorf-Tubes 2,0 ml	TPP, Trasadingen, CH
Falcon-Tubes 15 ml	Corning Science, Kaiserslautern, D
Falcon-Tubes 50 ml	Corning Science, Kaiserslautern, D
Glaskapillaren, 32 x 0,8 mm, nicht-heparinisiert	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg, D
Homogenizer ULTRA-TURRAXR T 25 basic	IKA® -Werke GmbH & Co. KG, Fulda, D
Modular paraffin pouring station EC 350	Microm International GmbH, Dreieich, D
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim, D
Pinzette	Angiokard Medizintechnik, Freiburg, D
Pre-Separation Filter (70 mm)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
QuantiChrom™ Uric Acid Assay Kit	BioAssay Systems, Hayward, CA, USA
Rocky-N rocker table	Labortechnik Froebel GmbH, Lindau, D
Semi-Dry-Blotter Trans-Blot® SD	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Sicherheitswerkbank Microflow	Nunc GmbH, Wiesbaden, D
Thermo-Cycler Mastercycler® pro	Eppendorf AG, Hamburg, D
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, D
Tube Roller SRT6	Stuart Equipment, Staffordshire, UK
Urea FS	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, D
vertikaler Rotator	Bachofer GmbH & Co. KG, Weilheim, D
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Wasserbad 1013	GFL mbH, Burgwedel, D
96-well-Plate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
96-well-Plate für Lightcycler	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D

2.8. Software

ImageJ	Wayne Rasband, USA
Prism	Graph Pad, San Diego, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corp., Redmond, USA
R	R Core Team

2.9. Tierhaltung und Vorgehen

In transparenten Kunststoffkäfigen, die durch einen bekletterbaren Gittereinsatz nach oben abgeschlossen waren, wurden bis zu 5 ausgewachsene Mäuse gehalten. Wasser und Futter in Pellet-Form standen jederzeit zur Verfügung. Ausgestattet waren die Käfige zudem mit Holzeinstreu, einem Kunststoffhäuschen als Rückzugsort, sowie Material zum Nestbau.

Die Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes wurden während der Durchführung der Experimente stets eingehalten. Alle Tierversuche wurden im Vorfeld der Studie (AZ: ROB-55.2-2532.Vet_02-15-189) durch die Regierung von Oberbayern auf Grundlage der EU-Richtlinie zum Schutz von Tieren, die zu wissenschaftlichen Zwecken benutzt werden (2010/63/EU), ausdrücklich genehmigt und in Übereinstimmung mit den ARRIVE-Leitlinien gemeldet [92].

2.10. Zellkulturexperimente

2.10.1. Isolierung von Peritonealmakrophagen und deren Kultivierung

Zur Gewinnung der für die Zellkulturexperimente benötigten Makrophagen wurden zunächst einer 6-8 Wochen alten C57BL6/N-Maus 1,5 ml einer „Brewer 4% Thioglycollate“-Lösung intraperitoneal injiziert. Am dritten Tag nach der Injektion wurde die Maus unter möglichst sterilen Bedingungen unter der sterilen Werkbank per zervikaler Dislokation getötet und ihre Bauchdecke eröffnet, wobei eine besondere Vorsicht dem Erhalt der Integrität des Peritoneums galt. Anschließend wurden 5 ml kaltes DPBS in die Peritonealhöhle injiziert und dieses vorsichtig mit den Fingern massiert, um die Makrophagen zu mobilisieren (Abb. 6). Die entstandene Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Spritze abgezogen, in einen 15ml-Falcon-Tube umgefüllt und auf ungefähr 15 ml Gesamtflüssigkeit mit kaltem DPBS aufgefüllt.

In der sterilen Werkbank des Zellkultur-Labors wurde nach der Zentrifugation (360 rcf, 5 Minuten) der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 3 ml 0,155 M Ammoniumchlorid (NH_4Cl) resuspendiert, um sich eventuell im Pellet befindliche Erythrozyten zu lysieren. Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit wurde die Suspension er-

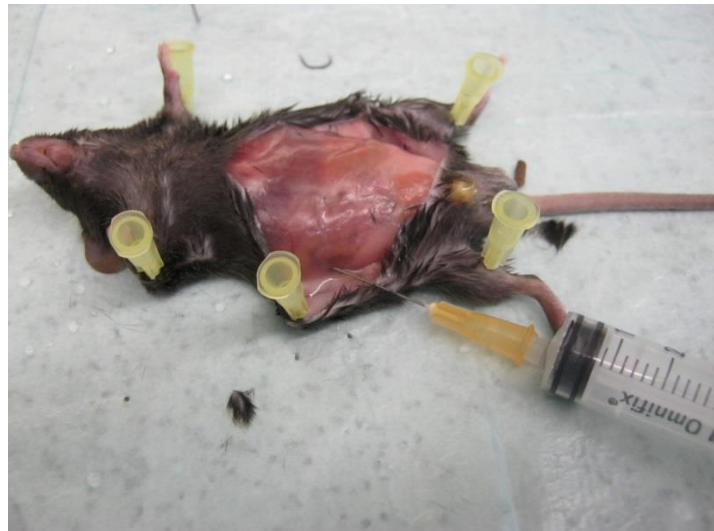


Abbildung 6: Injektion von DPBS in die Peritonealhöhle.

neut mit DPBS auf ca. 15 ml aufgefüllt und wieder zentrifugiert (360 rcf, 5 Minuten). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml RPMI-Medium, das zusätzlich 10% Fetales Bovines Serum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin (PS) enthielt, resuspendiert. Nun wurde unter Verwendung eines Hämozytometers die Gesamtzahl der Makrophagen in der entstandenen Suspension bestimmt.

Ansatz in 1-well-Slides:

Für die Besiedelung der 1-well Permanox® Chamber Slides™ wurden der oben beschriebenen Zellsuspension 500.000 Zellen entnommen, in die Kammer gegeben und auf 3 ml mit RPMI-Medium (+ 10% FBS, + 1% PS) aufgefüllt.

Ansatz in 8-well-Slides:

Für die Besiedelung der 8-well Permanox® Chamber Slides™ wurden aus der oben beschriebenen Zellsuspension in jede Kammer 50.000 Zellen übertragen und auf 400 μl mit RPMI-Medium (+ 10% FBS, + 1% PS) aufgefüllt.

Sowohl den Zellen in den 1-well-Slides als auch denen in den 8-well-Slides wurden je nach Experiment noch verschiedene Zytokine (100 ng/ml) und/oder Inhibitoren (10 ng/ml) zugegeben und die Ansätze für drei Tage im Brutschrank (37°C; 5% CO₂; 90% Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

2.10.2. Isolierung und Differenzierung muriner Knochenmarkszellen

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation unter möglichst sterilen Bedingungen getötet. Um dies zu gewährleisten, wurde in der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank gearbeitet, die zuvor mit sterilen Tüchern ausgelegt worden war. Zusätzlich wurde eine Styroporplatte in ein steriles Tuch eingewickelt. Nach dem Töten einer Maus wurde diese mit dem Bauch nach oben auf die vorbereitete Styroporplatte gelegt und die Vorderpfoten mit 25 G-Nadeln auf der Unterlage befestigt. Mit Hilfe von OP-Schere und Pinzette wurde ein gürtelförmiger Schnitt durch die Haut gesetzt und das Fell abgezogen. Anschließend wurde zuerst das eine, dann das andere Hinterbein im Hüft-, Knie- sowie im Sprunggelenk disloziert und die Knochen von Muskel- bzw. Bindegewebe gereinigt. Die so frei gelegten Femora und Tibiae wurden in eine Petrischale gelegt, die mit inkomplettem RPMI gefüllt war. Den Knochen wurden danach die beiden Enden abgeschnitten und das Knochenmark mittels einer 26 G – Nadel und einer RPMI-gefüllten 5 ml -Blasenspritze herausgespült und in einem 50 ml Falcon Tube aufgefangen. Eventuell sichtbare Zellkonglomerate wurden mit einer 1 ml Pipette homogenisiert, die Zellsuspension anschließend mit inkomplettem RPMI auf 50 ml aufgefüllt und für sieben Minuten bei 360 rcf zentrifugiert.

Die weitere Verarbeitung fand unter sterilen Bedingungen an der Zellkulturarbeitsbank statt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 3 ml komplettem RPMI (enthält 10% Serum und 1% PS) resuspendiert. Durch einen mit RPMI angefeuchteten 70 µm – Filter wurde die Zellsuspension in einen 15 ml Falcon Tube transferiert und mit komplettem RPMI auf 15 ml aufgefüllt. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt mit 360 rcf für fünf Minuten an. Der Überstand wurde wieder verworfen, das entstandene Pellet in 3 ml 0,15 molarem Ammoniumchlorid resuspendiert und 10 Minuten inkubiert. Mit PBS wurde auf 10 ml aufgefüllt und erneut für fünf Minuten bei 360 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml komplettem RPMI resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellkonzentration der Suspension bestimmt und ca. 10 Millionen Zellen in einer 10 cm großen unbeschichteten Petrischale ausplattiert. Mit komplettem RPMI wurde auf

7 ml aufgefüllt und mit 10 ng/ml M-CSF stimuliert und die Zellen im Brutschrank (37°C; 5% CO₂; 90% Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

An Tag 3 und 6 wurden je 7 ml komplettes RPMI und M-CSF (10 ng/ml) zugefügt. An Tag 10 wurden vorsichtig 11 ml altes Medium abpipettiert und durch 11 ml frisches RPMI (+ 10% FCS, + 1% PS) ersetzt, das erneut M-CSF in einer Konzentration von 10 ng/ml enthielt. An Tag 14 fand schließlich die Umsiedelung der Zellen in die 8-well Permanox® Chamber Slides™ statt. Hierzu wurde zunächst das Medium aus der Petrischale in einen 50 ml Falcon-Tube pipettiert. Danach wurden zweimal 5 ml eiskaltes PBS in die Petrischale gegeben, um die Zellen vom Boden zu lösen, und ebenfalls in dem Falcon-Tube gesammelt. Dieser wurde nun bei 360 rcf für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (360 rcf, 5 Minuten) wurde das Pellet in 10 ml inkompletten RPMI resuspendiert und die Konzentration der Zellen in der Suspension mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden je 50.000 Zellen pro Kammer der Permanox® Chamber Slides™ ausgesät und mit Zytokinen (100 ng/ml) und/oder Inhibitoren (10 ng/ml) behandelt. An Tag 17 wurde das halbe Medium durch frisches RPMI bei gleichbleibender Stimulation ersetzt. An Tag 20 war die Differenzierung der Makrophagen so weit abgeschlossen, dass sich weiterführende Analysen anschließen konnten.

2.10.3. Mikroskopische Bestimmung der Anzahl der Zellen und der Kerne

Um die Anzahl der Zellen und der Kerne unter dem Mikroskop zu bestimmen, wurde eine Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 verwendet. Hoechst 33342 färbt spezifisch DNA an, sodass unter dem Fluoreszenzmikroskop insbesondere die Kerne sehr gut sichtbar werden [93]. Bei der Anregung der gefärbten Objekte mit UV-Licht mit einer Wellenlänge zwischen 460 nm und 490 nm kommt es zu einem blau-fluoreszierenden Signal [94].

Der Ansatz und die Behandlung der Makrophagen in den Permanox® Chamber Slides™ sind oben näher beschrieben. Nach der gewünschten Inkubationszeit im Brutschrank wurde aus den einzelnen Kammern das Medium abgesaugt. Die Zellen hafteten zu diesem Zeitpunkt auf dem Permanox® Boden. Durch vorsichtige Handhabung des Saugers konnte sicher verhindert werden, dass sich die Zellen ablösen. Es schloss sich ein Waschschriff an, das heißt es wurden jeder Kammer 500 µl PBS zugegeben und wieder abgesaugt. Danach wurden 500 µl einer verdünnten Hoechst-Lösung (1 µg/ml) hinzugefügt. Um diese Lösung zu erhalten, mussten zuvor 5 µl einer 20 mM Hoechst-Lösung in 5 ml PBS verdünnt werden. Die so behandelten Zellen wurden nun

für 30 min im Brutschrank (37°C; 5% CO₂; 90% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Danach konnten die Kammerbegrenzungen abgerissen und die entstandenen Objektträger kurz in PBS getaucht werden. Anschließend wurden die Zellen für 20 min in 4%iger Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur fixiert und noch einmal mit PBS gespült. Zum Schluss wurde Eindeck-Medium auf die Objektträger gegeben und diese mit einem Deckglas bedeckt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden durch die Verwendung eines passenden Filters die Zellkerne blau fluoreszierend sichtbar und konnten ausgezählt werden. Von jeder Kammer wurden von je sieben verschiedenen Positionen unter Verwendung des 20x-Objektivs Bilder gemacht. Zusätzlich zu den reinen Fluoreszenzbildern wurde von jeder Position ein weiteres Bild gemacht, für das das Fluoreszenzsignal durch die Zuschaltung der sehr schwach eingestellten Lichtquelle des Lichtmikroskops überlagert wurde. Hierdurch konnten zusätzlich zu den Zellkernen die Umrisse der Zellen sichtbar gemacht und die einzelnen Kerne bestimmten Zellen zugeordnet werden.

2.11. Mausmodell zur chronischen Uratnephropathie und Untersuchungstechniken

2.11.1. Modellinduktion

Das Endprodukt des murinen Purinstoffwechsels ist das gut wasserlösliche Allantoin, das über das leberspezifische Enzym Urikase aus der anfallenden Harnsäure gebildet wird. Somit wird der Harnsäurespiegel im Blut niedrig gehalten und Mäuse entwickeln unter physiologischen Bedingungen keine Hyperurikämie. Um dennoch ein Mausmodell für eine chronische Hyperurikämie entwickeln zu können, muss die Umwandlung von Urat in Allantoin verhindert werden. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, besteht in einem leberspezifischen Knockout des Glukose-Transporters 9 (Glut9). Dieser ist für den Transport des Urats in die Hepatozyten notwendig, wo die Harnsäure mit der Urikase in Kontakt kommen kann. Verhindert man nun durch einen Glut9-Knockout, dass Urat in die Hepatozyten gelangen kann, wird gleichzeitig der enzymatische Abbau zu Allantoin unterbunden, da eine direkte Interaktion der Harnsäure mit der Urikase unmöglich gemacht wurde (Abb. 7A). Die Folge ist ein Anstieg des Harnsäurespiegels im Blut der Mäuse auf Werte, die denen des Menschen vergleichbar sind [91].

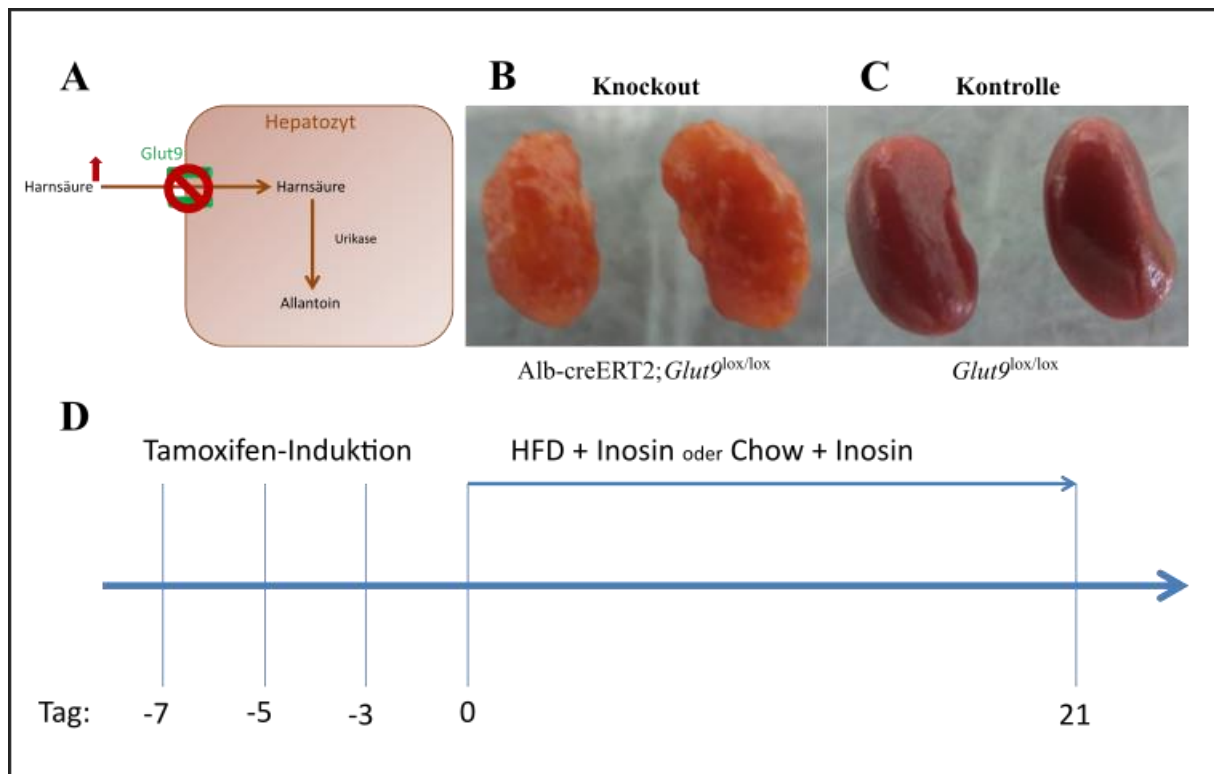


Abbildung 7: Mausmodell der chronischen Uratnephropathie.

Schematische Darstellung der Auswirkung des Glut9-Knockouts (A). Makroskopisches Erscheinungsbild der Nieren der Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse (B) sowie der Kontrolltiere (C) nach 3 Wochen. Schematische Darstellung des Experimentdesigns (D).

Zur Induktion des Knockouts bekamen sechs Wochen alte Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse über eine Woche (jeden zweiten Tag) insgesamt drei i.p.-Injektionen (je 150 μ l) eines Tamoxifen-Mixes. Dieser wurde aus 15 mg Tamoxifen, das in 150 μ l 100%igem Ethanol gelöst wurde, und 1350 μ l sterilem Neutralöl (Mygliol) hergestellt. Als Kontrollgruppe wurden *Glut9*^{lox/lox} Tiere ohne aktive cre-Rekombinase verwendet. Anschließend wurde den Tieren entweder eine Standarddiät (Chow+Inosin), die mit dem Purin Inosin angereichert wurde, verabreicht oder eine fettreiche Diät (HFD+Inosin), die ebenfalls mit dem Purin Inosin angereichert wurde (Abb. 7D). Innerhalb von drei Wochen entwickelten die Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Tiere mit Chow+Inosin eine asymptotische Hyperurikämie ohne Nierenfunktionseinschränkung. Hingegen begünstigte die HFD+Inosin Diät die Entwicklung einer Hyperurikämie mit CKD im Sinne einer chronischen Uratnephropathie (Abb. 7B+C). Die *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltiere, denen entweder eine Chow+Inosin oder HFD+Inosin Diät verabreicht wurde, waren gesund und entwickelten keine Hyperurikämie oder CKD [29].

2.11.2. Transkutane GFR-Messung

Zur Überprüfung der Nierenfunktion wurde die GFR nichtinvasiv an wachen Mäusen bestimmt [29] [95]. Herkömmliche Protokolle benötigen bis zu sieben Blutabnahmen innerhalb von 75 Minuten, um die Clearance des benutzten Markers zu messen und erfordern aufgrund des Stresses ein anschließendes Töten der Tiere. Dieses Vorgehen ist vor allem für die Tiere, aber auch für den Untersucher sehr belastend. Für die Experimente der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Methode benutzt, die von der Arbeitsgruppe von Andrea Schreiber und Daniel Schock-Kusch entwickelt worden ist [96]. Diese ist belastungsärmer als die vorgenannten, sodass sie mehrmals bei derselben Maus eingesetzt und somit die GFR im zeitlichen Verlauf gemonitort werden kann. Zusätzlich konnte mithilfe dieser Methode die Anzahl der benötigten Mäuse reduziert werden. Anstatt nämlich den Abfall der Konzentration des Markers direkt im Serum nachzuweisen, basiert die hier verwendete Methode auf der nichtinvasiven transkutanen Messung der Änderung des Signals des zuvor injizierten Markers Sinistrin. Sinistrin verhält sich wie das weit verbreitete Inulin, das heißt es wird in den Glomeruli frei filtriert und im renalen Tubulussystem weder sekretiert noch rückresorbiert. Um den Abfall der Sinistrin-Konzentration über die Haut messen zu können, ist es mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert. Registriert und aufgezeichnet wird das FITC-Sinistrin-Signal durch eine Messeinheit, die auf dem Rücken der Mäuse befestigt wird. Die Messeinheit, das sogenannte NIC-Device, besteht aus zwei Licht-emittierenden Dioden und einer Photodiode, die das Fluoreszenzsignal von FITC empfängt. Das Emissionsmaximum der beiden Dioden ist für FITC bei 470 nm, die maximale Sensitivität der Photodiode liegt bei 525 nm. Zusätzlich enthält das NIC-Device eine wiederaufladbare Lithium-Batterie und einen Mikrocontroller, auf dem die ermittelten Daten gespeichert werden. Mithilfe der MPD-Lab-Software können diese schließlich über eine Mikro-USB-Verbindung ausgelesen und auf einen Computer übertragen werden. Innerhalb des Bereichs von 7,5 bis 15 mg/100 g Körpergewicht beeinflusst die genaue Menge des injizierten FITC-Sinistrin die Messung nicht, da nur die Abnahme des Signals über die Zeit analysiert wird. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten wurden jeder Maus 100 µl einer FITC-Sinistrin-Lösung (30mg/ml) intravenös gespritzt, was einer Menge FITC-Sinistrin von 10 bis 15 mg/100 g Körpergewicht entspricht.

Zur Vorbereitung der GFR-Messung wurde der Arbeitsplatz unter der sterilen Werkbank mit sterilen OP-Tüchern abgedeckt. Anschließend wurden die Mäuse in der Narkosekammer mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch narkotisiert, sodass nun das Rückenfell der Mäuse mit 70%igem Ethanol angefeuchtet und ein ca. 3 cm x 3 cm großer Bereich, beginnend zwischen

den Schulterblättern, mit einer Rasierklinge rasiert werden konnte Um die Beeinträchtigung der GFR und die Belastung der Mäuse zu minimieren, wurde die dazu notwendige Inhalationsnarkose so kurz und leicht wie nötig dosiert. Begonnen wurde die Narkose mit einem 2%-Isofluran-Sauerstoff-Gemisch, das auf 1,5% reduziert wurde, sobald die Mäuse eingeschlafen waren. Zusätzlich wurde so schnell wie möglich gearbeitet, um eine Reexposition der Mäuse mit dem Narkosegas nach Möglichkeit zu vermeiden. Das NIC-Device wurde mit einer geladenen Batterie verbunden und auf dem fellfreien Areal mittels eines doppelseitigen Klebe-Patches befestigt und mit einem zirkulär verlaufenden Leukoplast-Streifen (ca. 10 cm x 1 cm) gesichert (Abb. 8).

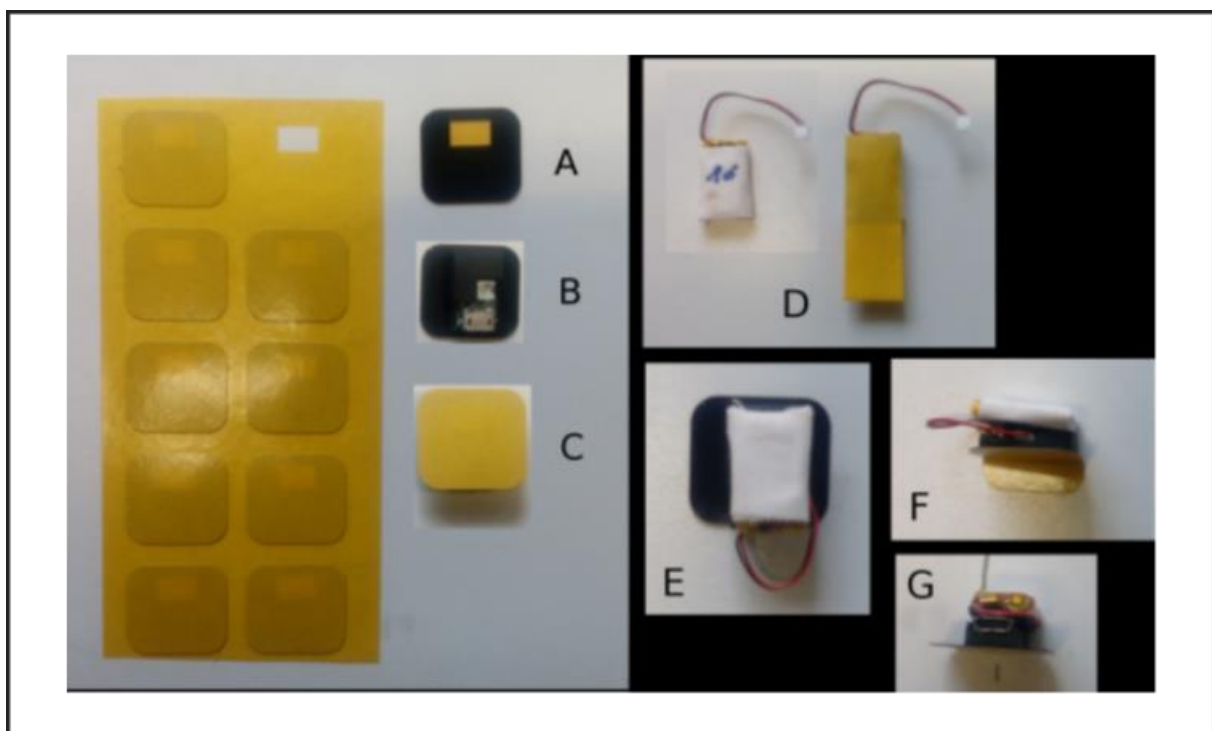


Abbildung 8: Vorbereitung des NIC-Devices.

Anbringen des NIC-Devices auf das doppelseitige Klebe-Patch unter Beachtung des transparenten Fensters für die Dioden (A-C). Konnectieren der aufgeladenen Batterie mit dem NIC-Device und Zusammenkleben der Seitenflächen der beiden Teile (D-G). [97]

Nach einer ca. 15-minütigen Wartezeit zur Aufnahme des Hintergrundrauschens und zur Erholung der Mäuse, wurden jeder Maus 100 μ l der FITC-Sinistrin-Lösung (30 mg/ml) i.v. gespritzt. Über 90 bis 120 Minuten wurden die Mäuse in Einzelkäfige ohne Häuschen, Spielzeug, Futter und Wasser gesetzt, um eine störungsfreie Aufzeichnung des FITC-Signals zu gewährleisten. Nach Ablauf der knapp zwei Stunden wurden die Mäuse in der Narkosekammer erneut narkotisiert, die NIC-Devices vom Rücken der Mäuse entfernt und das Körpergewicht der Mäuse

bestimmt. Schließlich wurden die auf den NIC-Devices gespeicherten Daten mittels der MDP-Lab-Software ausgelesen und auf einen Computer übertragen. Nach dem Einlesen der Daten in die Software öffnet sich ein Diagramm, das die Intensität des Fluoreszenzsignals gegen die Zeit aufträgt. Zunächst musste nun das Hintergrundrauschen als solches markiert, das heißt die sogenannte Baseline oder das Offset bestimmt werden. Anschließend wurde der Start der Analyse bei ungefähr 60% der maximalen Fluoreszenzintensität gewählt und das Ende am Schnittpunkt der Kurve mit der Baseline. Auf der Grundlage dieser Parameter berechnete nun die Software die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von FITC-Sinistrin, das 95%-Konfidenzintervall und das Bestimmtheitsmaß R^2 . Zur Berechnung der GFR aus den Messwerten für die Halbwertszeit und das Körpergewicht der Tiere wurde folgende Formel verwendet:

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

[96] [98] [99] [97]

2.11.3. Messung der Nierenretentionsparameter

Den Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} und *Glut9*^{lox/lox} Mäusen wurde während der Experimente alle sieben Tage Blut abgenommen, um die Nierenretentionsparameter Harnsäure, BUN und Kreatinin zu bestimmen. Nach der Blutabnahme wurden die Blutproben für zwei Stunden bei 37°C inkubiert, um sie vollständig zum Gerinnen zu bringen. Anschließend wurden sie für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und das als Überstand gewonnene Serum in ein neues Eppendorf-Gefäß abpipettiert.

Die Analyse der drei Nierenretentionsparameter basiert auf kolorimetrischen Methoden, d.h. der gesuchte Parameter wird nicht direkt im Serum gemessen, sondern durch die Zugabe einer Reaktionslösung wird eine chemische Reaktion ausgelöst, die zu einem Farbumschlag führt. Dieser kann dann mittels eines ELISA-Readers registriert werden und über die Änderung des Signals und unter Verwendung einer Standardgeraden können die Konzentrationen der gesuchten Nierenwerte bestimmt werden.

Kreatinin-Messung

Zur Messung des Kreatinin-Spiegels im Blut wurde das *Creatinine FS-Kit* von DiaSys verwendet. Die Wirkweise dieses Kits basiert darauf, dass Kreatinin in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure komplexiert und orange-rot ausfällt. Dabei ist die Kreatininkonzentration in der Probe proportional zur Änderung der Absorption.

Zunächst wurde aus vier Teilen Reagenz 1 (NaOH 0,2 mol/l) und einem Teil Reagenz 2 (Pikrin-

säure 20 mmol/l) ein Monoreagenz hergestellt. Dann wurden in einer 96-well-Platte je 10 µl des Probenserums pipettiert. Für die Erstellung einer Standardgerade wurden als Leerprobe 10 µl H₂O und verschiedene Volumina des mitgelieferten Kreatinin-Standards (2 mg/dl) verwendet (s. Ta-

Volumen des Kreatinin-Standards (in µl)	Kreatinin-Konzentration (in mg/dl)
0	0
5	1
10	2
15	3
20	4
25	5

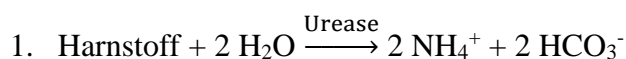
Tabelle 3: Kalibrierungswerte zur Bestimmung der Kreatinin-Standardgerade.

belle 3). 200 µl des Monoreagenz wurden zu den (Standard-) Pro-

ben zugegeben und nach 20 Minuten die Absorption bei 490 nm gemessen. Aus den verschiedenen Standardkonzentrationen und ihrem jeweiligen Absorptionswert wurde anschließend eine Standardgerade erstellt, mit deren Hilfe die Kreatinin-Konzentration in den Serumproben berechnet werden konnte. [100]

BUN-Messung

Für die Messung des Blut-Harnstoff-Stickstoffs (*blood urea nitrogen*, BUN) wurde das *Urea FS-Kit* von DiaSys verwendet. Das Wirkprinzip basiert auf einem enzymatischen UV-Test, katalysiert durch die beiden Enzyme Urease und Glutamatdehydrogenase (GLDH). Registriert wird die Änderung der Absorption, die bei der Umwandlung von NADH in NAD⁺ entsteht. Diese ist proportional zur BUN-Konzentration in der Probe.



Zunächst wurde aus vier Teilen Reagenz 1 (TRIS 150 mmol/l, 2-Oxoglutarat 9 mmol/l, ADP 0,75 mmol/l, Urease ≥ 7 kU/l, Glutamatdehydrogenase ≥ 1 kU/l) und einem Teil Reagenz 2 (NADH 1,3 mmol/l) ein Monoreagenz hergestellt. Anschließend wurden je 2 μ l der Probenserien in eine 96-well-Platte pipettiert. Für die Erstellung einer Standardgerade wurden als Leerprobe 2 μ l H₂O und verschiedene Volumina des mitgelieferten Standards (50 mg/dl) verwendet (s. Tabelle 4). 200 μ l Monoreagenz wurden zu den (Standard-)Proben zugegeben, für 60 Sekunden bei 25°C inkubiert und anschließend die Absorption A1 bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Volumen des BUN-Standards (in μ l)	BUN-Konzentration (in mg/dl)
0	0
2	50
4	100
6	150
8	200

Tabelle 4: Kalibrierungswerte zur Bestimmung der BUN-Standardgerade.

Nach weiteren 60 Sekunden wurde die Absorption A2 gemessen. Die für die Berechnung benötigten Werte ΔA ergaben sich aus der Differenz von A1 und A2 ($\Delta A = A1 - A2$). Aus den verschiedenen Standardkonzentrationen und ihrem jeweiligen Absorptionswert wurde anschließend eine Standardgerade erstellt, mit deren Hilfe die BUN-Konzentration in den Serumproben berechnet werden konnte. [101]

Harnsäure-Messung

Der Harnsäure-Spiegel wurde mittels des QuantiChrom™ *Uric Acid Assay Kit* von BioAssay Systems bestimmt. Dieses Kit basiert auf einer kolorimetrischen Methode. In der Anwesenheit von Harnsäure bildet zugegebenes 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazin mit Eisen Komplexe, die blaugefärbt ausfallen. Die Änderung der Extinktion ist proportional zur Harnsäurekonzentration in der Probe.

Aus zehn Teilen Reagenz A und je einem Teil Reagenz B und Reagenz C wurde ein Monoreagenz hergestellt. Je 5 μ l der mitgelieferten Leer- und Standardproben (10 mg/dl), sowie der Probenserien wurden in eine 96-well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 200 μ l der Monoreagenz zugegeben, vorsichtig vermischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 570 nm gemessen. Die Harnsäure-Konzentration der Probeserien wurde aus den gemessenen Werten mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{ODProbe - ODLeerprobe}{ODStandard - ODLeerprobe} * 10 \text{ mg/dl}$$

[102]

2.11.4. Anfertigung von Gefrierschnitten

Den toten Mäusen wurden die Nieren entnommen, in mit *Tissue Freezing Medium* gefüllte 1,5 ml - Eppendorf-Tubes gegeben und bei -80°C weggefroren. Einen Tag vor der Anfertigung der Gefrierschnitte wurden die Proben auf -20°C erwärmt. Die Schnitte wurden mit dem Kryotom Leica CM3000 – Cryostat erzeugt. Für das Schneiden des Nierengewebes wurden ein OT-Wert (*object temperature*) von -21°C, ein CT-Wert (*chamber temperature*) von -25°C und eine Schichtdicke von 3 µm eingestellt. Mit Hilfe einer Rasierklinge wurden die Proben von überstehendem *Tissue Freezing Medium* befreit, sodass quaderförmige Blöcke entstanden. Diese wurden auf die Probenhalter gelegt und mit *Tissue Freezing Medium* überzogen. Nach ca. 5 Minuten waren die Proben über das *Tissue Freezing Medium* an den Probenhalter festgefroren und der eigentliche Schneidevorgang konnte beginnen. Die erzeugten Nierenschnitte wurden auf einen Objektträger aufgezogen und für mindestens 10 min luftgetrocknet.

Ein Teil der Schnitte wurde anschließend unfixiert bei -20°C weggefroren. Für die Herstellung von fixierten Schnitten wurden die Objektträger mit den Proben nach dem Lufttrocknen für 10 Minuten in einem 1:1 Gemisch aus Aceton und Methanol gebadet, erneut luftgetrocknet und anschließend bei -20°C eingefroren.

Je nach Erfordernis wurden die Schnitte u.a. mit HE gefärbt oder ungefärbt unter dem Polarisationsmikroskop betrachtet.

2.11.5. Auswertung der histologischen Schnitte

Die Nieren der Mäuse wurden nach der Entnahme in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden histologische Schnitte angefertigt und mit HE (Hämatoxylin-Eosin), PAS (*Periodic Acid-Schiff Reaction*), Pikro-Siriusrot oder Silber gefärbt.

Auf den HE-gefärbten Schnitten wurde die Anzahl der Granulome pro Schnitt ermittelt. Anhand der Silber- und Pikro-Siriusrot gefärbten Schnitte wurde der Grad der Fibrosierung als Anteil des fibrotisch durchsetzten Gewebes am Gesamtgewebe bestimmt.

PAS-(Injury-) Score	Anteil in Prozent
0	0-10
1	11-20
2	21-40
3	41-60
4	61-80
5	81-100

Tabelle 5: Darstellung des PAS-(Injury-)Scores.

Mit Hilfe der PAS-gefärbten Schnitte wurde der PAS-Score erhoben. Dieser setzt sich aus

drei Rubriken zusammen, dem Anteil an Nekrosearealen, dem Grad der Cast-Ablagerungen in den Tubuli und dem Grad der Dilatation der Tubuli. Jeder Gewebeschnitt wurde unter jeder Rubrik bewertet und der Anteil der Schädigung in Prozent bestimmt. Anschließend wurde für jeden Schnitt der Mittelwert aus den Werten aller drei Rubriken berechnet und der PAS-Score aus nebenstehender Tabelle ermittelt (Tabelle 5).

2.12. qRT-PCR

2.12.1. RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde das PureLink[®] RNA Mini Kit verwendet. Dem Waschpuffer II wurden 60 ml 100%iges Ethanol zugegeben, dem Lyse-Puffer 10 µl 1%iges β-Mercaptoethanol pro 1 ml gelieferten Lyse-Puffer.

Analyse von Makrophagen

Da für die RNA-Isolierung eine große Menge an Makrophagen benötigt wird, wurden 500.000 Zellen pro Kammer in 1-well Permanox[®] Chamber Slides[™] kultiviert. Der Ansatz und die Behandlung erfolgten wie weiter oben beschrieben. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde der Überstand aus den Kammern abgesaugt und 300 µl fertiger Lyse-Puffer für 3 Minuten zugegeben. Anschließend wurde die Suspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube transferiert und in die Kammern je 300 µl 70%ige Ethanol-Lösung zugegeben. Auch die Ethanol-Lösung mit den restlichen Zellfragmenten wurde nun in dieselben Eppendorf-Tubes pipettiert und die entstandene Suspension gut vermischt. Diese 600 µl Probensuspension wurden nun in eine *spin cartridge* pipettiert, die sich in einem Sammeltube befand. Danach wurden die Proben bei

12.000 x g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert und das im Sammeltube aufgefangene Material verworfen.

Analyse von Nieren- oder Herzgewebe

600 µl des fertigen Lyse-Puffers wurden in 2 ml Eppendorf-Tubes pipettiert und anschließend je ein Stück des zu untersuchenden Gewebes zugegeben. Im Homogenisator wurde daraus in 10-40 Sekunden eine homogene Suspension hergestellt, verbliebene größere Gewebestücke bei 8.000 rpm und 4°C für 8 Minuten abzentrifugiert. 500 µl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorf-Tube transferiert und mit derselben Menge 70%igen Ethanol gut vermischt. Maximal 700 µl dieser Probensuspension wurden nun in eine *spin cartridge* pipettiert, die sich in einem Sammeltube befand. Anschließend wurden die Proben bei 12.000 x g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert und das im Sammeltube aufgefangene Material verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis das gesamte Proben-Ethanol-Gemisch verarbeitet worden war.

Weitere Verarbeitungsschritte für Nieren- bzw. Herzgewebe und Makrophagen

Nun wurden 700 µl des Waschpuffer I in die *spin cartridge* pipettiert und die Tubes erneut bei 12.000 x g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dann wurden die *spin cartridges* in neue Sammel tubes umgesteckt, je 500 µl des mit Ethanol versetzten Waschpuffer II zugegeben und mit den oben genannten Einstellungen für 30 s zentrifugiert. Nach der erneuten Zugabe von 500 µl Waschpuffer II und anschließender Zentrifugation wurden die Sammel tubes geleert. Danach wurden die *spin cartridges* für 2 Minuten bei 12.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, um die Membranen mit der gebundenen RNA zu trocknen. Anschließend wurden die Sammel tubes verworfen und die *spin cartridges* in Eppendorf-Tubes überführt. Nach der Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser wurden die Proben 1 min inkubiert und danach für 2 Minuten bei 12.000 x g und Raumtemperatur in die Eppendorf-Tubes abzentrifugiert. Die im Wasser gelöste RNA wurde nun entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C weggefroren.

2.12.2. Konversion von RNA in cDNA

Die nach der im vorherigen Kapitel beschriebenen Methode gewonnene RNA musste zur Weiterverwendung in die stabilere cDNA transkribiert werden. Der RNA-Gehalt der Proben wurde mit dem Nano-Drop bestimmt, 1 µg RNA entnommen und in einem Eppendorf-Tube mit RNase-freiem Wasser auf 15 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach der Zugabe von 2,45 µl Master-Mix (Tabelle 6), wurden die Proben gut gemischt und für 1,5 Stunden bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Transkriptase bei 90°C für 5 Minuten inaktiviert, die gekühlte cDNA mit Wasser 1:10 verdünnt und direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

<i>Master-Mix (für 1 Tube)</i>	
Chemikalie	Volumen in µl
5x Puffer	4,50
DTT	1,00
dNTPs	0,45
Rnasin (RNase-Inhibitor)	0,50
Acrylamid	0,25
Hexanukleotid-Mix	0,25
Superscript (cTranskriptase)	0,50

Tabelle 6: Zusammensetzung des cDNA-Master-Mix.

2.12.3. qRT-PCR

Die quantitative Echtzeit Polymerasen-Kettenreaktion (real time quantitative Polymerase chain reaction; qRT-PCR) wurde von Kary B. Mullis zur Vervielfältigung von DNA entwickelt [103]. Die Grundlage der PCR sind die drei Schritte Denaturierung, Annealing und Amplifikation (Tabelle 7).

	Temperatur (in °C)	Dauer	
Vorabdenaturierung	95	5 min	
Denaturierung	95	15 s	45 Zyklen
Annealing	60	45 s	
Amplifikation	72	30 s	
Schmelzkurve	95	5 s	
	schrittweise Steigerung von 65 auf 95	10 min	

Tabelle 7: Übersicht über die verschiedenen Schritte der qRT-PCR.

Zunächst wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 95°C in die beiden Einzelstränge aufgetrennt, d.h. denaturiert. Das Reaktionsgemisch wird anschließend auf 60°C abgekühlt, so dass sich Primer an die komplementären DNA-Stränge anlagern können (Annealing). Primer sind kurze, komplementär zum Matrizenstrang synthetisierte DNA-Sequenzen. Diese werden nun im nächsten Schritt, der Amplifikation, von der hitzestabilen Taq-Polymerase zum Start der Synthese eines erneuten DNA-Doppelstranges benötigt (72°C). Diese Abfolge wird nun so oft wiederholt, bis genügend DNA-Material produziert worden ist, in der Regel werden 40-45 Zyklen durchlaufen. [103]

Die qRT-PCR erlaubt in Echtzeit eine Quantifizierung der DNA. Hierfür wird ein Fluoreszenzfarbstoff benötigt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde SybrGreen I verwendet, das sich als Interkalans in doppelsträngige DNA einlagert. Durch die Bindung an DNA steigt die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes deutlich an, d.h. die Fluoreszenzintensität ist proportional zum Gehalt an doppelsträngiger DNA. Wichtig für die Quantifizierung ist nun ein Schwellenwert, der den Wert angibt, bei dem sich das Fluoreszenzsignal deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Für jede Probe wird nun der sog. CT-Wert (*Cycle Threshold*) bestimmt, d.h. die Anzahl der Zyklen, die für das Überschreiten des Schwellenwertes benötigt werden. Für die Auswertung wurden nur CT-Werte bis einschließlich 35 Zyklen verwendet. Um eine relative Quantifizierung des DNA-Gehalts vornehmen zu können wurden alle Ergebnisse auf das Housekeeping-Gen *18s rrna*, das in allen Proben gleichmäßig vorhanden ist, als Referenz bezogen.

Nachdem 40 Zyklen durchlaufen worden sind, wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Hierzu wurden die Proben langsam von 65°C auf 95°C erhitzt. Dadurch kommt es nach und nach zu einer Denaturierung der DNA-Doppelstrangfragmente und somit zu einem Herauslösen von SybrGreen I, was eine Änderung des Fluoreszenzsignals nach sich zieht. Da die Temperatur, bei der die Denaturierung der Fragmente stattfindet, von den beteiligten Basen und den ausgebildeten chemischen Bindungen abhängig ist, gibt es zwischen den einzelnen DNA-Fragmenten Unterschiede in der Höhe der Schmelztemperatur. Somit kann über die Schmelzpunktanalyse die Spezifität der Bindung der verwendeten Primer an die komplementäre DNA-Sequenz überprüft werden. Als Negativprobe zum Ausschluss einer Kontamination wurde destilliertes Wasser verwendet. In die Analysen gingen ausschließlich Proben mit negativer Negativprobe ein.

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit der LightCycler 480 von Roche verwendet. In einer 96-well Platte wurden in jedes well 18 µl Master-Mix (Tabelle 8) pipettiert und 2 µl der 1:10 verdünnten Proben-cDNA zugegeben. Die Platte wurde mit einer Folie abgedeckt, mit 8.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und die PCR mit dem Light Cycler für 45 cps gestartet.

<i>Master-Mix (für 1 Tube)</i>	
Chemikalie	Volumen in µl
Primer R (1:10)	00,60
Primer L (1:10)	00,60
SybrGreen I (2x)	10,00
Taq Polymerase	00,16
H ₂ O (RNase-frei)	06,64

Tabelle 8: Zusammensetzung des qRT-PCR-Master-Mix.

[104]

2.13. Durchflusszytometrie

2.13.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activating cell sorting*) ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellsuspensionen. Dabei werden die Zellen durch einen Laser angeregt und anschließend die Lichtstreuung für die Größe und Granularität registriert. Über das vorherige Anfärben der Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen oder Antikörpern können zudem weitere (phänotypische) Eigenschaften bestimmt werden. [105]

2.13.2. Zellzyklus-Analyse mit der Durchflusszytometrie

Grundlage der Analyse des Zellzyklus mit Hilfe des FACS-Geräts ist der unterschiedliche DNA-Gehalt der Zellen im Verlauf des Zyklus. Während bei Zellen in der G₀/G₁-Phase die DNA in einfacher Kopie vorliegt, enthalten Zellen, die sich in der G₂/M-Phase befinden den doppelten DNA-Gehalt. Die Zellen in der S-Phase, in der die DNA synthetisiert wird, enthalten eine Menge DNA, die sich zwischen dem einfachen und dem doppelten DNA-Gehalt befindet. Wird die DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff, z.B. Propidiumiodid (PI), angefärbt, kann das Signal mit einem FACS-Gerät registriert werden. Da die Zellen der G₂/M-Phase den doppelten DNA-Gehalt besitzen, ist folglich die Intensität des registrierten PI-Signals ebenfalls doppelt

so hoch wie das der Zellen in der G0/G1-Phase, das Signal der Zellen in der S-Phase befindet sich dazwischen (Abb. 9). [106]

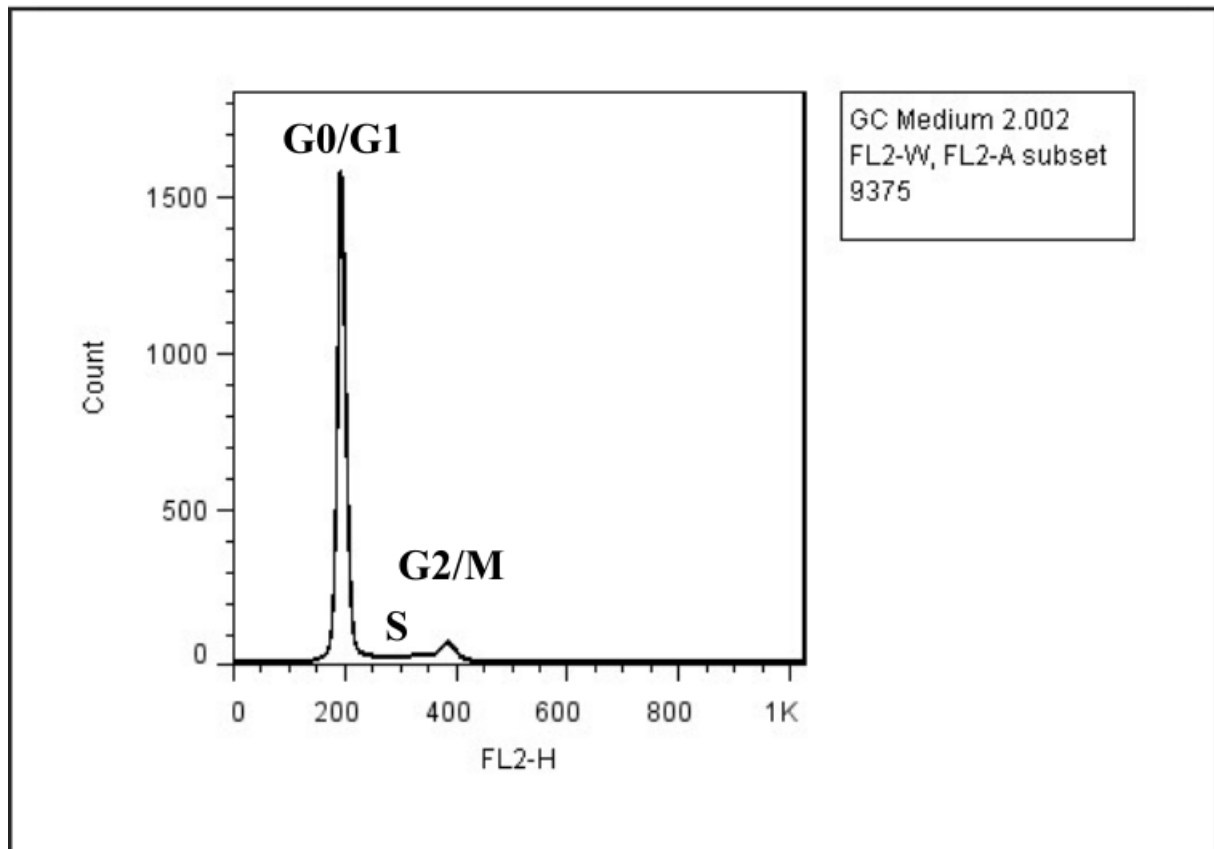


Abbildung 9: Histogramm für die Analyse des Zellzyklus.

Aufgetragen ist die Anzahl der Ereignisse gegen die Intensität des PI-Signals. Der Peak bei 200 entspricht der G0/G1-Phase, der Peak bei 400 der G2/M-Phase. Zur S-Phase werden alle Ereignisse gezählt, die zwischen den beiden Peaks liegen.

Analysiert werden sollten Makrophagen, die in unterschiedlichen Ansätzen eine je andere Behandlung erfahren hatten, das heißt zunächst mussten die Makrophagen wie oben beschrieben isoliert und in 8-well-Slides inkubiert werden (s. 2.10.1.). Nach einer dreitägigen Inkubationszeit im Brutschrank wurde in der Sicherheitswerkbank das Medium vorsichtig aus den Kammern abgesaugt, so dass die Makrophagen, die in der Zwischenzeit am Boden adhärirt hatten, in den Kammern zurückblieben. Anschließend wurden in jede Kammer 500 µl DPBS pipettiert und die Ansätze für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dem Absaugen wurden 100 µl/Kammer einer EDTA-Lösung zugegeben, die durch die Verdünnung von 0,5 M EDTA in einem Verhältnis von 1:20 mit DPBS hergestellt worden war. Nun mussten die Slides noch für ca. 24 Stunden in den Kühlschrank (4°C). Durch diese Behandlung wurde sichergestellt, dass sich die Makrophagen wieder vom Boden der Kammern abgelöst hatten und die entstandenen Zellsuspensionen in die FACS-Tubes transferiert werden konnten. Diese wurden

nun zentrifugiert (200 x g; 10 Minuten; 4°C) und der Überstand abgegossen. Das Zellpellet wurde in der Folge in 200 µl PI/Triton X-100-Färbelösung (5 ml DPBS; 5 µl Triton X-100; 50 µl DNase-free RNase A; 300 µl PI-Lösung (500 µg/ml)) resuspendiert. Die so entstandene Suspension wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach auf Eis gelegt. Kurz vor Beginn der Analyse mit dem Durchflusszytometer wurde den Proben noch 50 µl AccuCheck Counting Beads-Lösung zugegeben, um die absolute Anzahl an Zellen zu bestimmen. [107]

Für die Durchflusszytometrie wurde der FACSCalibur™ verwendet, als Software das Programm CellQuest™Pro. In diesem wurden vier Diagramme benötigt, zwei Punktdiagramme und zwei Histogramme. Im ersten Punktdiagramm wurde die Vorwärtsstreuung (*Forward Scatter*, FSC) gegen die Seitwärtsstreuung (*Side Scatter*, SSC) aufgetragen, im zweiten die Transitzeit (*Width*, FL2-W) gegen die gesamte Fluoreszenz (*Area*, FL2-A) der einzelnen Zellen. In den Histogrammen entsprach die X-Achse der maximalen Intensität des Fluoreszenz-Signals (*Height*, FL2-H) beziehungsweise der gesamten Fluoreszenz (FL2-A), die Y-Achse bei beiden Diagrammen der Anzahl der Zellen. Um avitale Zellen, Zelldebris und Zellaggregate von der Analyse auszuschließen, wurde in den beiden Punktdiagrammen je ein Fenster, ein sog. Gate gesetzt. So tauchten im zweiten Punktdiagramm (FL2-W vs. FL2-A) nur Zellen auf, die sich innerhalb des Gates im ersten Punktdiagramm (FSC vs. SSC) befanden. Die beiden Histogramme enthielten nur Ereignisse, die innerhalb des Gates im zweiten Punktdiagramm registriert wurden. Gestoppt wurde die Analyse, sobald im zweiten Gate 10.000 Ereignisse erreicht worden waren. [106]

2.13.3. Bestimmung des Makrophagen-Typs mit der Durchflusszytometrie

Den toten Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} und *Glut9*^{lox/lox} Mäusen wurden die Nieren entnommen und anschließend wurde die Nierenkapsel vorsichtig entfernt. Nun wurden die Nieren in die Vertiefungen einer 12-well Platte gelegt und je 2 ml einer Kollagenase/DNase 1 – Lösung zugegeben. Diese wurde zuvor aus 10 ml PBS, 200 µl DNase und 20 mg Kollagenase hergestellt. Mit dem Stempel einer 1 ml – Blasenspritze wurde das Nierengewebe mit der Lösung homogenisiert und das Gemisch für 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde zunächst mit einer 2 ml – Blasenspritze und aufgesetzter 20 G - Nadel, dann mit einer 26 G – Nadel das Gemisch weiter homogenisiert und gröbere Gewebestücke wurden zerkleinert. Anschließend wurde das verdaute Gewebe durch einen angefeuchteten 70 µl – Filter in ein 15 ml Falcon Tube filtriert und mit kaltem PBS auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Die Tubes wurden bei 1.500 rpm

für sechs Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert. Es schloss sich ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 1.500 rpm für fünf Minuten an. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1.200 µl kaltem PBS resuspendiert.

Es wurden je 1 µl Zombie NIR-APC/Cy7 zu allen Proben hinzugegeben und diese im Dunkeln für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 500 µl FACS-Puffer wurden zugegeben und die Proben bei 1.200 rpm für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden je 1 µl FcR Block (CD16/CD32) zugegeben und die Proben für fünf Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der Zugabe

des Master Mixes (Tabelle 9) erfolgte die erneute Inkubation für 25 Minuten bei 4°C. Ein zweites Mal wurden 500 µl FACS-Puffer zugegeben und die Proben bei 1.200 rpm für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Bis zur Messung mit dem FACSCanto™II wurden die Proben bei 4°C im Dunkeln gelagert. Neben den eigentlichen Proben wurden parallel die Kontrollen zur Kalibrierung des FACSCanto™II vorbereitet, wobei jeder Antikörper zu je 100 µl des Nierengemischs zugegeben wurde.

<i>Master Mix (für 1 Probe)</i>	
Antikörper	Volumen (in µl)
CD206-FITC	2,0
Cx3Cr1-PE	1,4
CD45-PE/Cy5	1,0
F4/80-APC	5,0
Gr1-PE/Cy7	1,0
CD11b-V450	1,0
MHCII-BV510 (I-A/I-E)	1,0

Tabelle 9: Zusammensetzung des AK-Master Mix.

2.14. Statistische Methoden

Alle in vivo und in vitro Daten wurden, sofern nicht anders vermerkt, graphisch als Mittelwert angegeben. Die Fehlerbalken bezeichnen den *standard error of the mean* (SEM), der als Quotient aus der Standardabweichung und der Quadratwurzel der Anzahl der Proben berechnet wird. Der Kolmogorov-Smirnov Test wurde angewandt, um eine Normalverteilung der Daten zu ermitteln. Als statistischer Test zum Vergleich zweier unterschiedlicher Gruppen mit Normalverteilung wurde der unverbundene Student's T-Test verwendet. Zur Analyse mehrerer Gruppen wurde die Einweg-Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit Tukey's post-doc Test genutzt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden in drei verschiedene Signifikanzgruppen

eingeorndet, die durch eine unterschiedliche Anzahl an Sternen markiert wurden (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Beim T-Test gibt es mit **** $p < 0,0001$ ein zusatzliches Signifikanzniveau. Ein p-Wert kleiner 0,05 ist als statistisch signifikant definiert und darf auch angenommen werden, wenn im Fließtext ein „signifikanter Unterschied“ benannt wird.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zur Makrophagen-vermittelten Riesenzellbildung

Abhängig von der Mikroumgebung können Makrophagen in unterschiedliche Phänotypen differenzieren und somit entweder eine Gewebeentzündung fördern oder lindern. Dabei spielen die Zytokine TNF α , IL-10, IL-4 sowie IL-13 eine entscheidende Rolle (s. 1.2.2.). Das Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, inwiefern diese Zytokine die Bildung von Makrophagen-vermittelten Riesenzellen *in vitro* beeinflussen. Hierfür wurden Makrophagen aus dem Peritoneum von Mäusen isoliert bzw. Knochenmarkzellen in Makrophagen differenziert und in Permax® Chamber Slides™ kultiviert (s. 2.10.). Anschließend wurden die Makrophagen je nach Versuchsansatz mit den Zytokinen TNF α , IL-10, IL-4, IL-13 mit und ohne Inhibitoren stimuliert. Nach drei Tagen wurden Analysen hinsichtlich Riesenzellbildung, Zellzyklus und Genexpression mittels Mikroskopie, Durchflusszytometrie und RT-qPCR durchgeführt.

3.1.1. Untersuchungen zur Riesenzellbildung bei Peritonealmakrophagen

3.1.1.1. Tofacitinib inhibiert die IL-4-vermittelte Riesenzellbildung bei Peritonealmakrophagen

Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass Makrophagen nach Stimulation mit IL-4 signifikant mehr Riesenzellen bilden als im Vergleich zu Medium, TNF α und IL-10. Dies galt sowohl für die kleineren Riesenzellen mit drei Kernen als auch für die größeren Riesenzellen. Dementsprechend geringer fiel unter IL-4-Stimulation der Anteil der Zellen mit bis zu zwei Kernen aus. Dagegen bewirkte weder eine Stimulation mit IL-10 noch mit TNF- α eine signifikante Änderung im Anteil der drei Gruppen (Abb. 10).

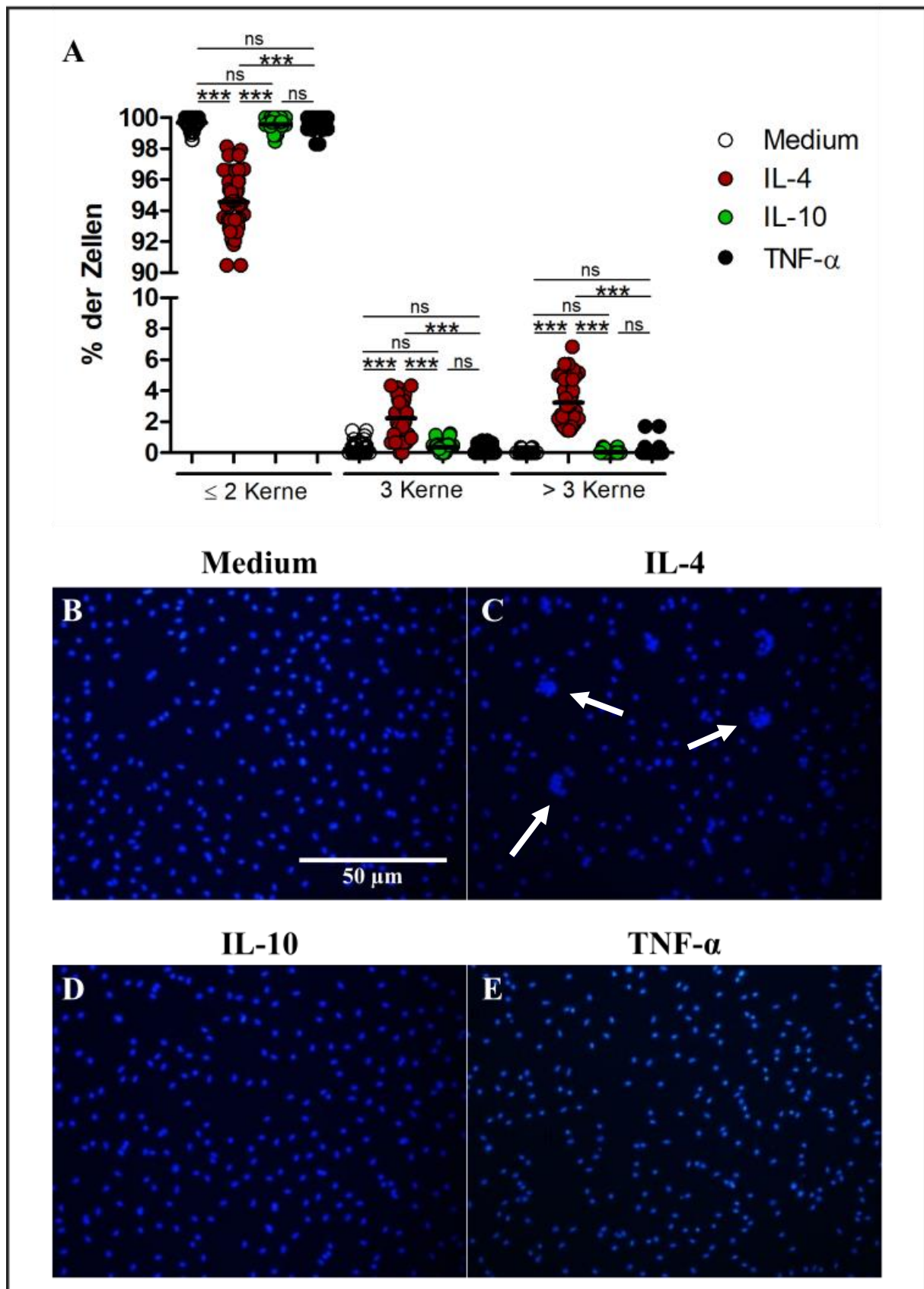


Abbildung 10: Die Stimulierung mit IL-4 bewirkt die Ausbildung von Riesenzellen bei Peritonealmakrophagen. Anzahl der Zellen mit ≤ 2 , 3 und > 3 Kernen ohne Stimulation oder unter Stimulation mit IL-4, IL-10 bzw. TNF- α . Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM von acht unabhängigen Experimenten dar (A). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). Repräsentative Bilder der Versuchsansätze unter der Verwendung des 20x-Objektivs als reine Fluoreszenzmikroskopie (B-E). Medium (B), IL-4 (C), IL-10 (D), TNF- α (E) (Weiße Pfeile = Riesenzellen).

Um zu testen, inwiefern die IL-4-vermittelte Riesenzellbildung inhibiert werden kann, wurden IL-4-aktivierte Makrophagen mit dem JAK/STAT-Inhibitor Tofacitinib inkubiert. Fluoreszenzmikroskopie verdeutlicht, dass die Gabe von Tofacitinib die Bildung von IL-4-vermittelten Riesenzellen unterdrückt im Vergleich zu IL-4-aktivierten Zellen (Abb. 11). Der Anteil der Riesenzellen blieb unter der alleinigen Zugabe von Tofacitinib zum Medium niedrig und sank unter gleichzeitiger Stimulation mit IL-4 in beiden Riesenzellgruppen auf das Medium-Niveau ab (Abb. 11).

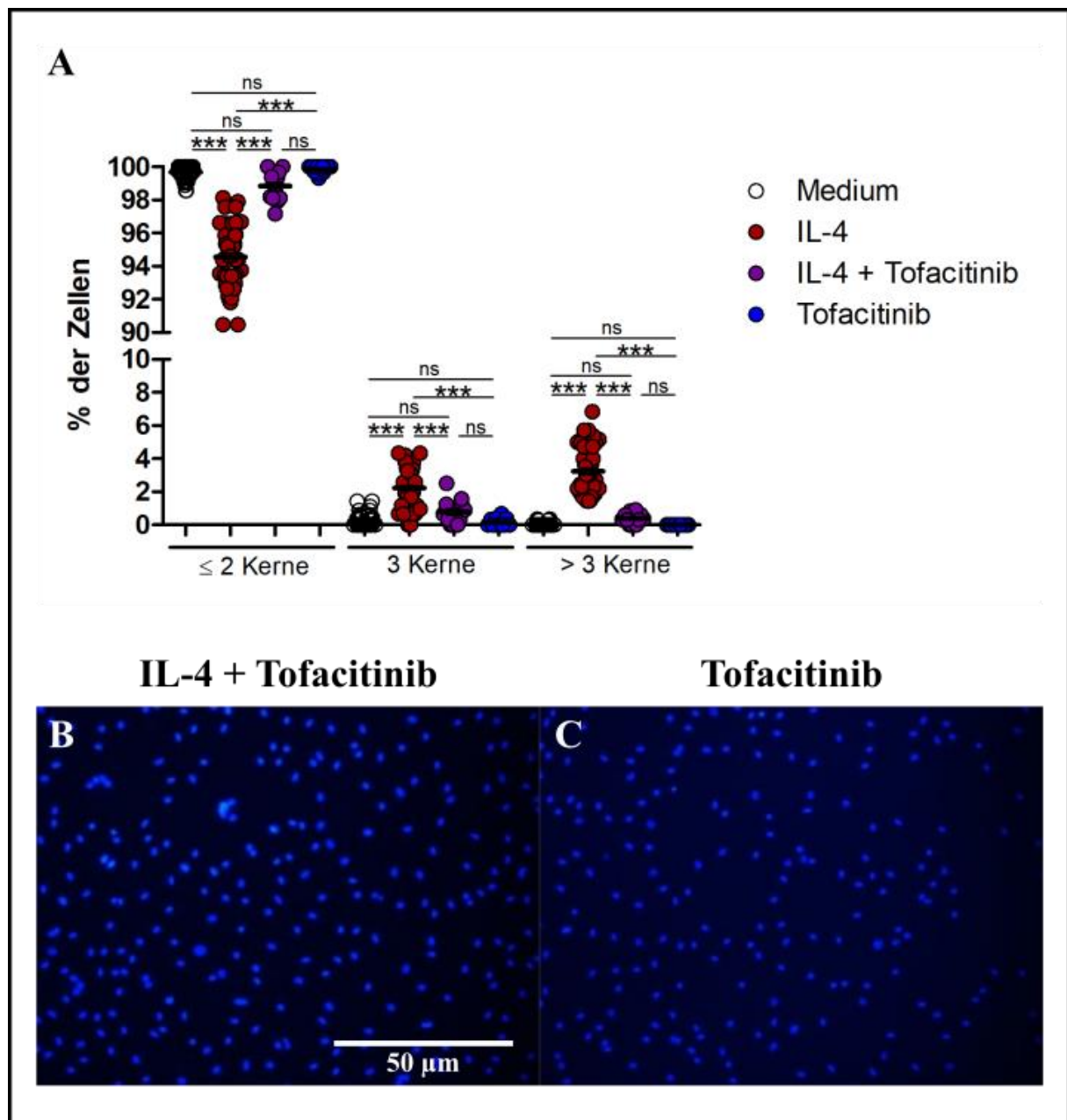


Abbildung 11: Tofacitinib hemmt die IL-4-getriggerte Ausbildung von Riesenzellen bei Peritonealmakrophagen. Anzahl der Zellen mit ≤ 2 , 3 und > 3 Kernen ohne Stimulation oder unter Stimulation mit IL-4 und/oder Tofacitinib (A). Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM von acht unabhängigen Experimenten dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). Repräsentative Bilder der Versuchsansätze unter der Verwendung des 20x-Objektivs als reine Fluoreszenzmikroskopie: IL-4 + Tofacitinib (B), Tofacitinib (C).

Die Verwendung des STAT 3-Inhibitors Stattic bewirkte keine Änderungen im Vergleich zur reinen Medium-Gruppe. Allerdings kam es im Vergleich zur Stimulation mit IL-10 zu einer signifikanten Vergrößerung des Anteils der Zellen mit bis zu zwei Kernen. Dies war auch der Fall beim Vergleich der IL-10-Gruppe mit derjenigen, die sowohl mit Stattic als auch mit IL-10 inkubiert worden war (Abb. 12).

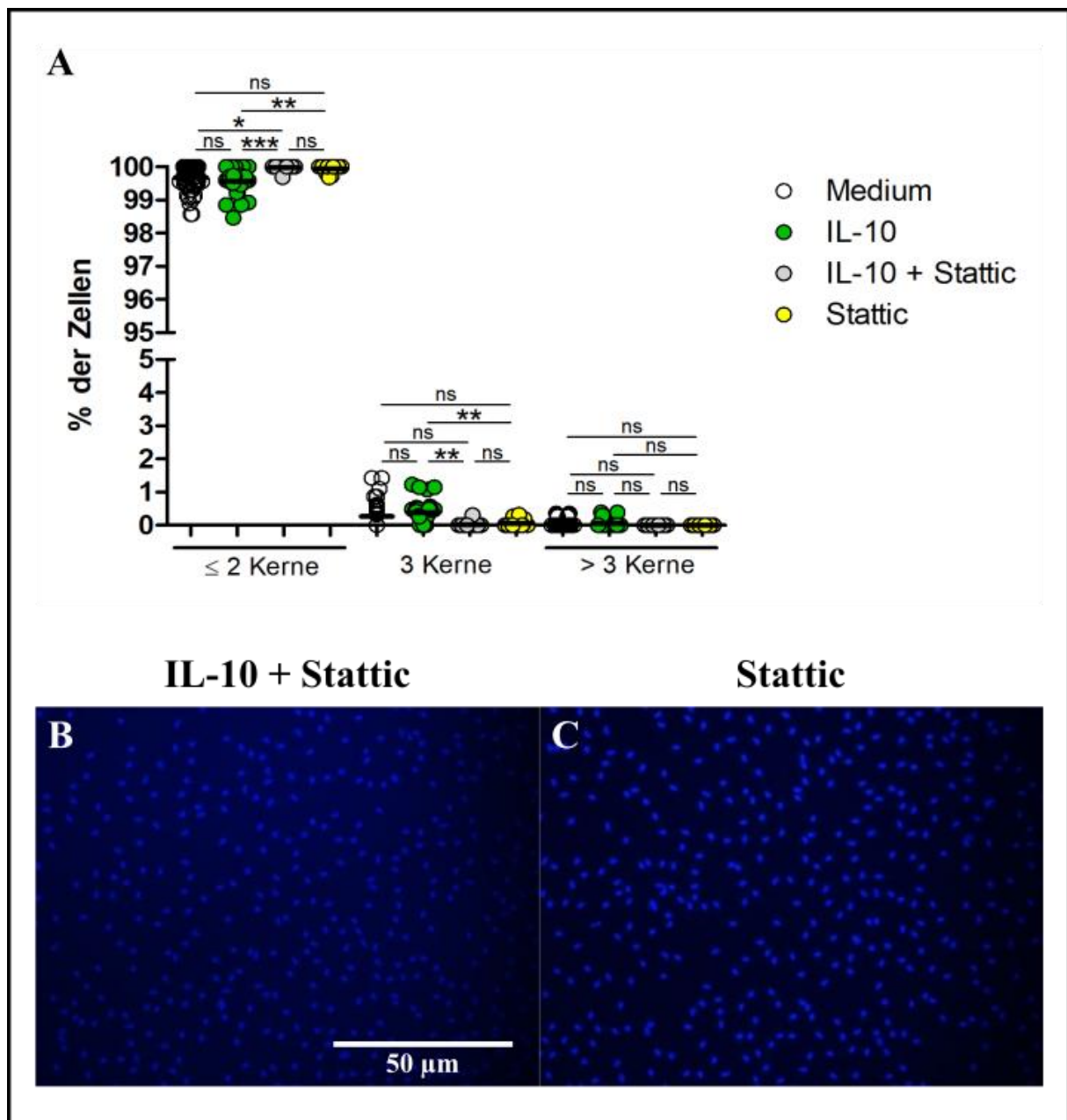


Abbildung 12: Stattic hat keine Auswirkung auf die Ausbildung von Riesenzellen bei Peritonealmakrophagen.

Anzahl der Zellen mit ≤ 2 , 3 und > 3 Kernen ohne Stimulation oder unter Stimulation mit IL-10 und/oder Stattic (A). Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM von acht unabhängigen Experimenten dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). Repräsentative Bilder der Versuchsansätze unter der Verwendung des 20x-Objektivs als reine Fluoreszenzmikroskopie: IL-10 + Stattic (B), Stattic (C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stimulation von murinen Peritonealmakrophagen mit IL-4 zur Bildung von Riesenzellen führt. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe des Tyrosinkinase-Inhibitors Tofacitinib aufgehoben werden. Die Riesenzellen, die sich unter der Gabe von IL-4 bildeten, enthielten darüber hinaus deutlich mehr Kerne als die Riesenzellen, die sich z.B. in reinem Medium spontan bildeten.

3.1.1.2. Stattic nicht aber Tofacitinib induziert einen G0/G1-Arrest bei IL-4-aktivierten Makrophagen

Um den Mechanismus der Inhibierung der IL-4-getriggerten Riesenzellbildung mittels Tofacitinib näher zu untersuchen, wurden Zellzyklusanalysen angeschlossen, da als mögliche Ursache für die Bildung polyploider Zellen ein atypisch bzw. fehlerhaft ablaufender Zellzyklus beschrieben wurde [86]. Hierfür wurden die Peritonealmakrophagen nach der Isolierung in 8-well Permax® Chamber Slides™ umgesiedelt, sodass in jede Kammer 50.000 Zellen übertragen worden sind. Das Volumen wurde mit RPMI-Medium (+ 10% FBS, + 1% PS) auf insgesamt 400 µl pro Kammer aufgefüllt. Die Zellen wurden mit Zytokinen und/oder Inhibitoren stimuliert und im Brutschrank inkubiert. Nach drei Tagen konnten die Makrophagen gelöst, gefärbt und mit dem FACS-Gerät analysiert werden. Der genaue Ablauf der Behandlung der Makrophagen und der FACS-Analyse ist unter 2.10. und 2.13. beschrieben.

Es zeigte sich, dass sich weder durch die Zugabe von IL-4 noch durch IL-10 oder TNF- α eine signifikante Änderung im Anteil der Zellen, die in der jeweiligen Zellzyklus-Phase waren, ergab (Abb. 13A). Trotz unterschiedlicher Stimulation befand sich sowohl in der G0/G1-Phase als auch in der S-Phase sowie in der G2/M-Phase ein gleich großer Anteil von Makrophagen im Vergleich zur Medium-Gruppe. Jedoch befanden sich unter IL-4-Einfluss signifikant mehr Zellen in der G2/M-Phase als unter der Behandlung mit TNF- α . Auch die Zugabe des Tyrosinkinase-Inhibitors Tofacitinib bewirkte, selbst unter gleichzeitiger Stimulation mit IL-4, keine signifikante Verschiebung im Anteil der Zellen, die sich in der jeweiligen Phase des Zellzyklus befanden. Sowohl in der G0/G1-Phase als auch in der S-Phase sowie in der G2/M-Phase war ein gleich großer Anteil von Makrophagen nachweisbar (Abb. 13B). Es ließ sich lediglich ein leichter Trend erkennen, dass sich unter der Gabe von Tofacitinib ein geringerer Anteil von Zellen in der S- bzw. G2/M-Phase und entsprechend ein größerer Anteil in der G0/G2-Phase befand.

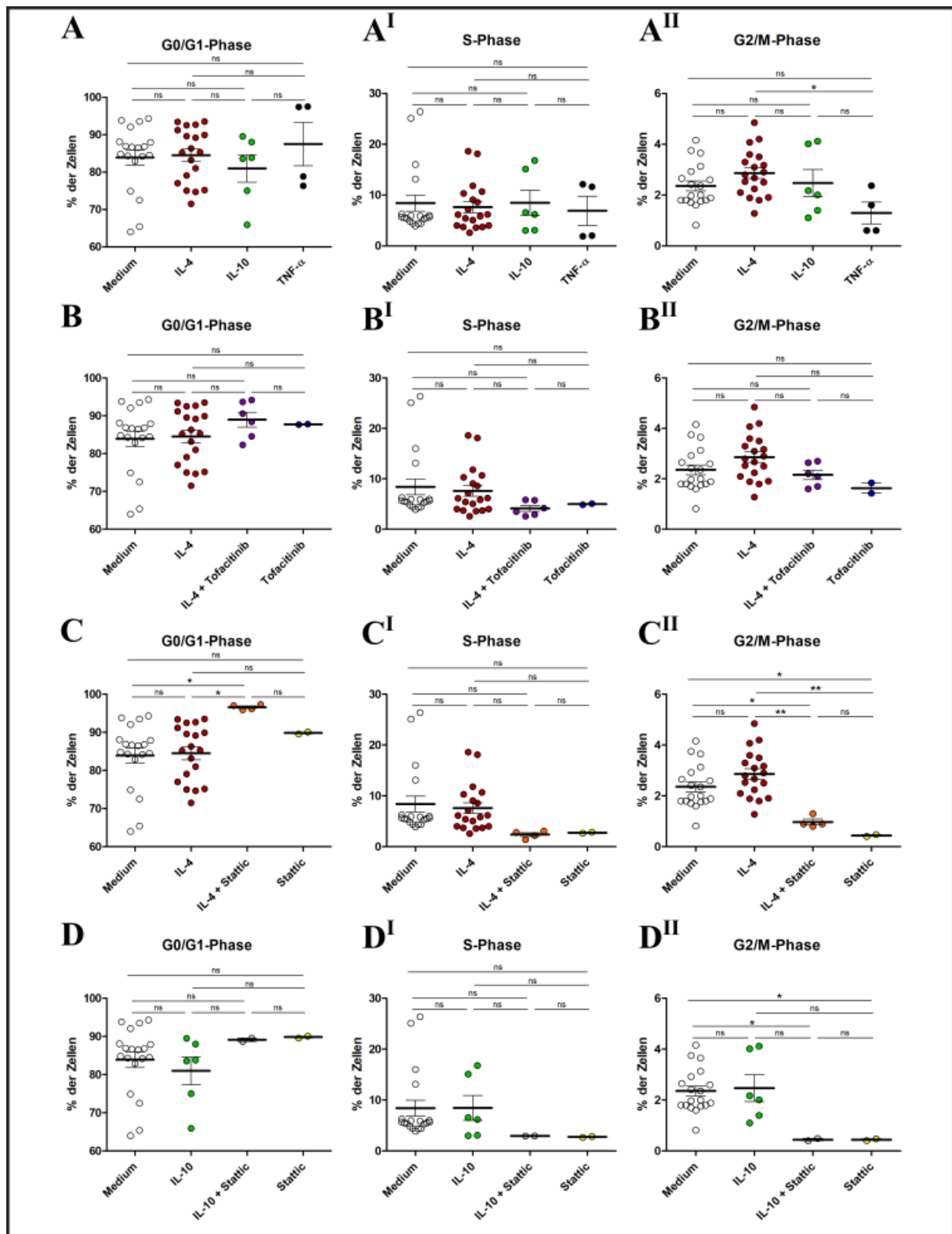


Abbildung 13: Stattic bewirkt in Kombination mit IL-4 einen G0/G1-Arrest von Peritonealmakrophagen.

Anzahl der Zellen in der G0/G1-Phase, der S-Phase und der G2/M-Phase ohne bzw. unter folgender Stimulation/Inhibition: IL-4, IL-10, TNF- α (A), IL-4 und/oder Tofacitinib (B), IL-4 und/oder Stattic (C) sowie IL-10 und/oder Stattic (D). Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM von sechs unabhängigen Experimenten dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

Dagegen zeigte sich, dass sich unter gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit IL-4 und dem STAT3-Inhibitor Stattic ein signifikant größerer Anteil von Zellen in der G0/G1-Phase befand. Dies war sowohl im Vergleich zur Medium-Gruppe als auch im Vergleich zur nur mit IL-4 behandelten Gruppe der Fall (Abb. 13C). Eine Behandlung mit Stattic alleine war demgegenüber nicht ausreichend, einen signifikanten Anstieg im Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase zu bewirken. Spiegelbildlich sah das Ergebnis in der G2/M-Phase aus. Die mit IL-4 und Stattic behandelten Makrophagen befanden sich zu einem signifikant geringeren Anteil in der G2/M-Phase als die Zellen der Medium-Gruppe und die der reinen IL-4-Gruppe. Hier zeigten sich nun auch in der mit Stattic behandelten Gruppe signifikant weniger Zellen in der G2/M-Phase als in der Medium-Gruppe oder den mit IL-4 behandelten Zellen. In der S-Phase zeigte sich dagegen kein signifikanter Unterschied, sondern lediglich ein Trend. Beispielhaft sei auf den Unterschied zwischen der Gruppe, die mit IL-4 und mit Stattic behandelt worden war, und der reinen Medium-Gruppe verwiesen. Im Gegensatz zur Behandlung mit IL-4 reichte die Stimulation mit IL-10 zusätzlich zu Stattic nicht aus, um einen signifikanten Anstieg im Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase zu bewirken (Abb. 13D). Es war hier lediglich ein leichter Trend erkennbar. Korrespondierend zeigte sich in der S-Phase ein nicht-signifikanter Trend zu weniger Zellen unter der Behandlung mit IL-10 und Stattic. In der G2/M-Phase kam es unter der simultanen Stimulation mit IL-10 und Stattic zu einer signifikanten Reduktion des Zellanteils.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inhibierung des JAK/STAT-Signalwegs mittels Tofacitinib ohne signifikanten Einfluss auf den Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase des Zellzyklus blieb. Dagegen bewirkte die spezifische Inhibierung von STAT 3 mittels Stattic unter gleichzeitiger Stimulation mit IL-4 einen Arrest in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Die alleinige Inhibierung dieses Signalwegs durch Stattic war hierfür dagegen nicht ausreichend, sondern ergab lediglich einen Trend.

3.1.1.3. IL-4 reduziert die Expression von IL-10 und p27 in Peritonealmakrophagen, während IL-10 und IL-13 zu einer Hochregulation von p21 führen

Die Behandlung von Makrophagen mit Zytokinen bzw. Inhibitoren mit bekannter Auswirkung auf die Riesenzellentstehung scheint einen Einfluss auf den Ablauf des Zellzyklus zu haben, insbesondere die Inkubation mit IL-4 und Stattic. Um diesen Mechanismus besser zu verstehen, sollte nun das Expressionsmuster von Genen analysiert werden, die in den Zellzyklus involviert sind.

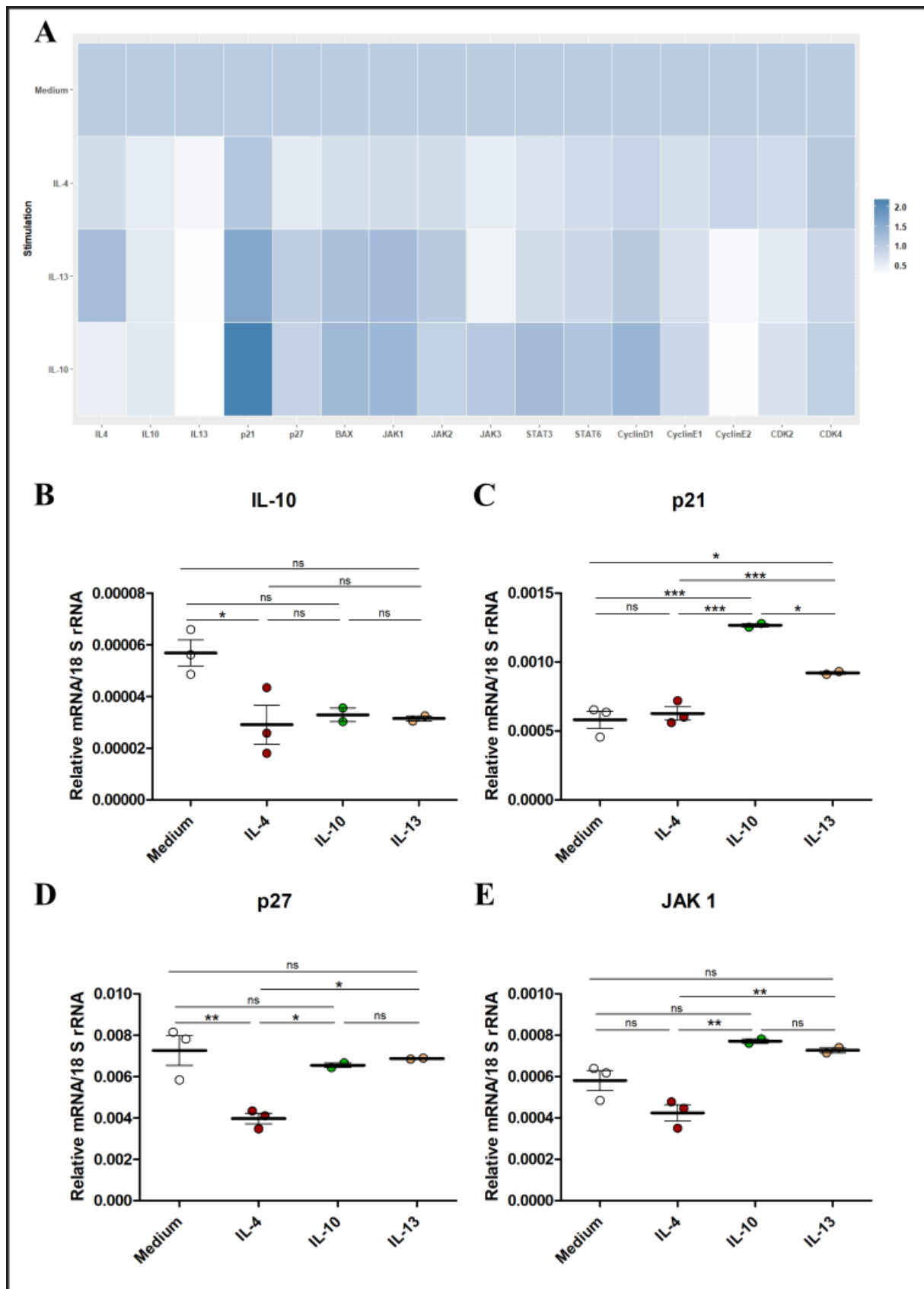


Abbildung 14: Genexpressionsmuster von Peritonealmakrophagen unter Stimulation.

Übersicht über das Expressionsprofil folgender Gene unter der Stimulation mit IL-4, IL-10 und IL-13: IL-4, IL-10, IL-13, p21, p27, BAX, JAK 1, JAK 2, JAK 3, STAT 3, STAT 6, Cyclin D1, Cyclin E1, Cyclin E2, CDK 2, sowie CDK 4 (A). Detaillierte Darstellung der Expression von IL-10 (B), p21 (C), p27 (D) und JAK 1 (E). Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

Für die Durchführung der PCR-Analysen wurde eine größere Menge an Nukleinsäuren benötigt, sodass 500.000 Makrophagen pro Kammer in 1-well Permanox® Chamber Slides™ kultiviert wurden. Der Ansatz und die Behandlung erfolgten wie weiter oben beschrieben (s. 2.10.1.). Anschließend wurde zunächst die RNA aus den Makrophagen isoliert, diese dann in cDNA konvertiert, bevor die qRT-PCR durchgeführt wurde (s. 2.12.).

Die Stimulation der Makrophagen führte zu einer Herunterregulierung der Produktion von IL-10, signifikant war dies allerdings nur in der mit IL-4 stimulierten Gruppe (Abb. 14B). Unter der Behandlung mit IL-10 und IL-13 zeigte sich eine Hochregulation von *p21* (CDK-Inhibitor 1) (Abb. 14C). Dieser Effekt war bei IL-10 noch einmal signifikant stärker als bei IL-13. Dagegen blieb *p21* unter Stimulation mit IL-4 konstant gegenüber der Medium-Gruppe. Der Enzyminhibitor *p27* (Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor 1B) wurde unter der Einwirkung von IL-4 signifikant herunterreguliert (Abb. 14D). IL-10 und IL-13 hatten dagegen keine Auswirkung auf die Expression von *p27*. Die Expression der Tyrosinkinase *Jak 1* war in der IL-4-stimulierten Gruppe signifikant niedriger als in der IL-10-Gruppe und in der IL-13-Gruppe (Abb. 14E). Zwischen der Medium-Gruppe und der mit IL-4, IL-10 sowie mit IL-13 behandelten Gruppe bestand dagegen kein signifikanter Unterschied. In den weiteren getesteten Genen zeigte sich unter den verschiedenen Stimulationen keine signifikante Änderung des Expressionsmusters. Die Ergebnisse dieser Analyse sind als Heatmap in Abbildung 14A dargestellt.

Zusammenfassend zeigte sich unter dem Einfluss von IL-4 eine Reduzierung der Produktion von IL-10 und der Expression von *p27*. Sowohl die Stimulation mit IL-10 als auch mit IL-13 bewirkten eine Hochregulation von *p21* und im Vergleich zu IL-4 eine verstärkte Expression von *Jak 1*.

3.1.2. Untersuchungen zur Riesenzellbildung bei *in vitro* differenzierten Makrophagen

3.1.2.1. Tofacitinib bewirkt eine Inhibierung der IL-4-getriggerten Riesenzellbildung bei *in vitro* aus Monozyten-differenzierten Makrophagen

Um die Anzahl der entstehenden Riesenzellen und deren Kerne unter dem Mikroskop bestimmen zu können, wurden die Makrophagen nach der Differenzierung und Stimulation/Inhibition (s. 2.10.2.) mit Hoechst 33342 gefärbt. Anschließend wurden unter dem Mikroskop Übersichtsaufnahmen sowie Detailaufnahmen gemacht und die Anzahl der Kerne pro Zelle bestimmt. Als Riesenzelle wurde eine Zelle bezeichnet, wenn sie mindestens drei Kerne enthielt (s.o.)

Unter der Stimulation mit IL-4 kam es signifikant häufiger zur Riesenzellbildung als in der IL-10-Gruppe, TNF- α sowie in der Medium-Gruppe (Abb. 15). Dementsprechend niedriger war der Anteil der Zellen mit maximal zwei Kernen in der IL-4-Gruppe. Durch die Zugabe des Tyrosinkinase-Inhibitors Tofacitinib konnte der Effekt von IL-4 auf die Riesenzellbildung aufgehoben werden (Abb. 16). So zeigten sich sowohl in der Gruppe der Zellen mit 3 Kernen als auch in der Gruppe mit mehr als 3 Kernen signifikant weniger Riesenzellen, wenn zu der Stimulation mit IL-4 gleichzeitig Tofacitinib auf die Zellen einwirkte. Tofacitinib allein bewirkte keine signifikante Änderung im Vergleich zur Medium-Gruppe. Unter der alleinigen Gabe von Stattic gab es ebenso wenig signifikante Verschiebungen im Anteil der Zellen wie in der Kombination von Stattic mit IL-10 (Abb.17).

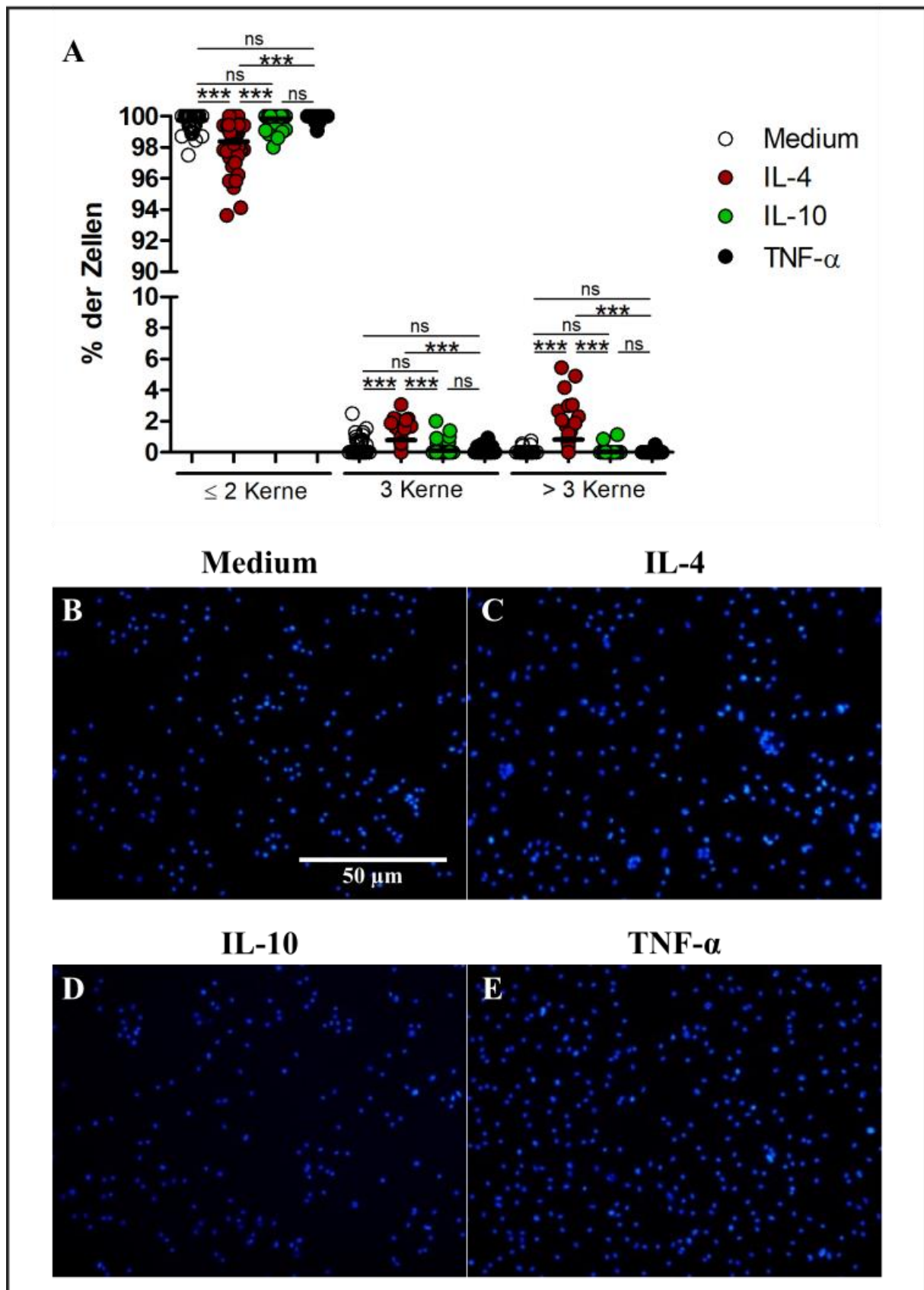


Abbildung 15: IL-4-Stimulation bewirkt die Ausbildung von Riesenzellen bei *in vitro* differenzierten Makrophagen. Anzahl der Zellen mit ≤ 2 , 3 und > 3 Kernen ohne Stimulation oder unter Stimulation mit IL-4, IL-10 bzw. TNF- α . Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM von acht unabhängigen Experimenten dar (A). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). Repräsentative Bilder der Versuchsansätze unter der Verwendung des 20x-Objektivs als reine Fluoreszenzmikroskopie (B-E). Medium (B), IL-4 (C), IL-10 (D), TNF- α (E).

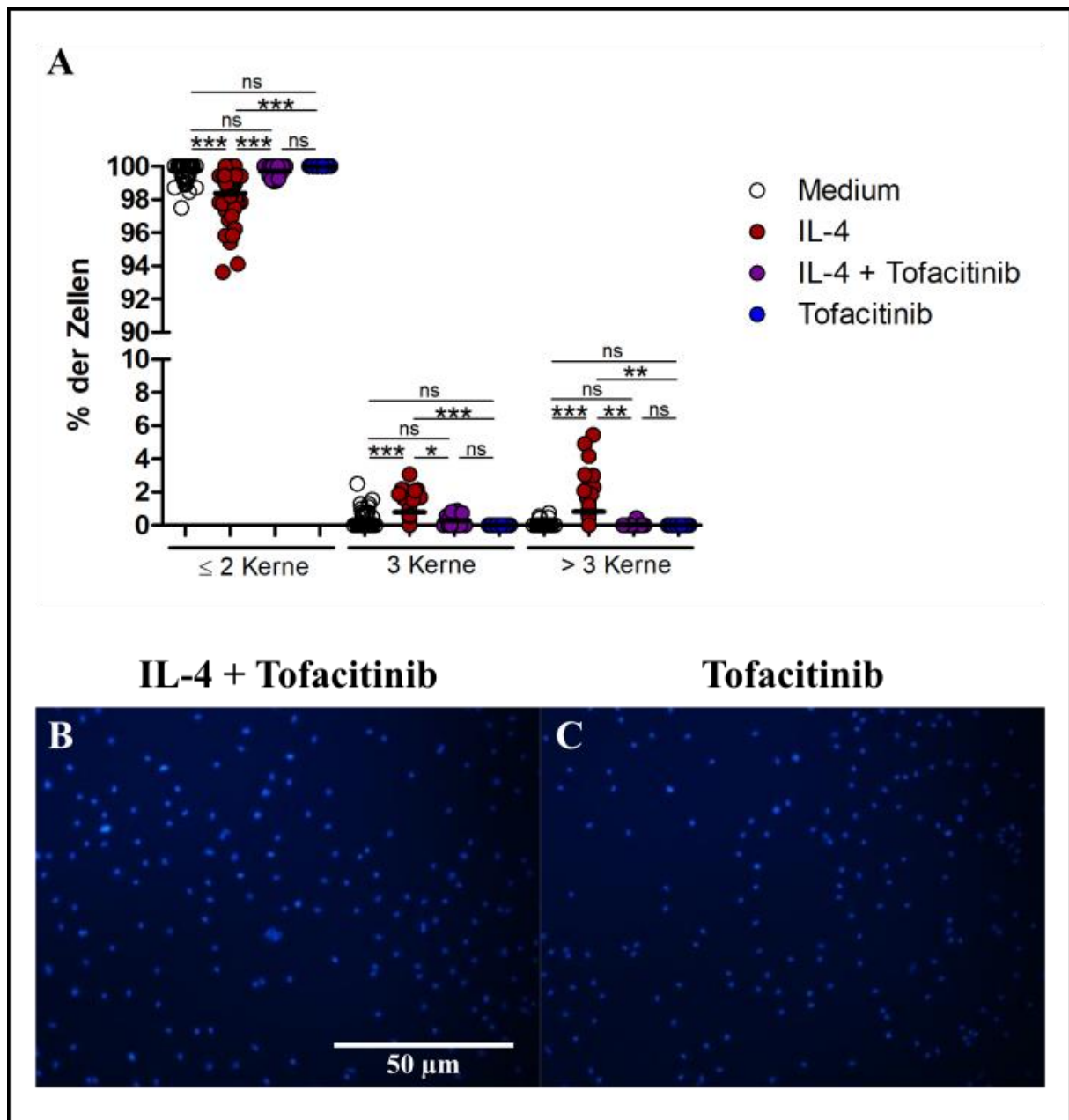


Abbildung 16: Tofacitinib hemmt die IL-4-getriggerte Riesenzellbildung aus *in vitro* differenzierten Makrophagen. Anzahl der Zellen mit ≤ 2 , 3 und > 3 Kernen ohne Stimulation oder unter Stimulation mit IL-4 und/oder Tofacitinib (A). Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM von acht unabhängigen Experimenten dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). Repräsentative Bilder der Versuchsansätze unter der Verwendung des 20x-Objektivs als reine Fluoreszenzmikroskopie: IL-4 + Tofacitinib (B), Tofacitinib (C).

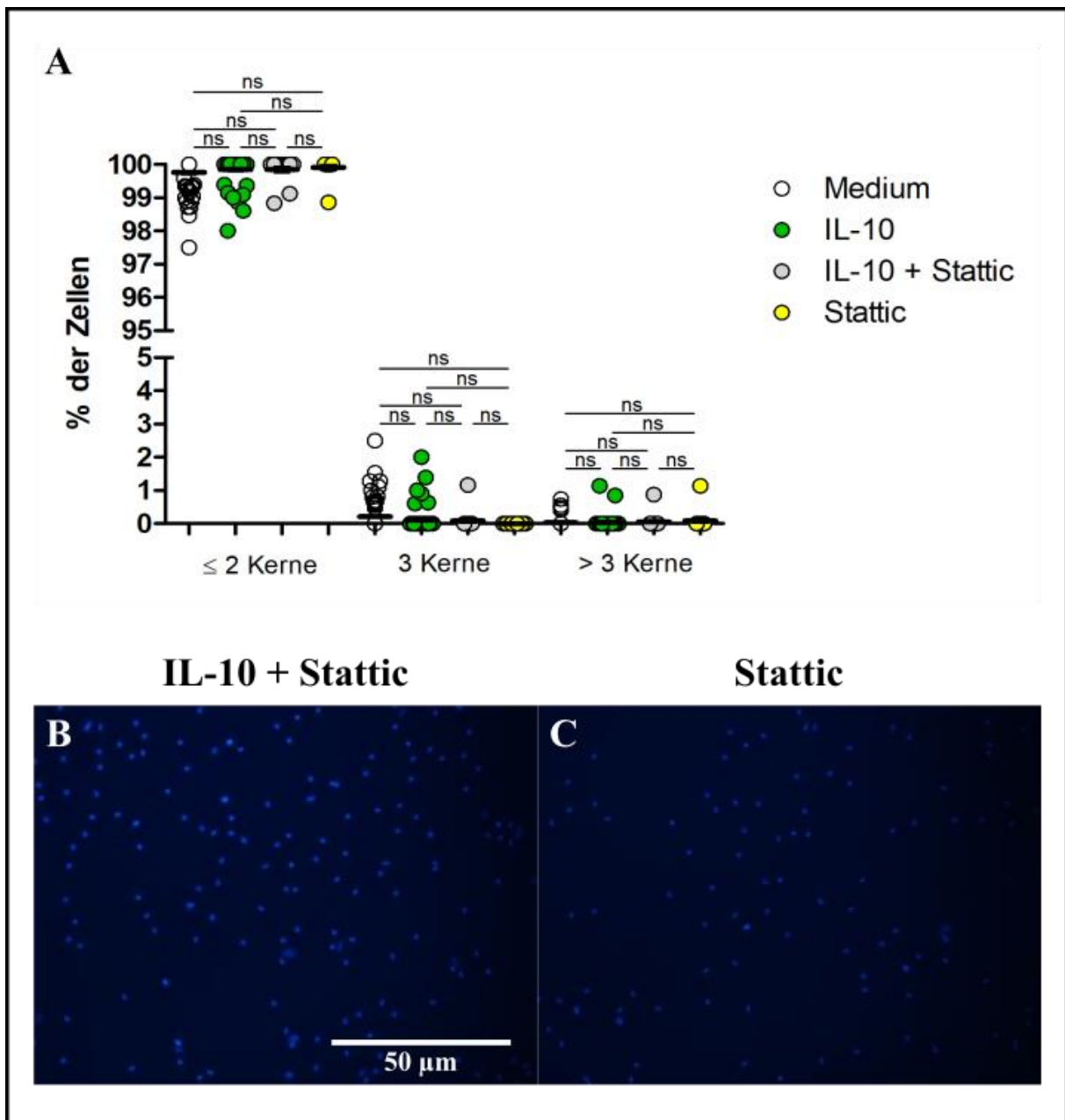


Abbildung 17: Stattic hat keine Auswirkung auf die Riesenzellbildung aus *in vitro* differenzierten Makrophagen. Anzahl der Zellen mit ≤ 2 , 3 und > 3 Kernen ohne Stimulation oder unter Stimulation mit IL-10 und/oder Stattic (A). Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM von acht unabhängigen Experimenten dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). Repräsentative Bilder der Versuchsansätze unter der Verwendung des 20x-Objektivs als reine Fluoreszenzmikroskopie: IL-10 + Stattic (B), Stattic (C).

3.1.2.2. Peritonealmakrophagen bilden unter Stimulation mit IL-4 mehr Riesenzellen als *in vitro* differenzierte Makrophagen

Die bisherigen Experimente sind sowohl an aus dem Peritoneum isolierten Makrophagen, das heißt bereits differenzierten residenten Gewebemakrophagen, als auch an *in vitro* aus Monozyten differenzierten Makrophagen durchgeführt worden. Letzteres entspricht eher den physiologischen Vorgängen einer Entzündungsreaktion, bei der die Monozyten aus dem Knochenmark ins Zielgewebe infiltrieren und sich dort in Abhängigkeit von den Umgebungsverhältnissen weiter ausdifferenzieren. Um das potentiell unterschiedliche Verhalten dieser beiden Zelltypen näher zu untersuchen, wurde ein direkter Vergleich durchgeführt. Es wurden sowohl Makrophagen aus dem Peritoneum als auch Monozyten aus dem Knochenmark von C57BL6/N -Mäusen isoliert, nach den oben beschriebenen Protokollen weiterbehandelt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops analysiert (s. 2.10.).

Die Inkubation der Makrophagen in reinem Medium ergab keine Unterschiede beim Anteil der einzelnen Zellfraktionen zwischen den *in vitro* differenzierten Makrophagen und den Peritonealmakrophagen (Abb. 18A). Die Stimulation mit IL-4 bewirkte bei *in vitro* differenzierten Makrophagen die Ausbildung von signifikant weniger Riesenzellen als bei Peritonealmakrophagen (Abb. 18B). Derselbe Effekt war bei der gleichzeitigen Behandlung der Zellen mit IL-4 und Tofacitinib erkennbar (Abb. 18C). Die alleinige Gabe von Tofacitinib führte nur in der Fraktion mit bis zu 2 Kernen und der mit 3 Kernen zu einem signifikanten Unterschied (Abb. 18D). Dagegen wiesen die Makrophagen keinen Unterschied im Anteil der Riesenzellen mit mehr als 3 Kernen auf. Die *in vitro* differenzierten Makrophagen bildeten unter der Stimulation mit IL-10 signifikant weniger Riesenzellen mit 3 Kernen aus, dementsprechend höher war der Anteil in den Zellen mit maximal 2 Kernen. Der Anteil der Riesenzellen mit mehr als 3 Kernen war in beiden Makrophagenpopulationen gleich groß (Abb. 18E).

Innerhalb der Gruppe der mit einer Kombination aus IL-10 und Stattic behandelten Makrophagen (Abb. 18F) und innerhalb der nur mit Stattic inkubierten Gruppe traten keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 18G). Die Stimulation mit TNF- α führte zu einem geringeren Anteil von Riesenzellen mit mehr als 3 Kernen in der Gruppe der *in vitro* differenzierten Makrophagen im Vergleich zu den Peritonealmakrophagen. Hierzu korrespondierend erhöhte sich der Anteil der Zellen mit maximal 2 Kernen. In der Gruppe der Riesenzellen mit exakt 3 Kernen konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 18H).

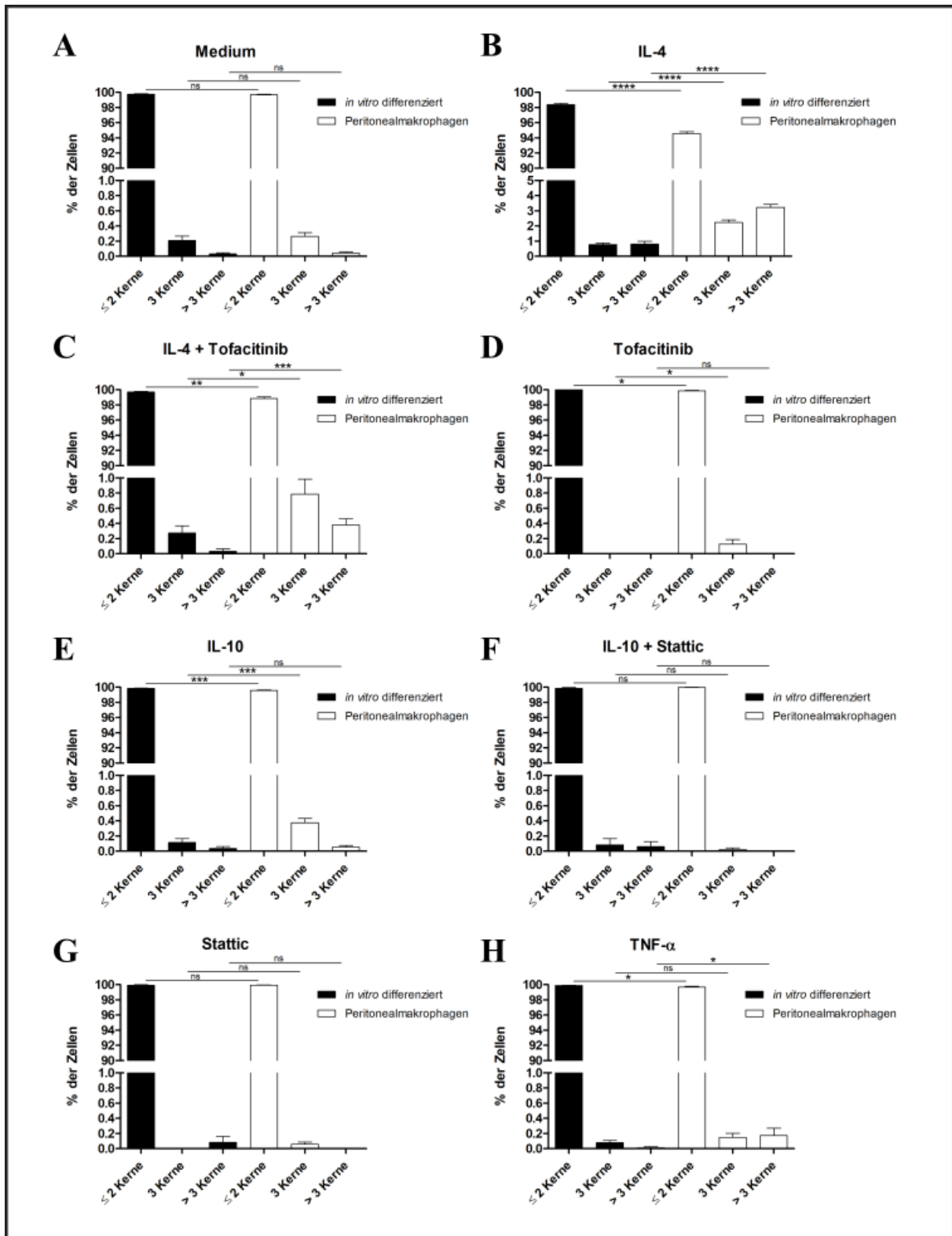


Abbildung 18: Peritonealmakrophagen bilden unter Stimulation mehr Riesenzellen als *in vitro* Makrophagen. Anzahl der Zellen mit ≤ 2 , 3 und > 3 Kernen ohne Stimulation (A) oder unter Stimulation/Inhibierung mit IL-4 (B), IL-4/Tofacitinib (C), Tofacitinib (D), IL-10 (E), IL-10/Stattic (F), Stattic (G) sowie mit TNF- α (H). Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM von acht unabhängigen Experimenten dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (unverbundener Student's T-Test).

Auch für die *in vitro* aus Monozyten differenzierten Makrophagen wurde eine Zellzyklus-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Zelle wie oben beschrieben behandelt und mit IL-4, IL-10, TNF- α , Tofacitinib und/oder Stattic inkubiert.

Die Auswertung ergab weder in der G0/G1-Phase noch in der S-Phase oder der G2/M-Phase signifikante Veränderungen im Anteil der Zellen unter Zytokin-Stimulation. Im Vergleich zur Medium-Gruppe hatte die Behandlung mit IL-4, IL-10 oder TNF- α keine Auswirkung auf die Phase des Zellzyklus, in der sich die Makrophagen befanden (Abb. 19A). Auch die Inkubation mit Tofacitinib und/oder IL-4 bewirkte keine signifikanten Verschiebungen im Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase, der S-Phase oder der G2/M-Phase (Abb. 19B).

Die Inhibierung mit Tofacitinib führte lediglich zu einem leicht höheren Anteil von Zellen in der G0/G1-Phase und zu einem entsprechend geringeren Anteil in der G2/M-Phase. Während die Behandlung mit Stattic bei den Peritonealmakrophagen zu weniger Zellen in der G2/M-Phase führte, ergab die Auswertung bei den *in vitro* differenzierten Makrophagen keine signifikanten Änderungen im Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase, der S-Phase und der G2/M-Phase. In der G2/M-Phase ließ sich lediglich ein etwas geringerer Anteil von Makrophagen unter der Gabe von Stattic beobachten (Abb. 19C).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es bei der Stimulation der Makrophagen mit IL-4, IL-10 und TNF- α bei den *in vitro* differenzierten Makrophagen in einem geringeren Ausmaß zur Riesenzellbildung kam als bei den Peritonealmakrophagen. Dieser Effekt war unter der Einwirkung von IL-4 aufgrund des höheren Anteils an Riesenzellen am stärksten ausgeprägt. Grundsätzlich zeigten die Zytokine und Inhibitoren aber in beiden Makrophagenpopulationen dieselbe Wirkung, insbesondere dass die IL-4-getriggerte Bildung von Riesenzellen durch Tofacitinib inhibiert werden konnte. Darüber hinaus zeigte sich, dass bei den *in vitro* differenzierten Makrophagen die gewählten Zytokine und Inhibitoren keinen Einfluss auf den Anteil der Zellen in den Phasen des Zellzyklus hatten. Der in der Behandlung von Peritonealmakrophagen gezeigte signifikante Effekt von Stattic war bei den *in vitro* differenzierten Makrophagen lediglich als Trend erkennbar.

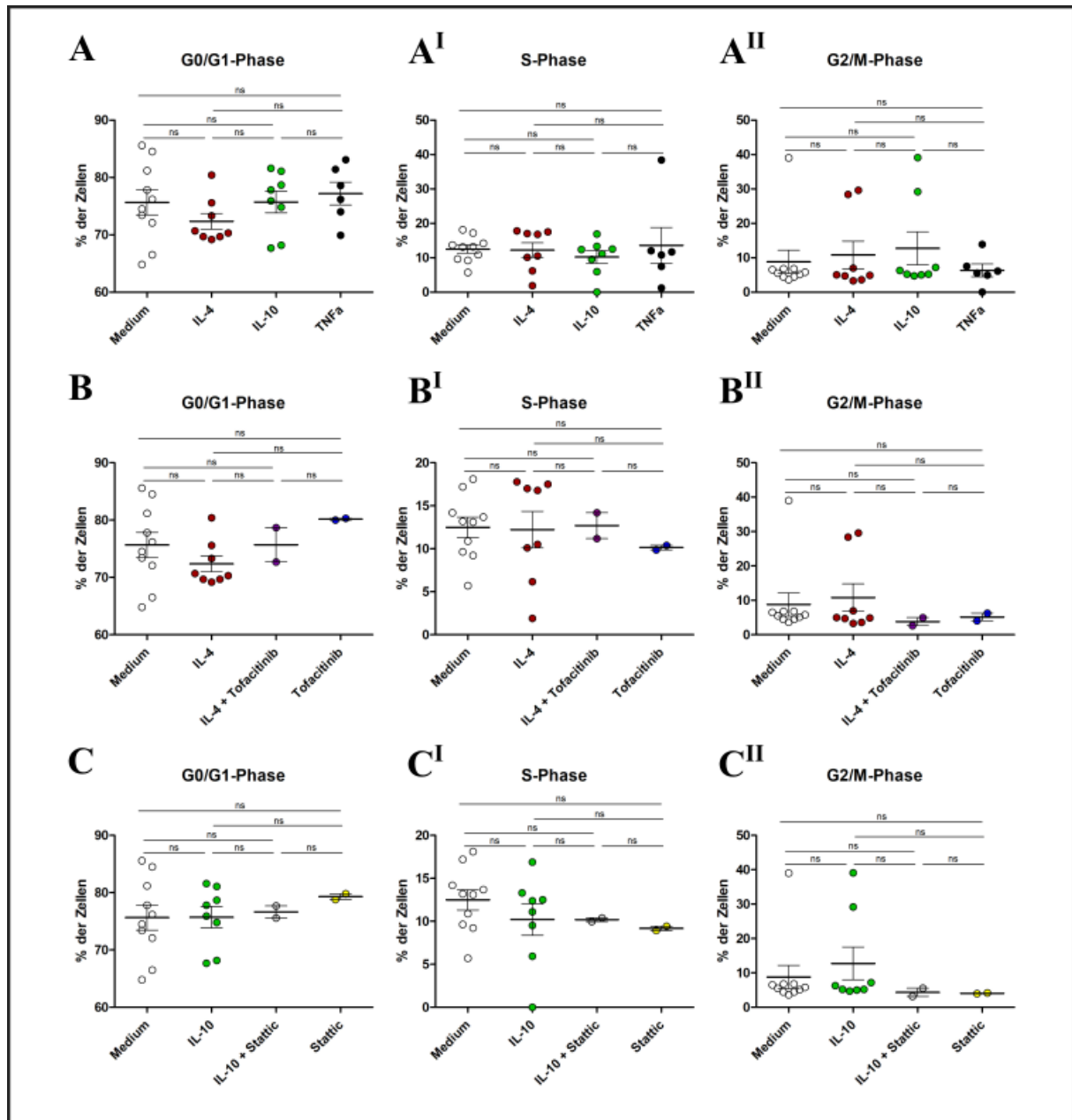


Abbildung 19: Tofacitinib und Stattic bewirken keine Änderung in der Phase des Zellzyklus bei *in vitro*-Makrophagen.
 Anzahl der Zellen in der G0/G1-Phase, der S-Phase und der G2/M-Phase ohne bzw. unter folgender Stimulation/Inhibition: IL-4, IL-10, TNF- α (A), IL-4 und/oder Tofacitinib (B), sowie IL-10 und/oder Stattic (C). Die Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm SEM von sechs unabhängigen Experimenten dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

3.2. Die chronische Uratnephropathie im Mausmodell

Im Folgenden sollen nun die bisherigen *in vitro* Experimente zur Riesenzellbildung ergänzt und erweitert werden durch *in vivo* Versuche im Mausmodell. Hierbei liegt der Fokus auf der Riesenzellbildung bzw. der Entstehung von Harnsäure-Granulomen bei der chronischen Uratnephropathie und der Frage, ob eine zugrundeliegende CKD die Bildung von renalen Granulomen begünstigt.

3.2.1. Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse entwickeln nach Gabe einer fettreichen Diät mit Inosin eine Hyperurikämie und Niereninsuffizienz

Für die Untersuchungen im Mausmodell zur chronischen Uratnephropathie wurden folgende Gruppen verwendet:

1. HU+CKD: Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse, die nach Tamoxifen-Injektion eine HFD+Inosin Diät bekamen.
2. HU-CKD: Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse, die nach Tamoxifen-Injektion eine Chow+Inosin Diät erhielten.
3. Gesund 1: *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltiere, denen nach Tamoxifen-Injektion eine HFD+Inosin Diät verabreicht wurde.
4. Gesund 2: *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltiere, denen nach Tamoxifen-Injektion eine Chow+Inosin Diät verabreicht wurde.

Die Daten zeigen, dass Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse, die eine Diät mit HFD+Inosin (HU+CKD) oder Chow+Inosin (HU-CKD) bekamen, nach 3 Wochen signifikant erhöhte Harnsäurespiegel von 15-20 mg/dl aufwiesen im Vergleich zu 3-5 mg/dl bei den *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltieren mit beiden Inosin-Diäten (Gesund 1 und 2) (Abb. 20A). Dies bedeutet, dass Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse nicht aber *Glut9*^{lox/lox} Tiere eine Hyperurikämie entwickelt haben. Zudem entwickelten nur Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse denen eine HFD+Inosin Diät verabreicht wurde eine CKD (HU+CKD). Dies ging einher mit signifikant erhöhten Serumspiegeln von Kreatinin sowie Harnstoff (BUN) bei Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen mit HFD+Inosin Diät im Vergleich zu den anderen drei Gruppen (HU-CKD, Gesund 1 und 2) an Tag 21 (Abb. 20B+C).

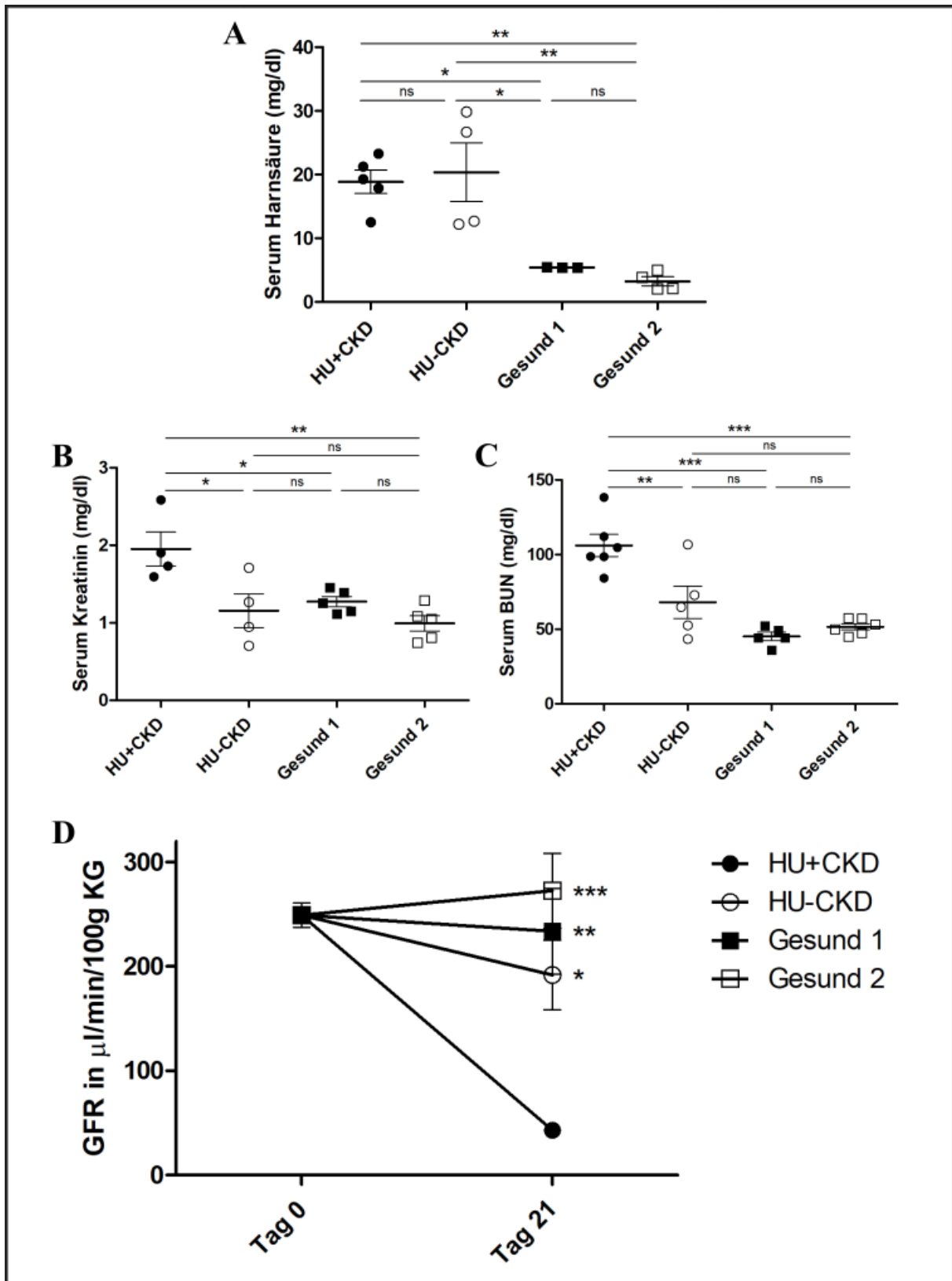


Abbildung 20: *Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox}* weisen nach Gabe einer azinogenen Diät eine verschlechterte Nierenfunktion auf.

Nierenfunktion von hyperurikämien Mäusen ± CKD und gesunden Kontrolltieren 3 Wochen nach Induktion mit Tamoxifen. Gemessen wurden der Harnsäurespiegel (A) und Kreatininspiegel (B) im Serum, der BUN-Spiegel (C) sowie die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) (D). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, n=6. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). [29]

Die Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) bestätigte, dass nur Alb-cre-ERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse mit HFD+Inosin Diät (HU+CKD) eine signifikant eingeschränkte Nierenfunktion aufwiesen, das heißt eine Abnahme der GFR (Abb. 20D). Hingegen zeigten Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse mit Chow+Inosin Diät (HU-CKD) und *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltiere auf beiden Inosin Diäten (Gesund 1, Gesund 2) eine normale Nierenfunktion nach 21 Tagen.

3.2.2. Saurer Urin-pH führt zur Bildung von Harnsäurekristallen in Alb-cre-ERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen mit fettreicher Diät und Inosin

Es ist bekannt, dass die Kristallbildung im Körper vom pH-Wert abhängt. Für die Harnsäurekristalle wurde dies beispielsweise im Rahmen der Gicht gezeigt. [108] [109] Im Folgenden soll nun untersucht werden, inwieweit der pH-Wert des Urins die Kristallbildung *in vivo* beeinflusst und somit eine mögliche Erklärung für den beschriebenen GFR-Abfall darstellt. Den Mäusen wurde zu Beginn und nach drei Wochen Urin abgenommen. Während sich der pH-Wert im Urin der *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltiere mit Chow-Inosin Diät (Gesund 2) im zeitlichen Verlauf nicht änderte, kam es in den anderen drei Gruppen (HU+CKD, HU-CKD, Gesund 1) zu einer deutlichen Ansäuerung des Urins (Abb. 21A). Nach Zentrifugation des 3-Wochen-Urins für 5 Minuten bei 360 rcf fiel in den sauren Urinproben der Gruppen HU+CKD, HU-CKD, Gesund 1 ein Sediment aus, das im Urin der *Glut9*^{lox/lox} Mäuse mit Chow-Inosin Diät (Gesund 2) nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 21B). Unter dem Mikroskop wurde sichtbar, dass dieses Sediment zu einem großen Teil aus Kristallen bestand, die sich unter Zugabe von Rasburikase innerhalb von 5 Minuten fast vollständig auflösten (Abb. 21C). Die im Urin von Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse mit HFD+Inosin Diät (HU+CKD) nachgewiesenen Kristalle bestanden folglich aus Harnsäure. Die Untersuchung von kryofixierten Nierenschnitten unter dem Polarisationsmikroskop ergab, dass in den Nieren der HU+CKD Mäuse polarisierbare Kristallablagerungen nachweisbar waren, während diese in den anderen drei Gruppen nicht auftraten (Abb. 22A+B). Um zweifelsfrei zu belegen, dass es sich bei den Kristallen, die in den Nieren ausgefallen waren, um Harnsäurekristalle handelte, wurde eine Massenspektrum-Imaging Analyse (MALDI-MS) durchgeführt. Dabei wurden die unter dem Polarisationsmikroskop sichtbaren Kristalle mit den Ergebnissen der Spektralanalyse korreliert. Es zeigte sich, dass auch die Kristalle in den Nieren zu einem Großteil aus Harnsäure bestanden (Abb. 22C+D).

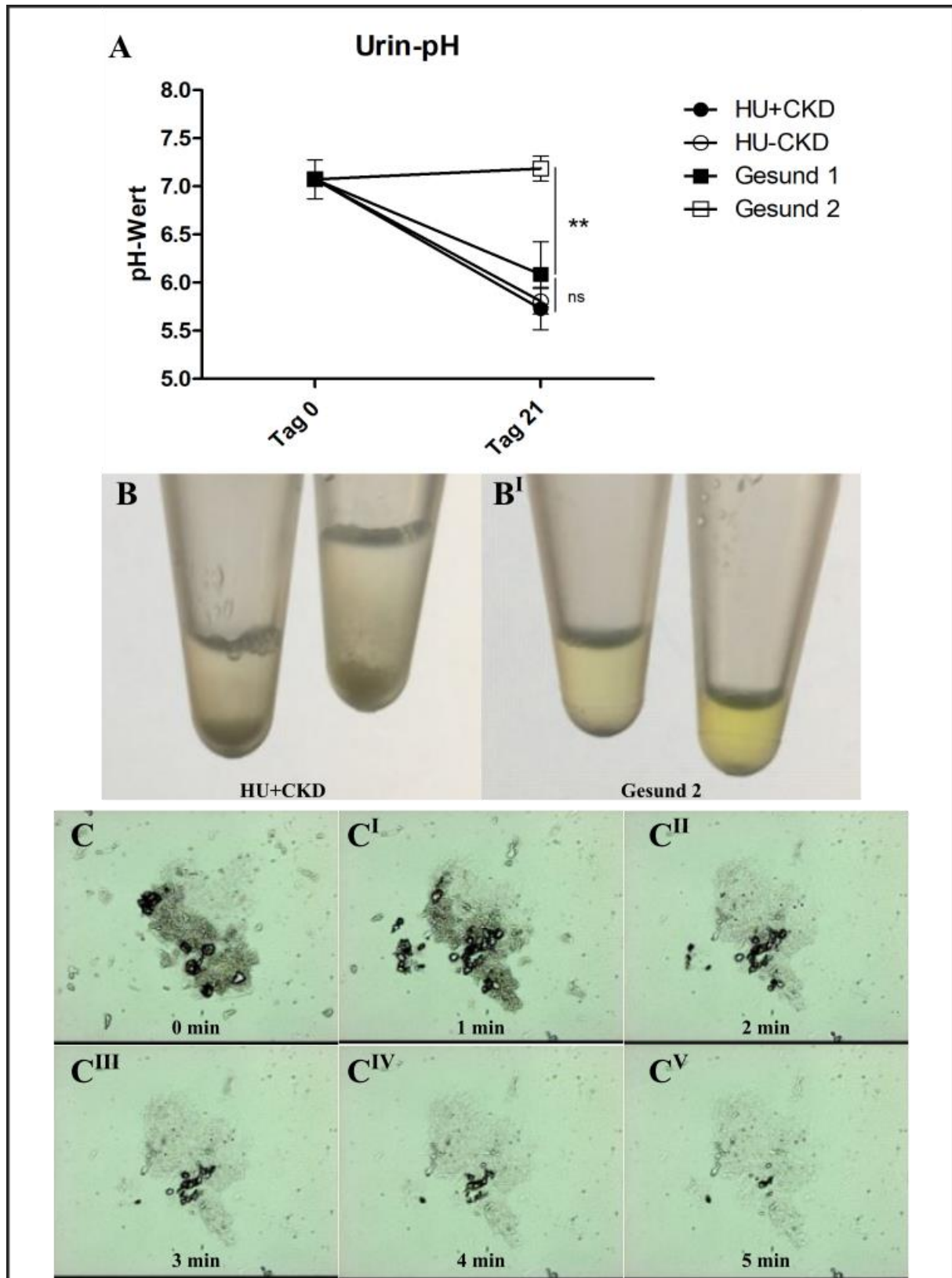


Abbildung 21: Ausfall von Harnsäurekristallen im Urin unter azinogener, fettreicher Diät.

Verlauf des pH-Wertes im Urin von Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} bzw. *Glut9*^{lox/lox} Mäusen mit fettreichem oder normalem Futter (A). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=6. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). Makroskopischer Aspekt des Urins von Mäusen der Gruppen HU+CKD und Gesund 2 (B). Kristalline Strukturen im Urin 0 min, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min und 5 min nach Zugabe von Rasburikase (C). [29]

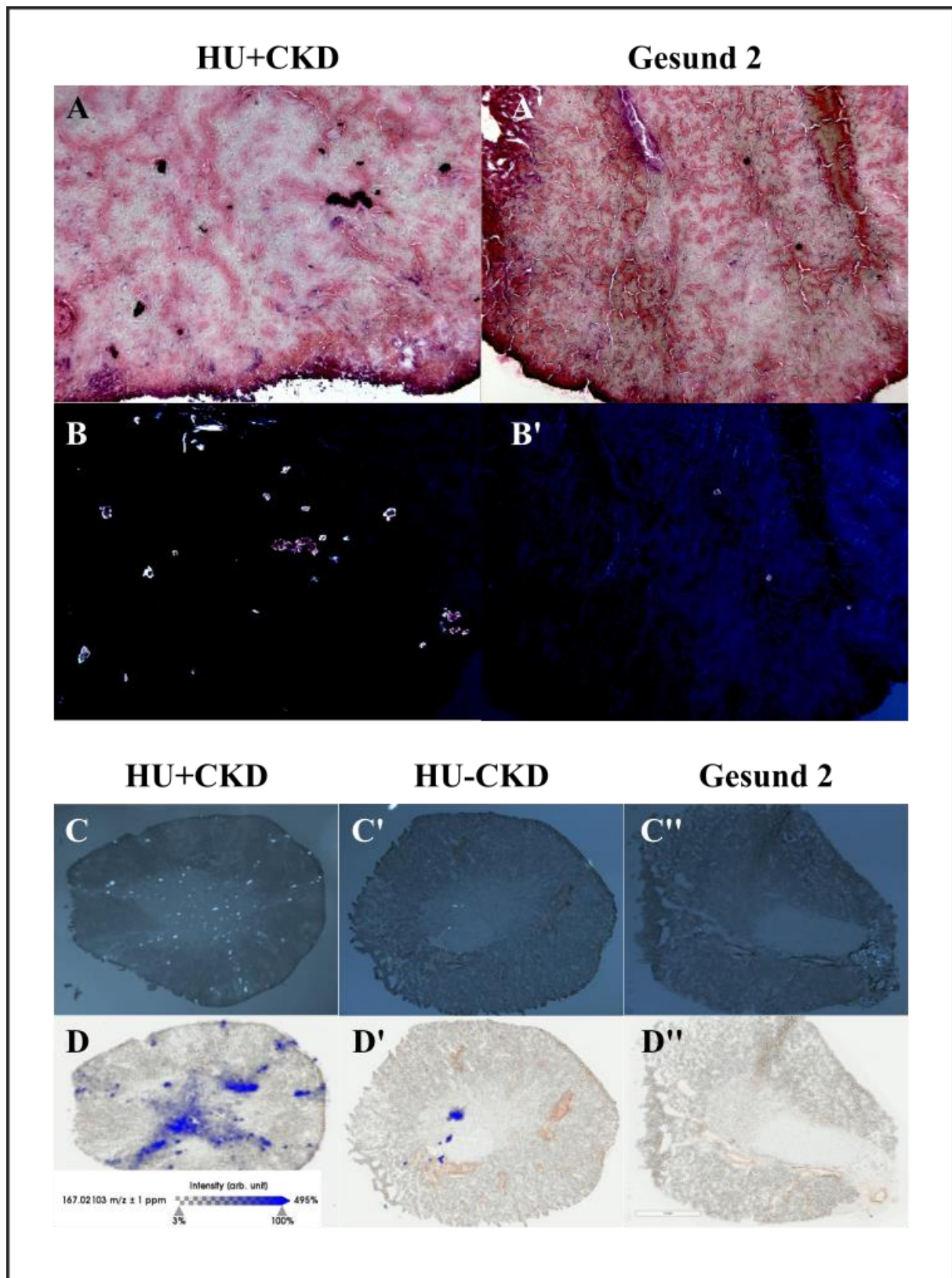


Abbildung 22: Harnsäurekristallablagerungen in den Nieren.

HE gefärbte Kryoschnitte der Nieren unter dem Lichtmikroskop (A) und dem Polarisationsmikroskop (B) unter Verwendung des 10x-Objektivs. Aufnahmen der Nierenschnitte unter dem Polarisationsmikroskop (C) und Überlagerung mit MALDI-MS-Bildern zur Darstellung der Verteilung der Harnsäure (m/z 167.02103 D) (D) [29].

3.2.3. Hyperurikämie mit Kristallurie verursacht einen Tubulusschaden, eine Entzündungsreaktion und Granulombildung in Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox} Mäusen

Nach Entnahme der Nieren an Tag 32 war ein offensichtlicher morphologischer Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar. Die Nieren der Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox} Tiere, die mit fettreichem Futter und Inosin ernährt worden waren (HU+CKD), waren klein, von gelblicher Farbe und die Oberflächen uneben und knotig durchsetzt (Abb. 23A). Dagegen wiesen die Nieren der Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox} Tiere mit Chow+Inosin Diät (HU-CKD) sowie die Glut9^{lox/lox} Mäuse mit Chow-Inosin Diät (Gesund 2) eine glatt-glänzende Oberfläche von rotbrauner Färbung auf (Abb. 23A).

Diese bereits makroskopisch sichtbaren Unterschiede in der strukturellen Schädigung waren auch in der PAS-Färbung histologischer Paraffinschnitte der Nieren deutlich zu erkennen (Abb. 23B+C). Während das Nierenparenchym der HU+CKD Mäuse von zahlreichen fibrotischen Strängen durchsetzt und der Anteil funktionellen Nierengewebes stark reduziert war, zeigten die Nieren der HU-CKD und Gesund 2 Gruppe intaktes Nierengewebe ohne strukturelle Auffälligkeiten oder Schäden. Zusätzlich waren in der PAS-Färbung der Nieren von HU+CKD Mäusen deutlich mehr PAS-positive tubuläre Casts und Strukturen einer granulomatösen interstitiellen Nephritis erkennbar (Abb. 23C), was letztlich mit einem Verlust an funktionellem Nierengewebe einhergeht. Darüber hinaus kam es in den Nieren der HU+CKD Tiere zu einer signifikanten Hochregulation von *Kim-1* als Ausdruck einer vermehrten Nierenschädigung (Abb. 23D).

In den Nieren der HU+CKD Mäuse konnte zudem eine verstärkte Inflammation im Vergleich zu den asymptomatischen bzw. gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. So war etwa das proinflammatorische Zytokin *Il-6* in der HU+CKD Gruppe signifikant höher exprimiert als in allen anderen Gruppen (Abb. 24A). Ebenso war die Expression von *Tnfa* in den Nieren der hyperurikämischen Mäuse mit manifester CKD signifikant höher als in den drei anderen Gruppen (Abb. 24B). In der Expression von *Il-10* konnte ein signifikanter Unterschied nur zwischen den normal ernährten Knockout-Tieren und den fettreich ernährten Wildtyp-Mäusen (Gesund 1) festgestellt werden. Kein signifikanter Unterschied bestand dagegen im Vergleich aller anderen Gruppen (Abb. 24C). Bei der Analyse der Expression von *Il-4* und *Il-13* wurden nur drei Gruppen untersucht, das heißt die beiden Knockoutfraktionen (HU+CKD, HU-CKD) und die normal ernährten Wildtyp-Mäuse (Gesund 2). Hier zeigten sich in der Höhe der Expression des Zytokins *Il-4* keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Abb. 24D).

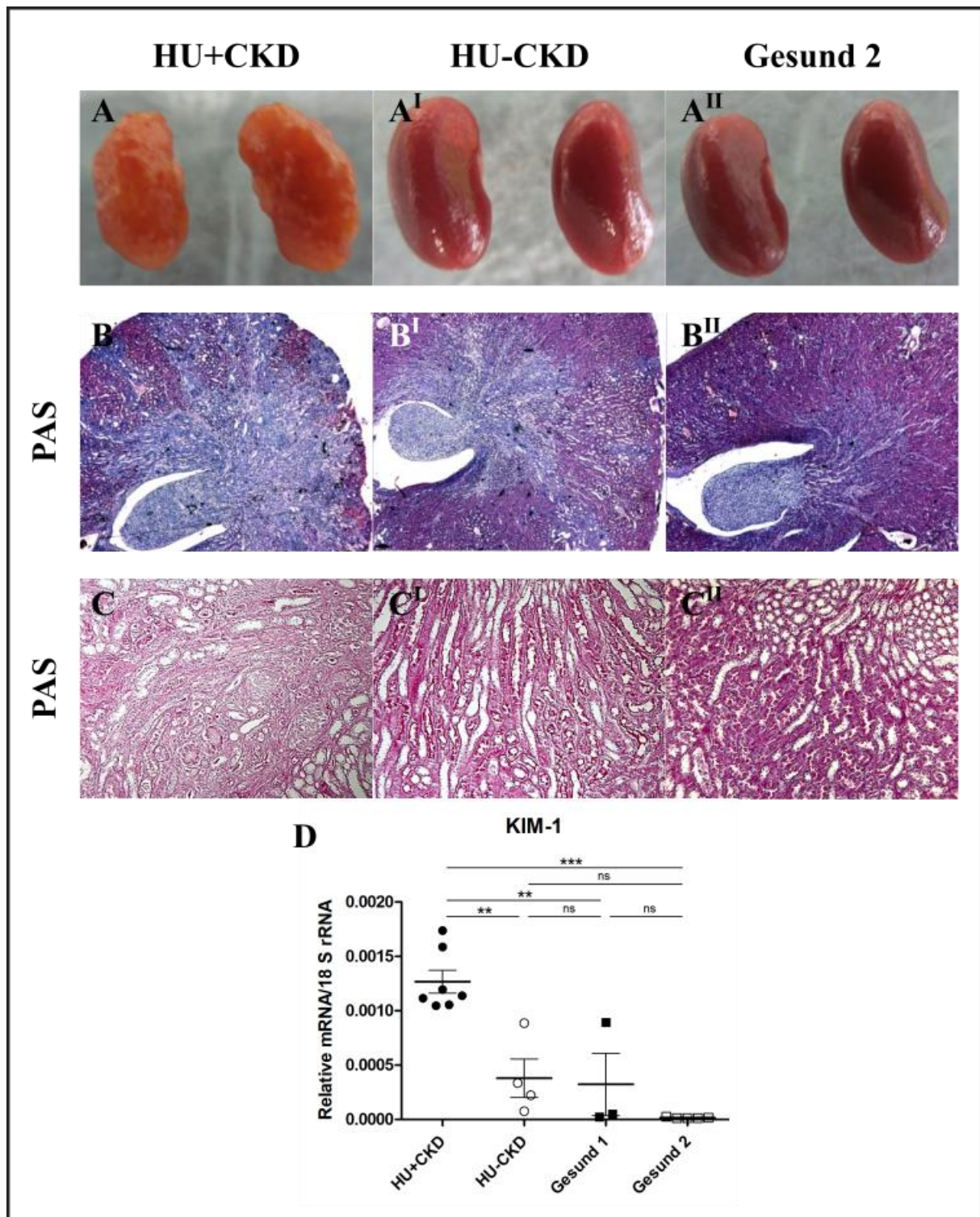


Abbildung 23: Strukturelle Nierenschädigung der Alb-creERT2:Glut9^{lox/lox} Mäuse unter Gabe einer fettreichen Diät mit Inosin.

Repräsentative makroskopische Bilder der Nieren (A) und mikroskopische Bilder von Nierenschnitten in der PAS-Färbung unter Verwendung des 2,5x-Objektivs (B) und Detailaufnahmen mit Hilfe des 10x-Objektivs (C) von Mäusen mit Alb-creERT2:Glut9^{lox/lox} Mäusen mit und ohne HFD, sowie von Glut9^{lox/lox} Tieren unter normaler Ernährung. Expressionsmuster des Nierenschädigungsmarkers *KIM-1* mittels qRT-PCR (D). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, n=3-7.

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). [29]

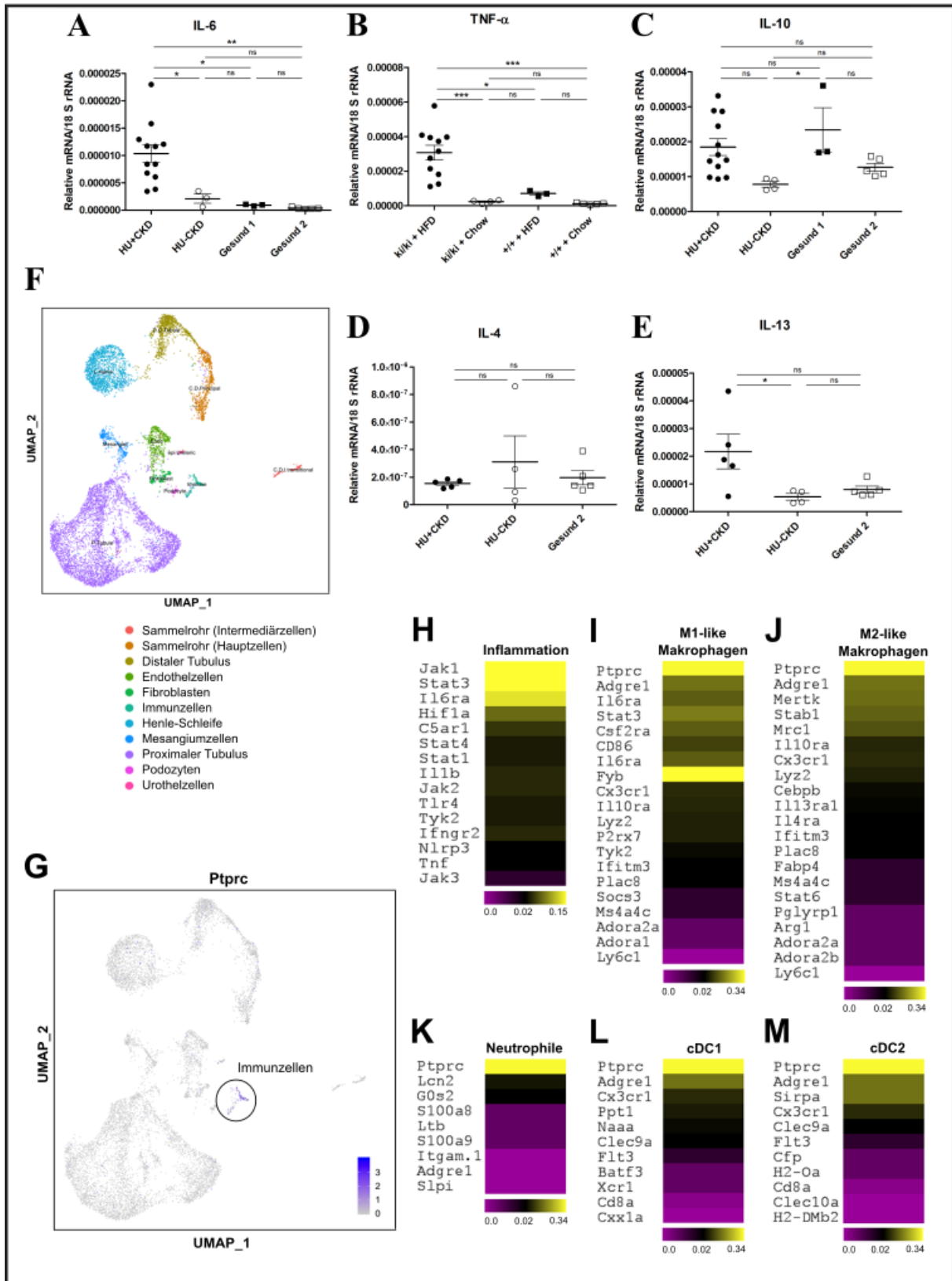


Abbildung 24: Gesteigerte Inflammation in den Nieren der HU+CKD Mäuse.

Expressionsmuster verschiedener Zytokine mit einer wichtigen Rolle in der Inflammation mittels qRT-PCR: *Il-6* (A), *Tnf- α* (B), *Il-10* (C), *Il-4* (D) und *Il-13* (E). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=7. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). RNA-Einzelzellanalyse der Nieren von HU+CKD Mäusen an Tag 32. 12 Cluster von Zelltypen wurden identifiziert und als UMAP dargestellt (F). Identifizierung des Immunzellclusters durch Messung der Expression von *Ptprc* (CD45) und Darstellung als UMAP (G). Heatmaps zur Darstellung spezifischer Gene innerhalb des Immunzellclusters: Inflammatorische Signalwege (H), M1-like Makrophagen (I), M2-like Makrophagen (J), Neutrophile Granulozyten (K) sowie Subtypen der Dendritischen Zellen cDC1 (L) und cDC2 (M). [29]

Die Expression von *Il-13* war in der HU+CKD Gruppe signifikant höher als in den HU-CKD Mäusen. Lediglich tendenziell höher war sie dagegen im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe Gesund 2. Zwischen den beiden normal ernährten Gruppen konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 24E).

Im nächsten Schritt führten wir eine RNA-Einzelzellanalyse von Nieren der HU+CKD Mäuse an Tag 32 durch. Hierbei konnten wir 12 Cluster von verschiedenen Zelltypen identifizieren, Zellen des renalen Parenchyms, aber auch eingewanderte Immunzellen (Abb. 24F). Die Leukozyten exprimierten hierbei erwartungsgemäß *Ptprc* (CD45) (Abb. 24G). Darüber hinaus verwendeten wir bekannte Gene zur Identifizierung von Signalwegen, die im Rahmen einer Inflammationsreaktion wichtig sind (z.B. JAK/STAT-Signalweg), und von verschiedenen Untergruppen der Immunzellen, wie beispielsweise M1- bzw. M2-like Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen (Abb. 24H-M). Diese Daten legen nahe, dass es im Rahmen der chronischen Uratnephropathie zu einer chronischen Entzündung mit Infiltration von Immunzellen kommt. [29]

Auf den PAS gefärbten Nierenschnitten konnte neben dem Ausmaß der allgemeinen Nierenschädigung noch ein weiterer wichtiger Unterschied detektiert werden. In den Nieren der *Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox}* Mäuse, die mit einer fettreichen Diät gefüttert worden waren, waren zahlreiche Granulome zu sehen, die hauptsächlich im Nierenmark lokalisiert waren. In der Nierenrinde konnten nur in Ausnahmefällen Granulome nachgewiesen werden. Innerhalb eines Granuloms gruppierten sich die zellulären Anteile um einen zentral gelegenen Hohlraum (Abb. 25A). Dieser entstand als Artefakt bei der Anfertigung der Paraffinschnitte, da diese eine Behandlung mit Alkohol erforderte, der die vormals vorhandenen Harnsäurekristalle aus den Schnitten herauslöste. Noch eindrücklicher wurden diese zentralen Aussparungen nach Färbung unfixierter Schnitte mit den Fluoreszenzfarbstoffen Phalloidin und DAPI sichtbar (Abb. 25B). In den Nieren der HU+CKD Mäuse konnten signifikant mehr Granulome nachgewiesen werden als in den drei anderen Gruppen (Abb. 25C). Vereinzelt konnten auch Riesenzellen in den Granulomen beobachtet werden. Um die an der Granulomentstehung beteiligten Zellen näher einzugrenzen, wurden weitere immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Hierzu wurden in gefrorenen, fixierten Nierenschnitten von *Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox}* Mäusen mit HFD-Inosin Diät folgende Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt: DBA, LTA, THP und α SMA. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass die Granulome negativ für DBA, LTA, THP und α SMA waren (Abb. 26). Somit konnte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass es

sich bei den Harnsäuregranulomen um aus Myofibroblasten oder tubulären Epithelzellen gebildete Formationen handelte. [29]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Senkung des Urin-pH mittels Gabe einer HFD Diät eine persistierende asymptotische Hyperurikämie in eine chronische Uratnephropathie (symptomatische Hyperurikämie) übergeht, welche durch eine granulomatöse interstitielle Nephritis gekennzeichnet ist.

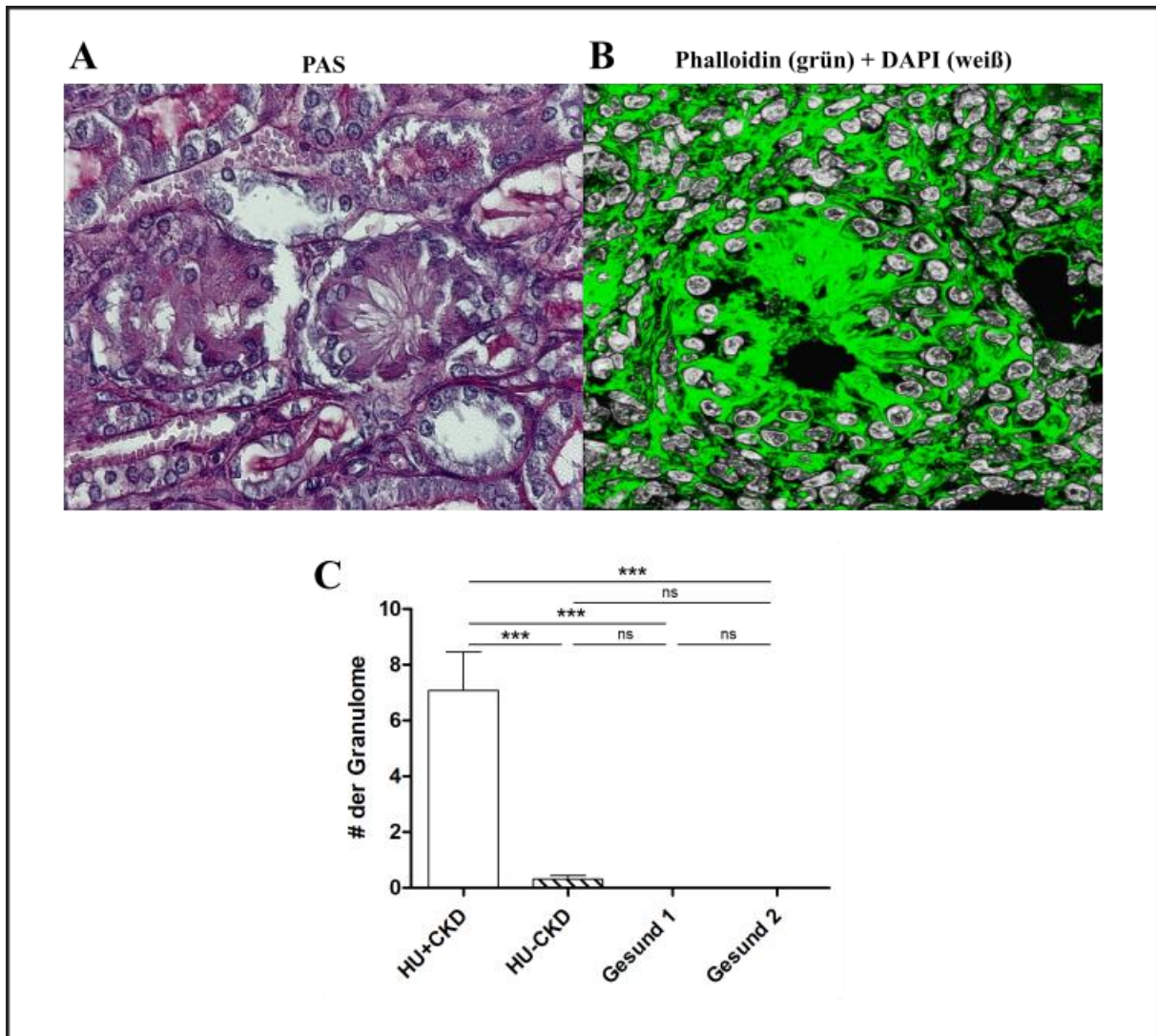


Abbildung 25: Granulombildung in den Nieren von Alb-creERT2:Glut9^{lox/lox} Mäusen mit HFD.

Repräsentative Detailaufnahmen von Granulomen in einem PAS-gefärbten Paraffinschnitt (A) und auf einem Kryoschnitt, der mit den Fluoreszenzfarbstoffen Phalloidin (Aktinfilamente) und DAPI (Zellkerne) gefärbt worden ist (B). Darstellung der Anzahl der Granulome pro Nierenschnitt in den vier Gruppen HU+CKD, HU-CKD, Gesund 1 und Gesund 2 (C). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, n=6. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (*one-way* ANOVA mit Tukey's post-doc Test). [29]

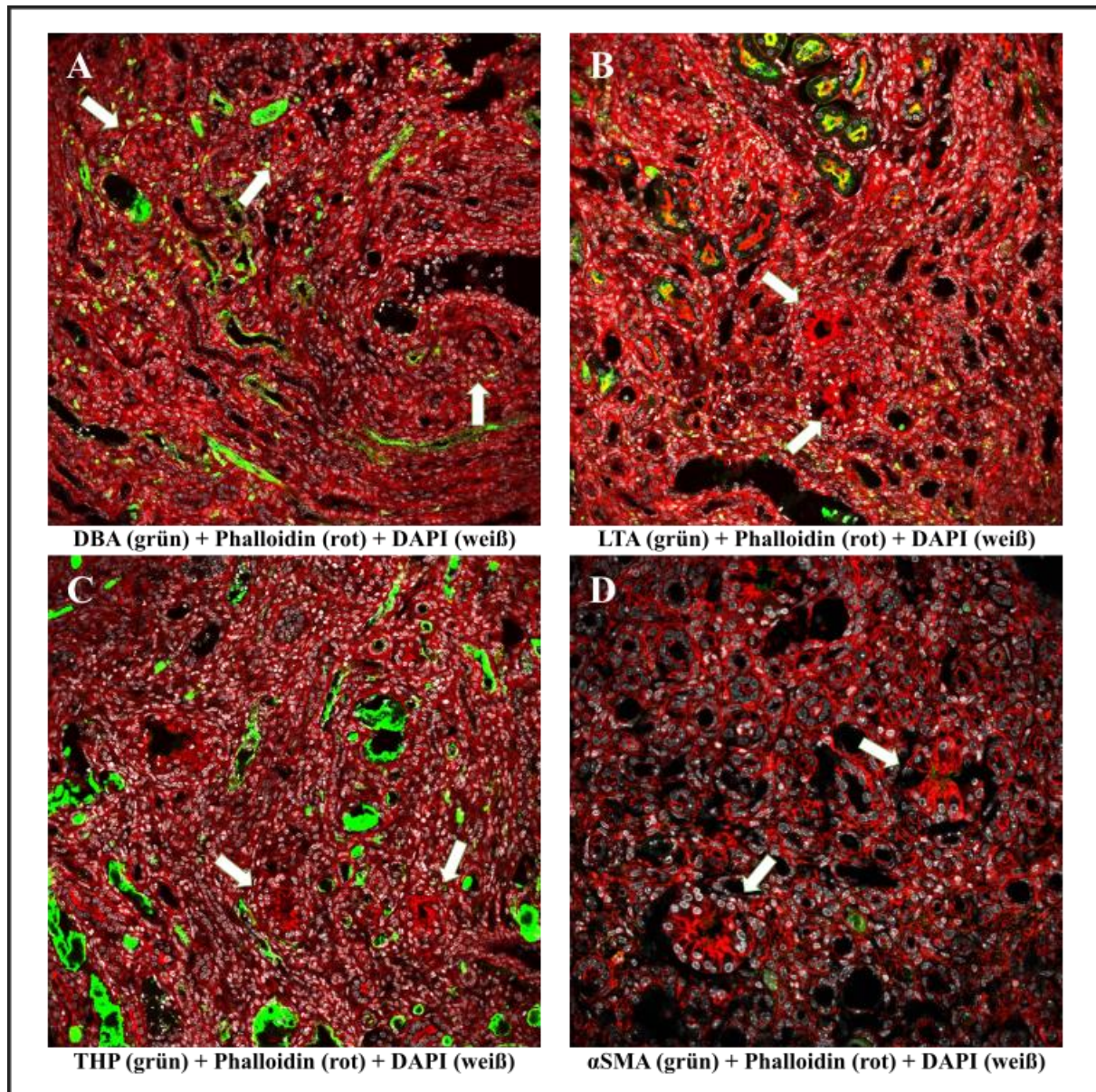


Abbildung 26: Myofibroblasten oder tubuläre Epithelzellen sind kein Bestandteil renaler Harnsäuregranulome. Repräsentative Detailaufnahmen von Granulomen auf Kryoschnitten, die mit folgenden Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt worden sind: DBA (distale Tubuli, A), Phalloidin (Aktinfilamente), DAPI (Zellkerne), LTA (proximale Tubuli, B), THP (dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife, C) und α SMA (Myofibroblasten, D). Granulome sind durch weiße Pfeile markiert. [29]

3.2.4. Harnsäurekristall-Granulome bilden sich nach Manifestation einer interstitiellen Fibrose in Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen

Ob Harnsäurekristall-Granulome sich vor oder nach Manifestation einer CKD bzw. interstitiellen Fibrose bilden ist bisher unklar. Um dies zu untersuchen, wurde die Bildung von Harnsäure-Kristallgranulomen bei Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen mit HFD-Inosin Diät zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 0, 15, 32) evaluiert. Die mRNA Expressionswerte profibrotischer Gene zeigten, dass HU+CKD Mäuse signifikant erhöhte mRNA Expressionswerte von *Collagen1a1*,

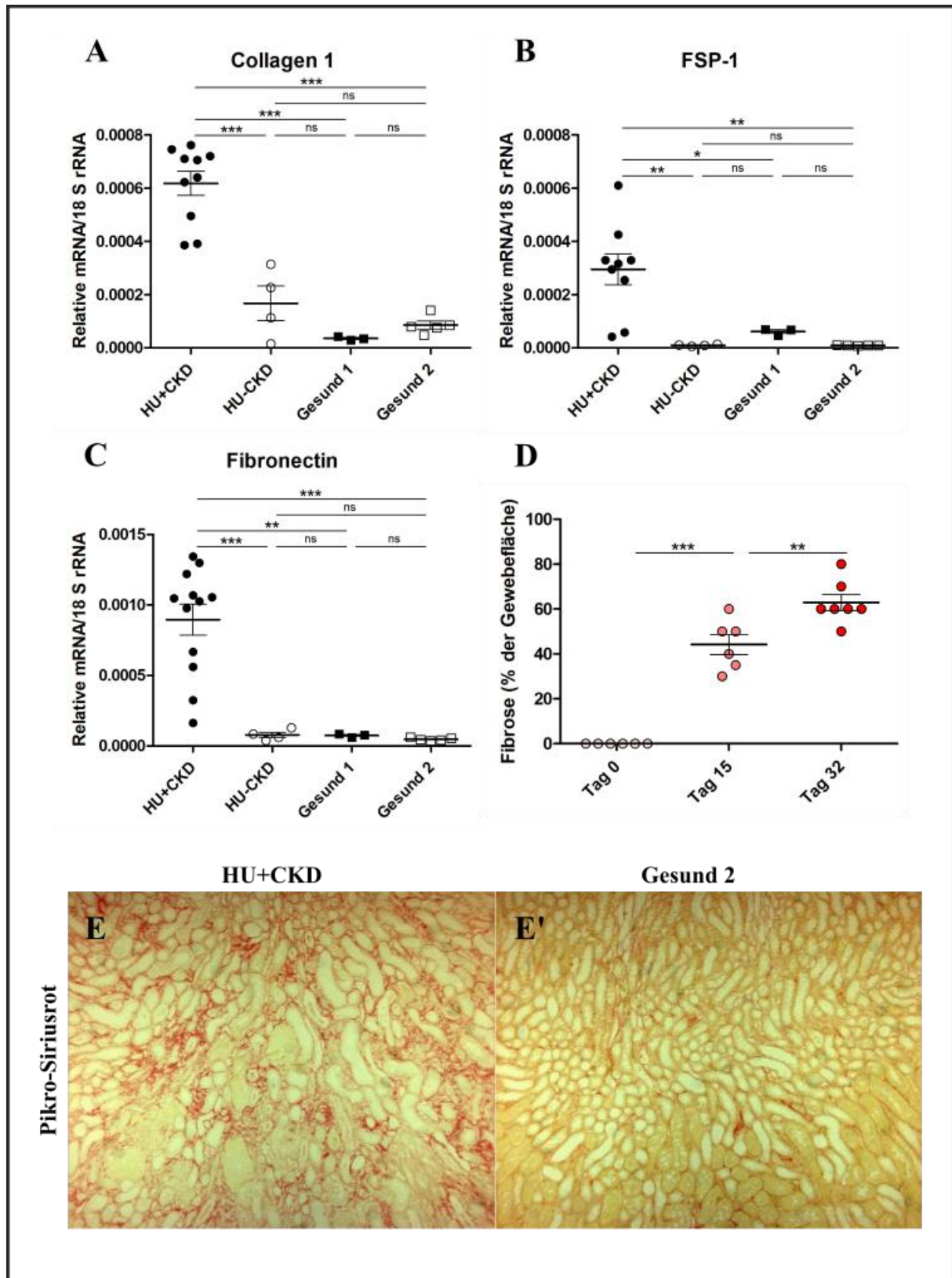


Abbildung 27: Gesteigerte Fibrose in den Nieren der hyperurikämischen Mäusen mit CKD.

Nachweis der Hochregulation profibrotischer Gene wie *Collagen 1* (A), *Fsp-1* (B) sowie *Fibronectin* (C) mittels qRT-PCR in den Nieren der Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen mit HFD. Zunehmende Fibrosierung der Nieren über die Zeit in der HU+CKD-Gruppe (D). Repräsentative Bilder der vermehrten Kollagenablagerungen an Tag 32 in der HU+CKD-Gruppe im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, angefärbt durch Picro-Siriusrot (E). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). [29]

Fsp-1 und *Fibronectin 1* im Vergleich zu den anderen drei Gruppen (HU-CKD, Gesund 1 und Gesund 2) aufwiesen (Abb. 27A-C).

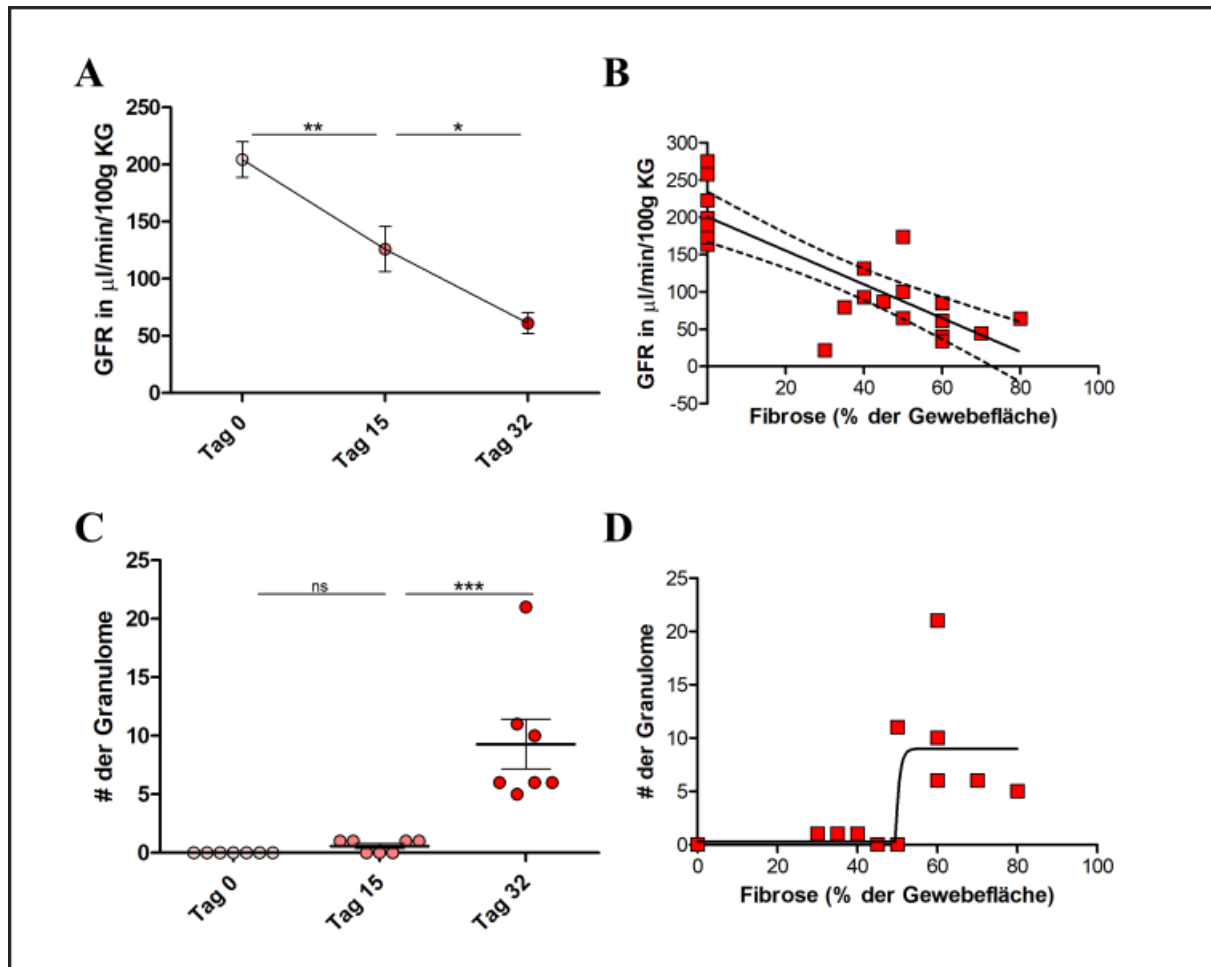


Abbildung 28: Renale Harnsäure-Granulome entstehen nach Manifestation einer Fibrose.

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen an Nieren von Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen unter HFD: Darstellung der Glomerulären Filtrationsrate über die Zeit (A) und Korrelation von GFR mit Fibrose (B). Anzahl der renalen Granulome (C) und deren Korrelation mit der Fibrose (D). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=6. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). [29]

Kollagenablagerungen auf Nierenschnitten wurden mittels Piko-Siriusrot immunhistochemisch quantifiziert. Hierbei zeigte sich im Zeitverlauf eine stärkere Positivität für Piko-Siriusrot und damit der Nachweis einer progredienten interstitiellen Fibrose in den Nieren der HU+CKD Mäusen (Abb. 27D). Dagegen kam es in den Nieren der gesunden Kontrolltiere nur in einem geringen Ausmaß zu Kollagenablagerungen (Abb. 27E). Interessanterweise trat die Fibrose nicht nur in den Bereichen auf, die den Granulomen unmittelbar benachbart waren, sondern schloss das gesamte Nierenparenchym mit ein. Die progrediente Fibrose ging einher mit einer deutlich eingeschränkten GFR (Abb. 28A). Eine lineare Regressionsanalyse zwischen GFR und Fibrosegrad zeigte eine lineare negative Korrelation (Abb. 28B). Interessant war, dass obwohl an Tag 15 bereits eine deutlich eingeschränkte Nierenfunktion und eine ausgeprägte

renale Fibrose vorlagen, die Anzahl der Granulome in den Nieren der HU+CKD Mäuse noch relativ gering war im Vergleich zu Tag 32 (Abb. 28C). Die statistische Analyse des Zusammenhangs zwischen der Anzahl der Granulome und dem Ausmaß der Fibrose ergab keine lineare Korrelation (Abb. 28D). Es scheint vielmehr so zu sein, dass es bereits einer deutlich fortgeschrittenen Fibrose bedarf, ehe die Bildung der Granulome überhaupt beginnt.

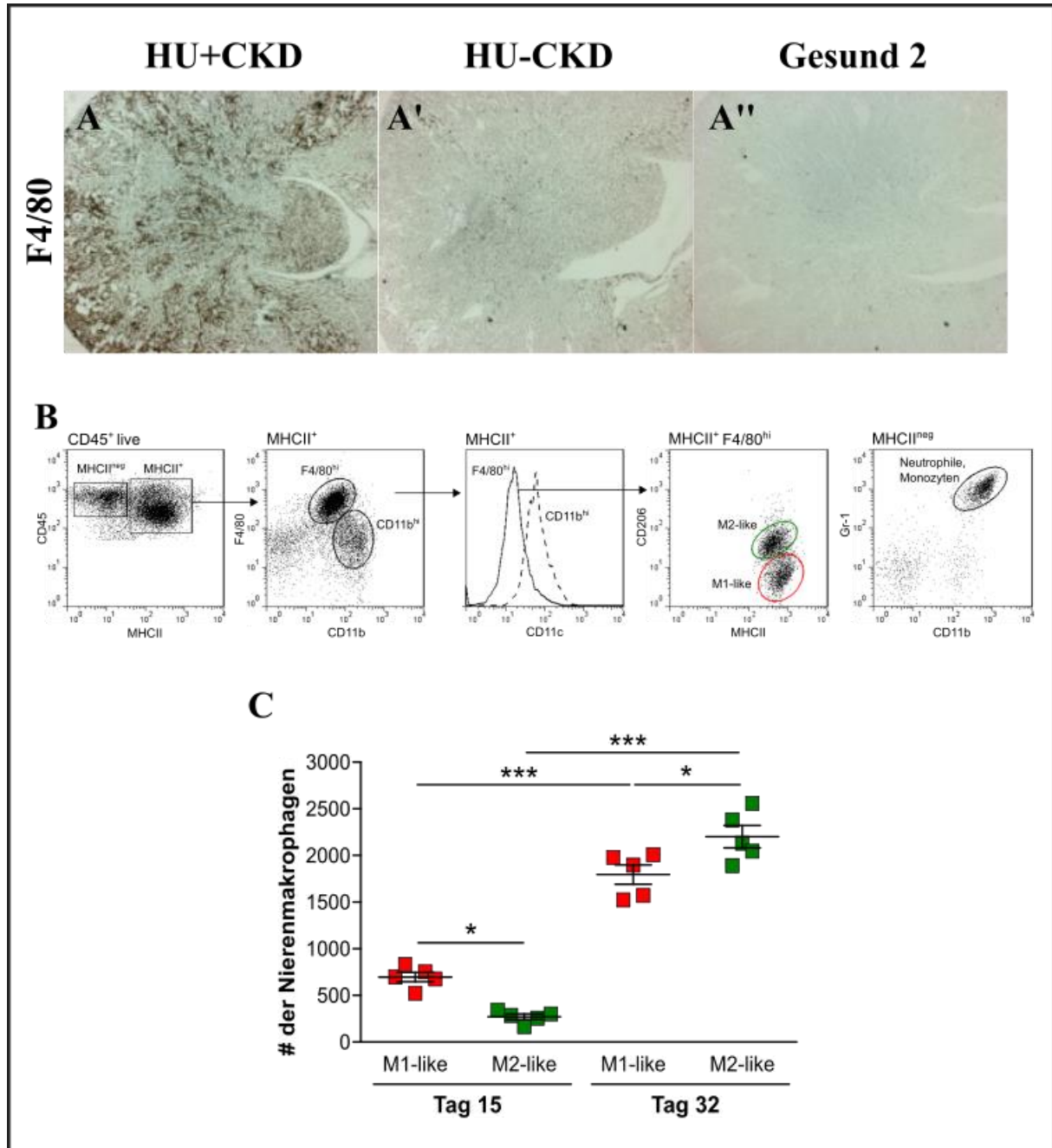


Abbildung 29: Makrophagen-Infiltration in die Nieren von Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox} Mäusen.

F4/80-Färbung von Nierenschnitten zeigt eine verstärkte Infiltration von F4/80⁺-Zellen in die Nieren von HU+CKD (A) im Vergleich zu HU-CKD (A') und Gesund 2 (A''). Darstellung der Gating-Strategie zur Identifizierung von Makrophagen, M1, M2, Neutrophilen und Monozyten (B). Absolute Anzahl der M1- bzw. M2-Makrophagen an Tag 15 und Tag 32. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). [29]

Nach der Entnahme der Nieren wurden zudem Paraffinschnitte angefertigt und diese immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen F4/80, einem Marker für Makrophagen und Monozyten gefärbt. Hierbei wurde eine starke Infiltration von F4/80 positiven Zellen, das heißt Makrophagen, in die Nieren der HU+CKD Mäuse sichtbar. Weniger ausgeprägt war die Einwanderung F4/80 positiver Zellen in den Nieren der HU-CKD Tiere, während in der Gesund 2 Gruppe nur vereinzelte Makrophagen nachgewiesen werden konnten (Abb. 29A). Zur genaueren Differenzierung der eingewanderten Makrophagen wurde eine Analyse der Nieren von HU+CKD Tieren mittels Durchflusszytometrie angeschlossen (Abb. 29B). Hierbei zeigte sich an Tag 15 ein Überwiegen der M1-like Makrophagen, während an Tag 32 die Mehrzahl der Makrophagen M2-polarisiert war (Abb. 29C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine zugrundeliegende interstitielle Fibrose die Voraussetzung für die Bildung von Harnsäure-Kristallgranulomen in der Niere ist. Diese Harnsäure-Kristallgranulome tragen dann wiederum zur Progression der CKD bei. Da an Tag 15 bei noch kaum vorhandenen Granulomen überwiegend M1-like Makrophagen nachgewiesen werden konnten, scheinen diese möglicherweise in die Ausbildung der Granulome involviert zu sein.

3.3. JAK/STAT Inhibition mit Tofacitinib hat keinen Einfluss auf die Granulombildung und Progression der chronischen Uratnephropathie

Auf der Suche nach geeigneten therapeutischen Strategien zur Behandlung einer persistierenden Entzündung bei der chronischen Uratnephropathie wurden die zellulären Signalwege häufiger Erkrankungen, die zu einer CKD führen, analysiert. Die mittels Microarray durchgeführte Expressionsanalyse humaner Gene ergab, dass in die Entstehung einer CKD unabhängig von der zugrundeliegenden Erkrankung insbesondere inflammatorische Gene des JAK/STAT-Signalwegs involviert sind, z.B. *STAT 1*, *IL-4R*, *IL13-RA1*, *IL-6R*, *IL-13* und *INF- γ* (Abb. 30). [29] Aus diesem Grund erscheint eine Modulation dieses wichtigen Signalwegs als eine mögliche therapeutische Option. Ein Wirkstoff, der in den JAK/STAT-Signalweg eingreift, ist Tofacitinib. Tofacitinib ist ein potenter Inhibitor der Januskinasen und als solcher verhindert er die IL-4-getriggerte und JAK-abhängige Phosphorylierung von STAT [110]. Diese Wirkung wird aktuell in der Klinik bei der Behandlung verschiedener, insbesondere entzündlicher Erkrankungen eingesetzt [111] [112].

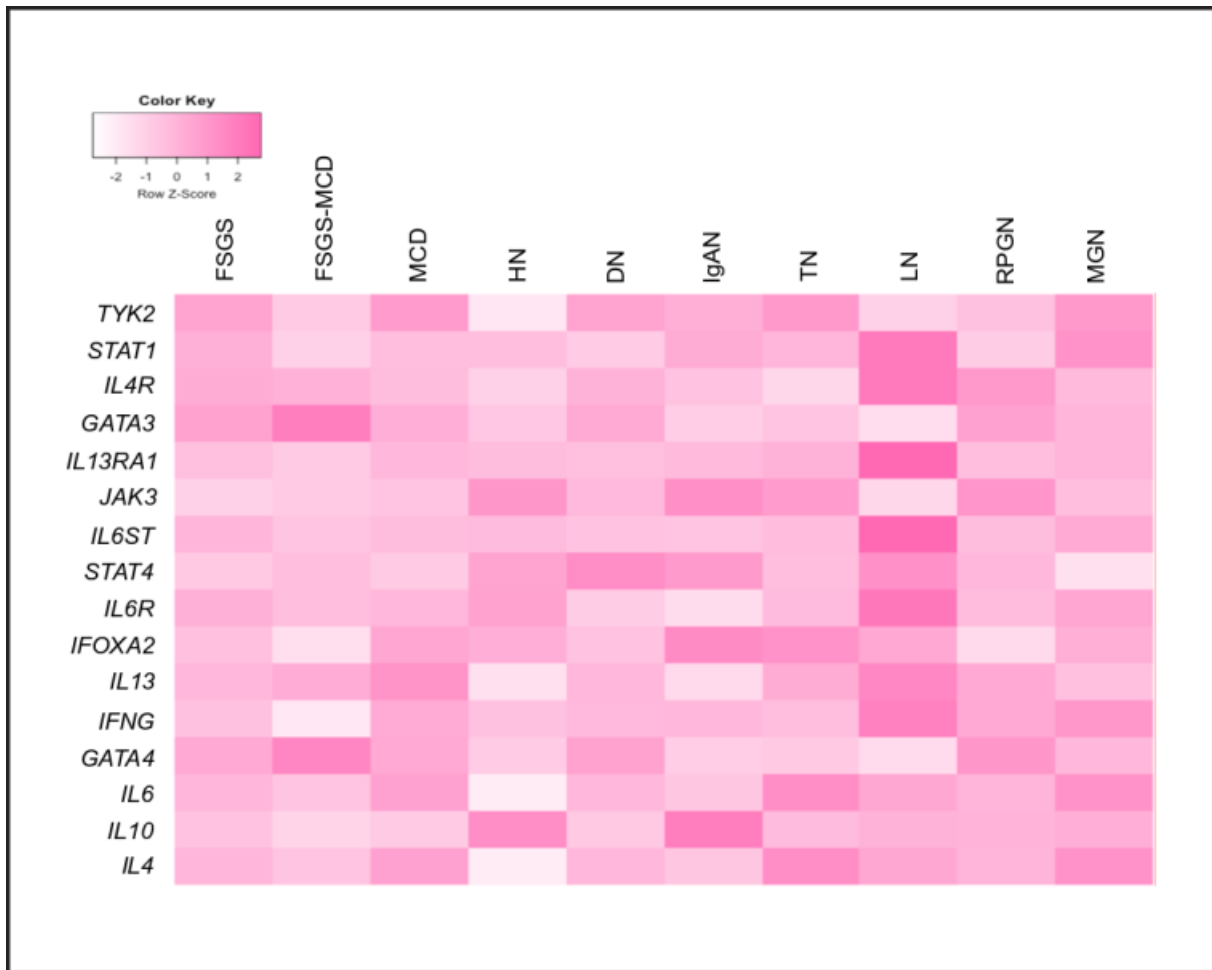


Abbildung 30: Involvement des JAK/STAT-Signalwegs in die Entstehung einer CKD unabhängig von der Genese. Dargestellt ist die normalisierte Expression inflammatorischer Gene im Rahmen unterschiedlicher Nierenerkrankungen, die zu einer CKD führen. Exemplarisch gezeigt sind die fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS), die minimal-change Glomerulonephritis (MCD), die hypertensive Nephropathie (HN), die diabetische Nephropathie (DN), die IgA-Nephropathie (IgAN), die Lupus-Nephritis (LN), die rapidly progressive Glomerulonephritis (RPGN), die membranöse Glomerulonephritis (MGN), sowie Daten von Patienten mit einem Mischbild aus FSGS und MCD (FSGS-MCD). Als Kontrolle wurde gesundes Nierengewebe verwendet, das bei Tumornephrektomien gewonnen worden war (TN). Die Daten entstammen öffentlich zugänglichen Affymetrix® Human Genome Arrays. [29]

Unsere *in vitro* Daten belegen, dass durch die Gabe von Tofacitinib die Riesenzellbildung aus Makrophagen inhibiert werden kann (s. 3.1.1.1.). Um zu untersuchen, ob Tofacitinib über diesen Mechanismus erreichen kann, die Granulomentstehung und somit die Progression der chronischen Uratnephropathie zu verlangsamen, wendeten wir das Medikament in unserem Mausmodell an.

Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen wurde für zwei Wochen eine HFD+Inosin gefüttert, um eine Hyperurikämie-assoziierte chronische Niereninsuffizienz zu verursachen. Ab Tag 15 wurden die Mäuse täglich mit Tofacitinib oder Wasser gavagiert. Serum IL-6 und Harnsäurespiegel

sowie die Nierenfunktion (Harnstoff-Stickstoff (BUN) und GFR) wurden bestimmt und histologische Färbungen an Nierenschnitten bezüglich Entzündung und Fibrose durchgeführt. Die Quantifizierung von Immunzellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Aufgrund der bekannten antiinflammatorischen Wirkung von Tofacitinib begannen wir unsere *in vivo* Untersuchung mit der Analyse der Serumspiegel des Entzündungsmarkers IL-6 unter Behandlung. Im Vergleich mit dem Ausgangswert vor Start der Tofacitinib-Therapie trat keine signifikante Änderung des IL-6-Spiegels im Serum der Versuchsgruppe auf, während er im Serum der unbehandelten Kontrolltiere stark anstieg (Abb. 31). Dies bewirkte, dass nach 32 Tagen der Serumspiegel von IL-6 unter Tofacitinib-Gabe signifikant niedriger war als in der unbehandelten Kontrolle (20 ± 10 pg/ml vs. 120 ± 30 pg/ml, $p < 0,01$). Tofacitinib zeigte also auch in unserem Tiermodell seine vorbeschriebene antiinflammatorische Wirkung.

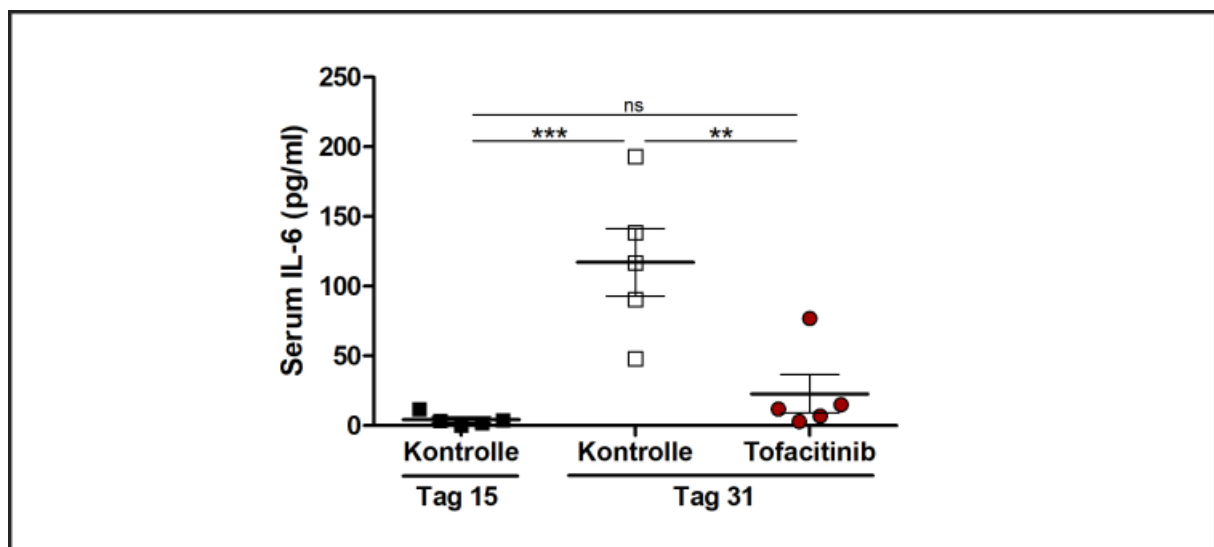


Abbildung 31: Tofacitinib bewirkt eine Reduktion des IL-6-Spiegels im Serum.

IL-6-Spiegel im Serum von Alb-creERT2;*Glut9^{lox/lox}* Mäusen mit und ohne Behandlung mit Tofacitinib an Tag 15 und 31. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n=5$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (*one-way* ANOVA mit Tukey's post-doc Test). [29]

An Tag 31 unterschieden sich in beiden Gruppen weder der Serumspiegel der Harnsäure noch der BUN (Abb. 32A+B). Die GFR fiel über die ersten zwei Wochen in beiden Gruppen erwartungsgemäß als Ausdruck einer sich entwickelnden Niereninsuffizienz signifikant ab. Zwischen der mit Tofacitinib behandelten Gruppe und der unbehandelten Kontrolle bestand weder an Tag 0 noch an Tag 15 oder Tag 31 ein signifikanter Unterschied (Abb. 32C).

Eine Behandlung mit Tofacitinib führte demnach zu keiner Änderung der Nierenfunktion und hatte keinen Einfluss auf die Progression der CKD.

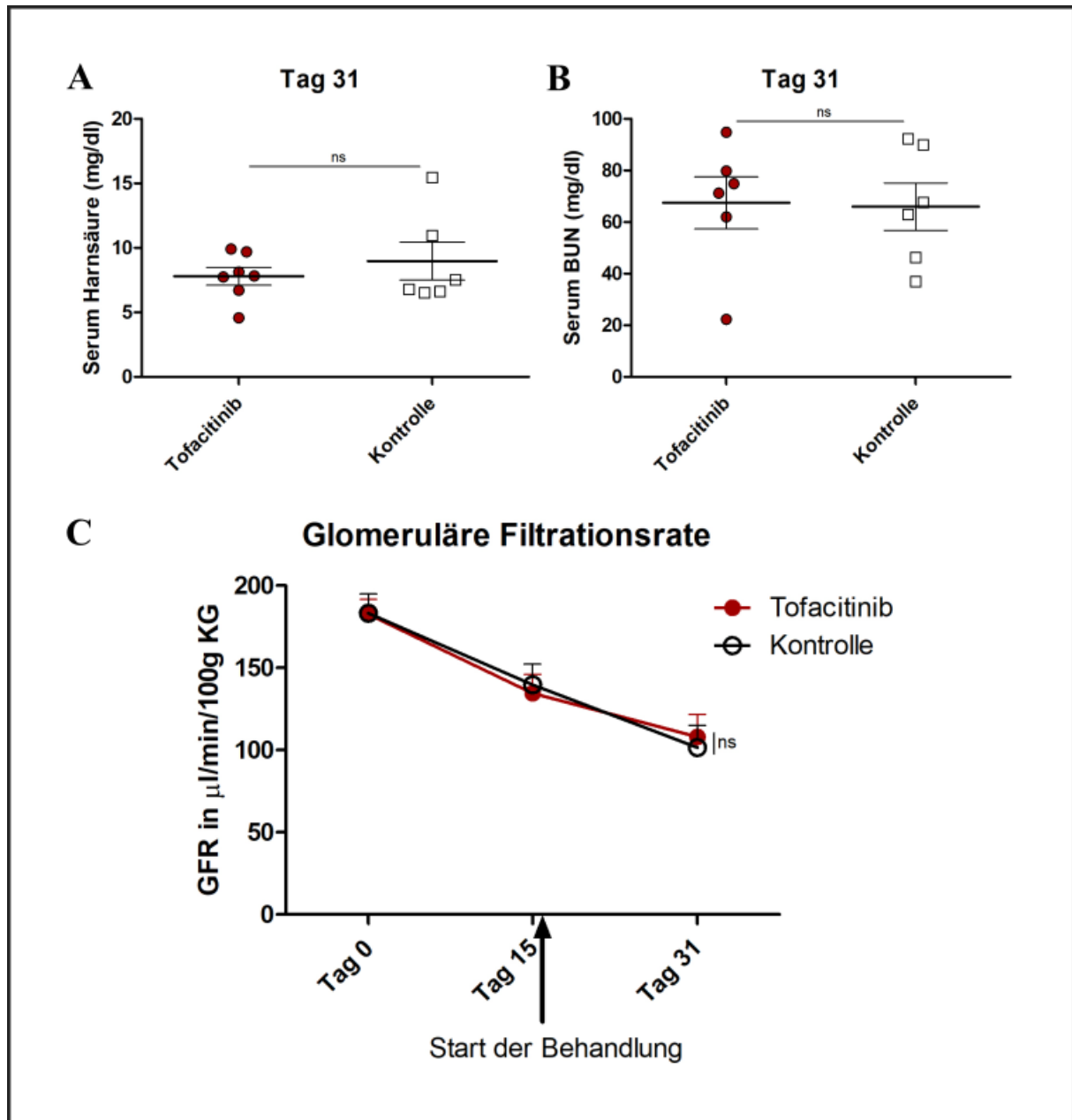


Abbildung 32: Tofacitinib beeinflusst den Verlauf der CKD nicht.

Glomeruläre Filtrationsrate (A), sowie Harnsäurespiegel (B) und BUN (C) im Serum von Alb-creERT2;*Glut9^{lox/lox}* Mäusen mit und ohne Behandlung mit Tofacitinib. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=6. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (unverbundener Student's T-Test). [29]

Von den Nieren der Alb-creERT2;*Glut9^{lox/lox}* Mäuse wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit PAS, HE sowie mit Silber gefärbt. Anschließend wurden an den Schnitten der PAS-Score, der Grad der Fibrosierung und die Anzahl der Granulome bestimmt.

Es zeigte sich, dass unter der Behandlung mit Tofacitinib nach 31 Tagen kein Unterschied im Hinblick auf den mit Hilfe des PAS-Scores quantifizierten Nierenschaden zu finden war (Abb.

33A+B). Auch im Grad der Fibrose und der Anzahl der renalen Granulome unterschieden sich die mit Tofacitinib behandelte Gruppe und die Kontrolltiere nicht (Abb. 33C+D).

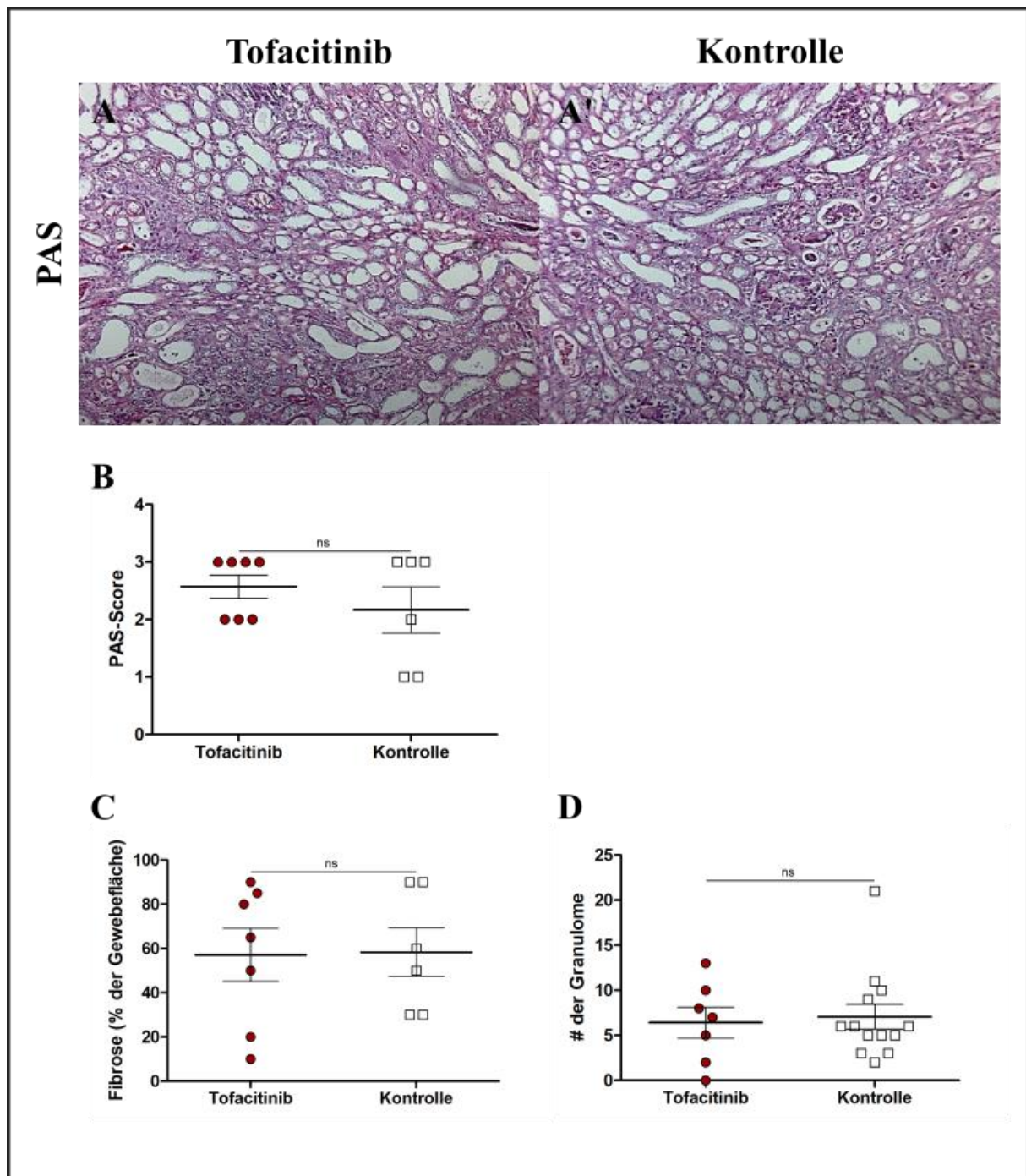


Abbildung 33: Tofacitinib beeinflusst die strukturelle Schädigung der Nieren nicht.

Repräsentative Bilder von HE-gefärbten Schnitten der Nieren nicht behandelter und behandelter Tiere unter Verwendung des 10x-Objektivs (A). Semi-quantitative Angabe der Nierenschädigung mittels PAS-Score (B), Fibrosegrad (C) und Anzahl von Granulomen (D) in den Nieren von Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen mit und ohne Behandlung mit Tofacitinib. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, n=8. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (unverbundener Student's T-Test). [29]

Durch die Therapie mit Tofacitinib wurde der strukturelle Umbau des Nierengewebes im Rahmen der Uratnephropathie nicht beeinflusst. Der Grad der Fibrosierung und die Anzahl der entstandenen Granulome entsprachen der Kontrollgruppe.

Neben der strukturellen Beurteilung der Nieren der Alb-creERT2:*Glut9*^{lox/lox} Mäuse wurde ein Teil des Nierengewebes wie oben beschrieben für die Durchflusszytometrie vorbereitet, um die verschiedenen renalen Leukozytenpopulationen zu bestimmen.

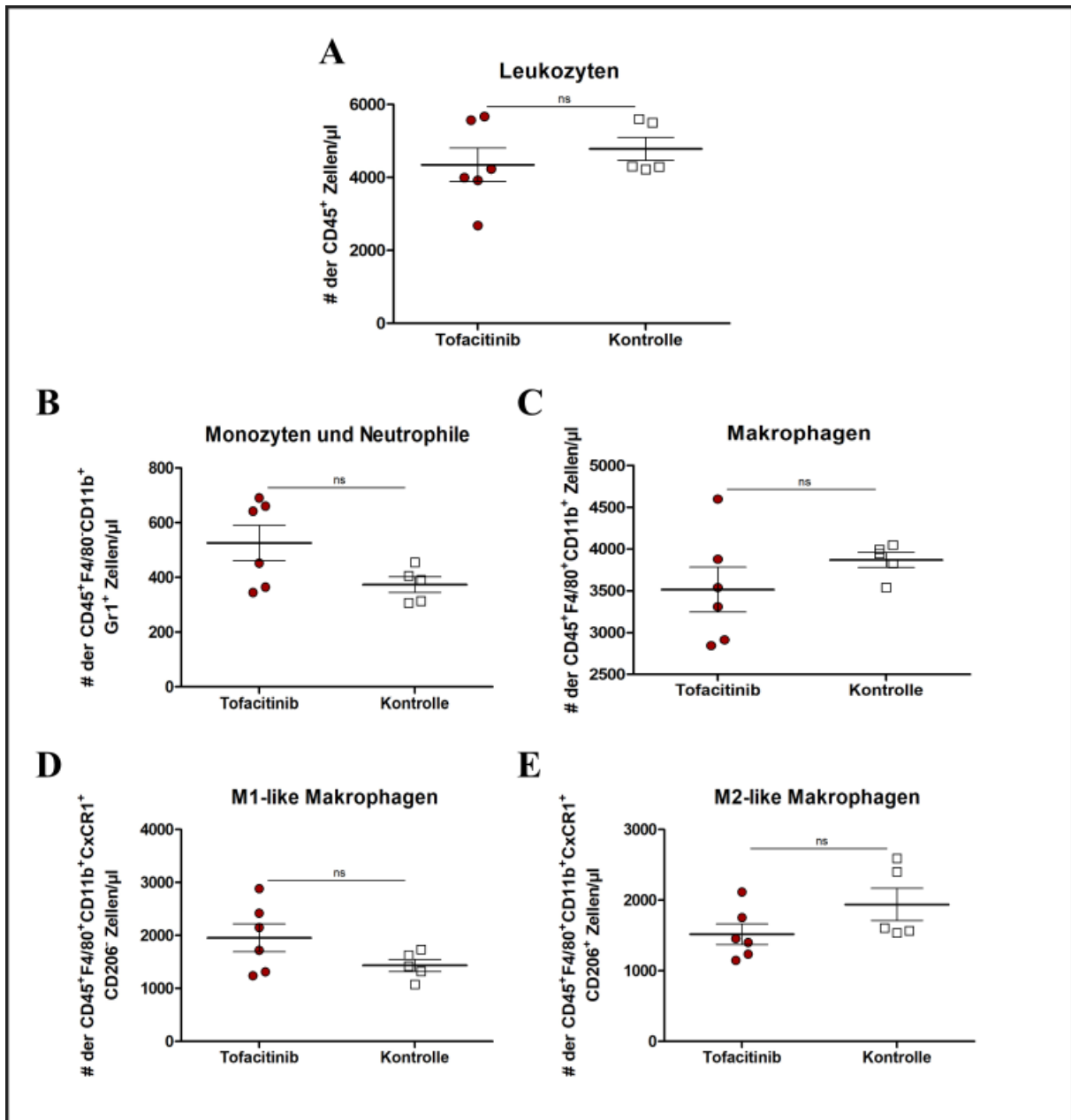


Abbildung 34: Tofacitinib hat keinen Einfluss auf den Makrophagen-Typ in den Nieren.

FACS-Analyse der Nieren von Alb-creERT2:*Glut9*^{lox/lox} Mäusen mit und ohne Behandlung mit Tofacitinib. Untersucht wurde die Anzahl der Leukozyten (A), der Monozyten und Neutrophilen (B), der Gesamt-Makrophagen (C), der M1-like (D) sowie der M2-like (E) Makrophagen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=6. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (unverbundener Student's T-Test). [29]

Nach zweiwöchiger Behandlung mit Tofacitinib zeigten sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzahl der CD45⁺-Zellen, das heißt der gesamten Leukozyten (Abb. 34A). Etwas größer, aber ebenfalls nicht statistisch signifikant war die Anzahl der Monozyten bzw. Neutrophilen Granulozyten (CD45⁺F4/80⁻CD11b⁺Gr1⁺) unter der Therapie mit Tofacitinib (Abb. 34B). Ebenso wenig war die Anzahl der Gesamt-Makrophagen (CD45⁺F4/80⁺CD11b⁺) in der behandelten und der unbehandelten Gruppe unterschiedlich (Abb. 34C). In den Subpopulation der M1-like Makrophagen (CD45⁺F4/80⁺CD11b⁺CxCR1⁺CD206⁻) waren etwas mehr Zellen in den Nieren der Mäuse nachweisbar, die mit Tofacitinib behandelt worden waren, allerdings nicht signifikant (Abb. 34D). Im Gegensatz hierzu befanden sich tendenziell weniger M2-like Makrophagen (CD45⁺F4/80⁺CD11b⁺CxCR1⁺CD206⁺) in den Nieren der behandelten Mäuse (Abb. 34E). Die Behandlung mit Tofacitinib hatte demnach auf keine der renalen Leukozytenpopulationen Auswirkungen in der Größe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung mit Tofacitinib nicht zu einer Beeinflussung der Makrophagen-vermittelten Granulomentstehung oder der Progression der chronischen Uratnephropathie in unserem Mausmodell geführt hat.

3.4. Adenosin-Behandlung von Mäusen mit manifester chronischer Uratnephropathie

Nachdem die Beeinflussung des JAK/STAT-Signalweges nicht zum gewünschten therapeutischen Erfolg der chronischen Uratnephropathie geführt hatte, wählten wir als neuen Angriffspunkt die an der Pathogenese beteiligten Zellen. Hierbei gerieten die Makrophagen in den Fokus, die an der Entstehung der für die Uratnephropathie charakteristischen Harnsäuregranulome hauptsächlich beteiligt sind. Schon seit längerem ist aus *in vitro* Studien bekannt, dass Adenosin die proinflammatorische Polarisation der Makrophagen inhibiert, indem es die Zytokinproduktion und die Induktion der iNOS unterdrückt [58]. Dies wollten wir uns nun therapeutisch zunutze machen.

Alb-creERT2;Glut^{0lox/lox} Mäuse wurden für zwei Wochen nach dem oben vorgestellten Schema behandelt, das heißt im Anschluss an die Knockout-Induktion mit Tamoxifen wurde eine Inosin-angereicherte High-Fat-Diet gefüttert, um eine Hyperurikämie-assoziierte chronische Niereninsuffizienz zu verursachen. Ab Tag 15 wurde den Tieren der Experimentalgruppe zusätzlich alle zwei Tage Adenosin, den Mäusen der Kontrollgruppe Wasser intraperitoneal injiziert. Harnstoff-Stickstoff (BUN), Kreatinin- und Harnsäurespiegel wurden im Serum gemessen, so-

wie die GFR bestimmt. Die mRNA-Expressionsmuster profibrotischer bzw. proinflammatorischer Gene wurden mittels qRT-PCR nachgewiesen. Histologische Färbungen an Nierenschnitten bezüglich Entzündung und Fibrose wurden durchgeführt. Die Quantifizierung von Immunzellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

3.4.1. Titration einer wirksamen Adenosin-Dosis

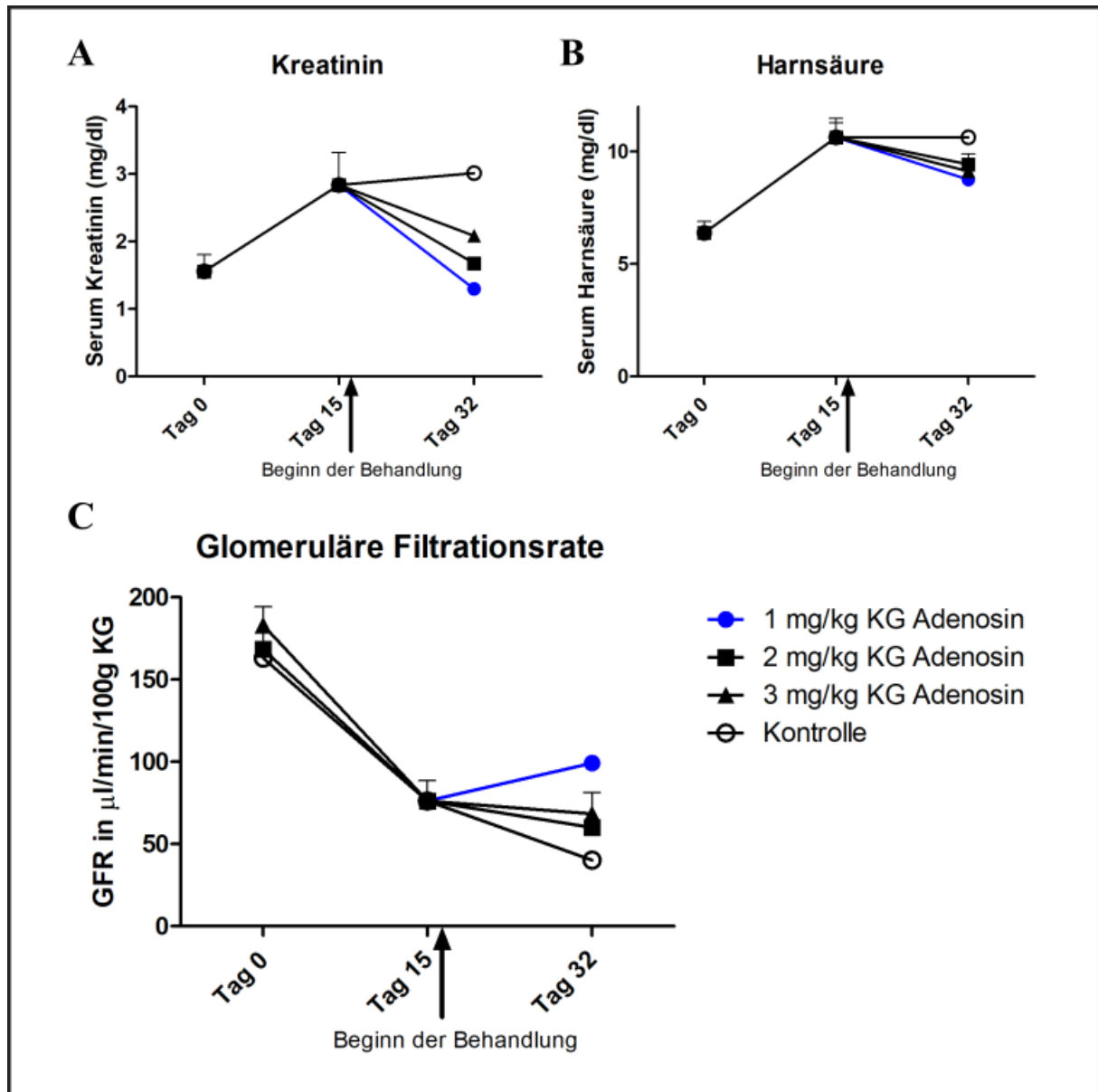


Abbildung 35: Nierenfunktion von Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox} Mäusen unter verschiedenen Adenosin-Dosen. Serum-Kreatinin-Spiegel (A), Serum-Harnsäure-Spiegel (B) sowie die Glomeruläre Filtrationsrate (C) von Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox} Mäusen, n=2.

Um die richtige Adenosin-Dosis zu verwenden, wurde zunächst ein Titrationsversuch an einer kleinen Gruppe Mäuse durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere im Anschluss an die Induktion des Glut9KO für 2 Wochen mit einer fettreichen Ernährung gefüttert. Ab Tag 15 wurde den Mäusen jeden zweiten Tag eine Adenosinlösung in unterschiedlicher Konzentration intraperitoneal injiziert. Die Konzentrationen waren 1 mg Adenosin pro Kilogramm Körpergewicht der Maus, 2 mg/kg KG und 3 mg/kg KG. Als Kontrolle wurde Wasser verwendet.

Es zeigte sich, dass nach zweiwöchiger Behandlung der Kreatinin-Spiegel und der Harnsäure-Spiegel im Serum am niedrigsten waren, wenn als therapeutische Dosis 1 mg/kg KG Adenosin injiziert wurde (Abb. 35A+B). Da gleichzeitig die GFR unter der Verwendung dieser Dosis am höchsten erschien (Abb. 35C), wurde die Dosis von 1 mg/kg KG alle 2 Tage als Therapieregime festgelegt. Aufgrund der kleinen Gruppengröße waren die Unterschiede wie erwartet statistisch nicht signifikant, die Dosis für den Hauptversuch wurde dem Trend folgend ausgewählt.

3.4.2. Adenosin-Behandlung verlangsamt die Progression einer bestehenden chronischen Niereninsuffizienz im Rahmen der chronischen Uratnephropathie

Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse wurden für vier Wochen mit einer HFD+Inosin Diät gefüttert. An Tag 15 wurden die Tiere entweder mit Adenosin oder Vehikel behandelt. Währenddessen wurde dreimal die GFR gemessen, sowie der BUN- und der Kreatinin-Spiegel im Serum der Tiere bestimmt.

Über die ersten zwei Wochen fiel die GFR in beiden Gruppen erwartungsgemäß als Ausdruck einer sich entwickelnden Niereninsuffizienz signifikant ab. Weder an Tag 0 noch an Tag 15 bestand jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, die bis zu diesem Zeitpunkt völlig gleichbehandelt worden waren. Ab dem Beginn der Behandlung mit Adenosin blieb die GFR der therapierten Mäuse dann konstant, während sie in der Kontrollgruppe weiter absank. Nach 32 Tagen ergab sich somit eine signifikant bessere GFR in der behandelten Gruppe (Abb. 36A). Der Harnsäure-Spiegel war nach 32 Tagen signifikant niedriger in den therapierten Mäusen als in den Kontrolltieren (Abb. 36B). Darüber hinaus waren in der Gruppe, die mit Adenosin therapiert worden war, die Serumspiegel der beiden Nierenretentionsparameter Kreatinin und BUN signifikant niedriger als in den Kontrollmäusen (Abb. 36C+D).

Zusammenfassend zeigten die Mäuse, die Adenosin erhielten, nach 4 Wochen bessere funktionelle Nierenparameter im Vergleich zu den Kontrolltieren, was einer Verlangsamung der Progression der CKD unter der Behandlung mit Adenosin entspricht.

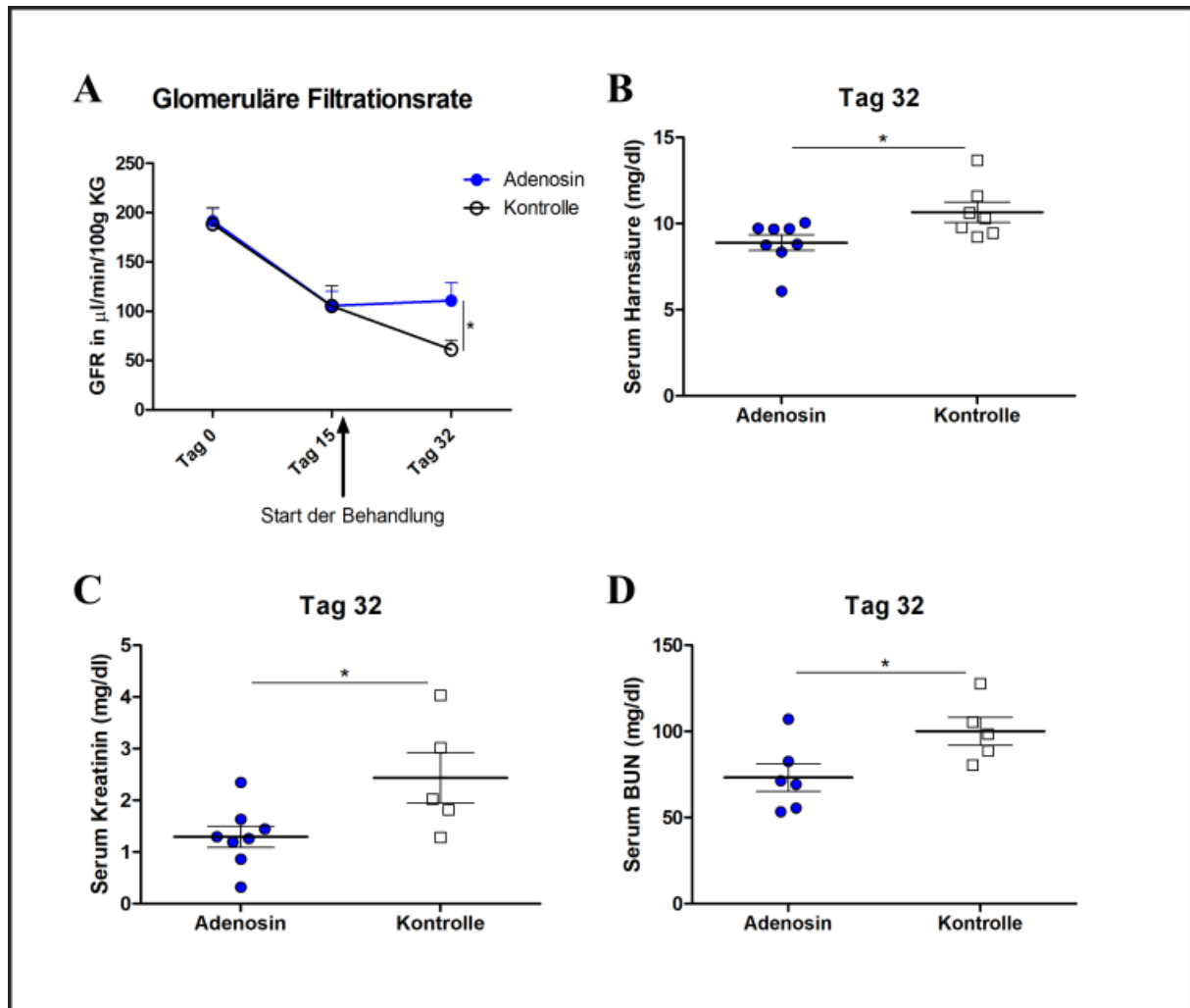


Abbildung 36: Adenosin verlangsamt die Progression einer vorbestehenden CKD.

Glomeruläre Filtrationsrate (A), sowie Harnsäurespiegel (B), Kreatininspiegel (C) und BUN (D) im Serum von Alb-cre-ERT2;*Glut*^{0lox/lox} Mäusen mit und ohne Behandlung mit Adenosin. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=8. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (unverbundener Student's T-Test). [29]

3.4.3. Adenosin-Behandlung hat keinen Einfluss auf den Urin-pH

Während der vierwöchigen Versuchslaufzeit wurde an verschiedenen Zeitpunkten der Urin der Mäuse gesammelt und der pH-Wert mittels einer Elektrode gemessen. Hierbei zeigte sich zu keinem der drei Zeitpunkte, Tag 0, Tag 15 und Tag 32, ein Unterschied zwischen der mit Adenosin behandelten Gruppe und den unbehandelten Kontrolltieren (Abb. 37). Der pH-Wert des Urins wurde jedoch im Lauf der Zeit in beiden Gruppen zunehmend saurer.

Eine Therapie mit Adenosin führte folglich nicht zu einem veränderten pH-Wert des Urins. Das bedeutet, dass der therapeutische Effekt von Adenosin nicht darauf beruht, dass durch eine Alkalisierung des Urins weniger Harnsäurekristalle ausfallen.

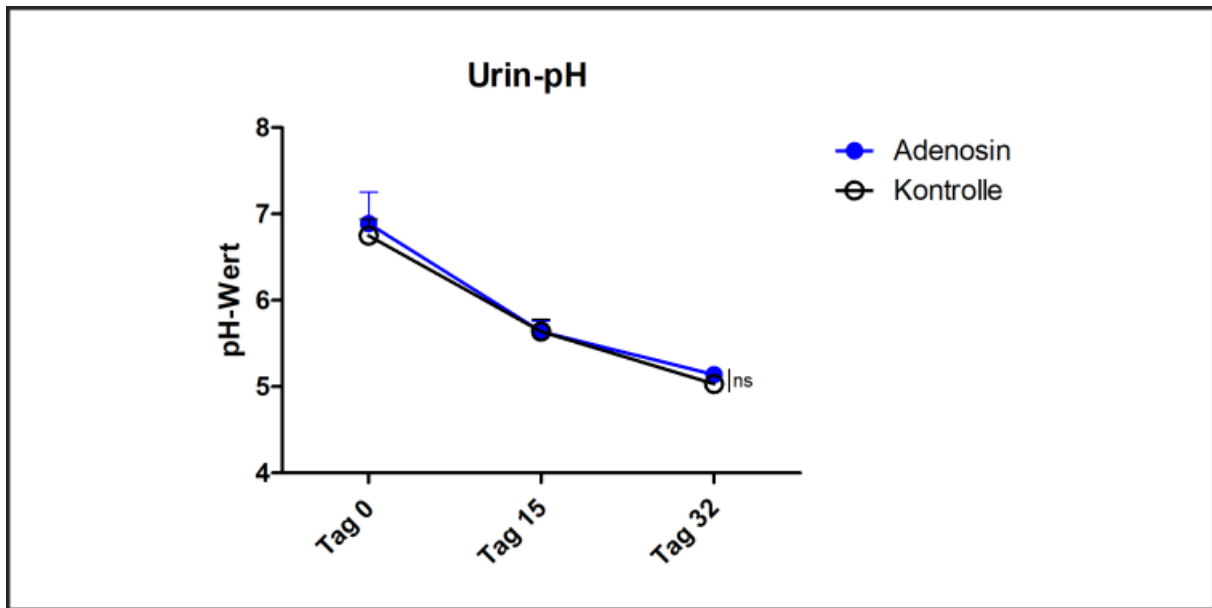


Abbildung 37: Adenosin verändert den Urin-pH nicht.

Verlauf des Urin-pH von Alb-creERT2;*Glut9^{lox/lox}* Mäusen mit und ohne Behandlung mit Adenosin. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=8. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (unverbundener Student's T-Test). [29]

3.4.4. Adenosin-Behandlung inhibiert Tubulusschaden, Entzündung und Fibrose in Mäusen mit chronischer Uratnephropathie

Von den Nieren der Alb-creERT2;*Glut9^{lox/lox}* Mäuse wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit HE/Silber sowie mit PAS gefärbt. Anschließend wurden an den Schnitten der Grad der Fibrosierung und die Anzahl der Granulome bestimmt. Zusätzlich wurde eine qRT-PCR von Nieren- sowie Herzgewebe durchgeführt, um das Expressionsmuster von Inflammations- und Fibrosemarkern zu untersuchen.

Unter Adenosin-Behandlung kam es zu einer signifikanten Reduktion der Expression des Nierenschädigungsmarkers *Kim-1* (Abb. 38A) und es fand sich ein ebenfalls signifikant reduzierter PAS-Score als Äquivalent einer geringeren strukturellen Nierenschädigung (Abb. 38B-D).

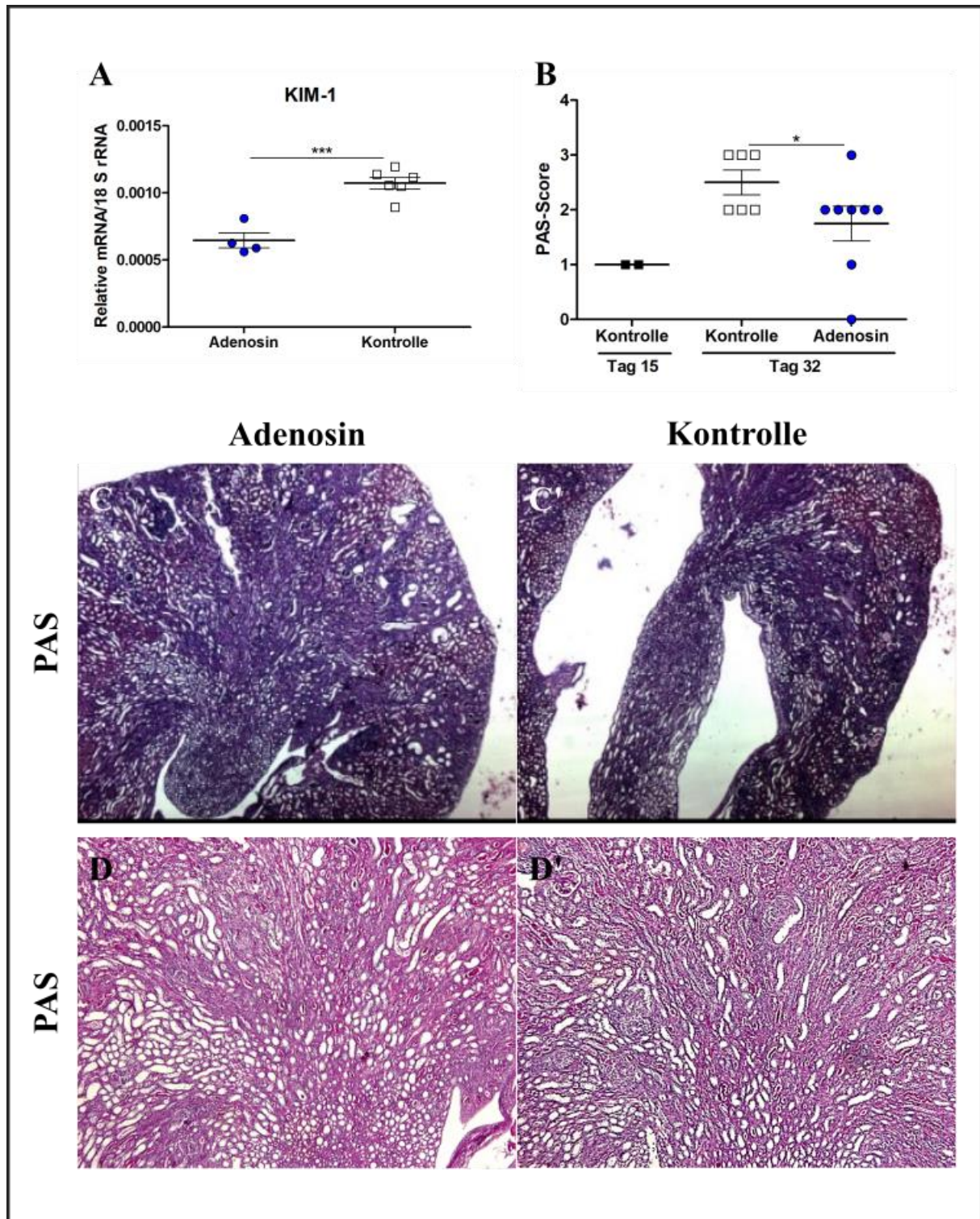


Abbildung 38: Adenosin-Behandlung führt zu einer geringeren strukturellen Schädigung der Nieren.

qRT-PCR-Daten der renalen Expression von KIM-1 (A), sowie das Ausmaß der Nierenschädigung, angegeben im PAS-Score (B) von Alb-creERT2;*Glut9^{lox/lox}* Mäusen mit und ohne Behandlung mit Adenosin. Repräsentative Bilder von HE-gefärbten Schnitten der Nieren nicht behandelter und behandelter Tiere unter Verwendung des 2,5x-Objektivs (C) und des 10x-Objektivs (D). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, n=6. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (unverbundener Student's T-Test). [29]

Die Behandlung mit Adenosin bewirkte zudem eine signifikante Herunterregulation des proinflammatorischen Zytokins *Il-6* in den Nieren der Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse (Abb. 39A). Im Gegensatz dazu erhöhte die Therapie mit Adenosin signifikant die Expression der antiinflammatorischen Zytokine *Il-10* und *Il-13* im Nierengewebe (Abb. 39B+C).

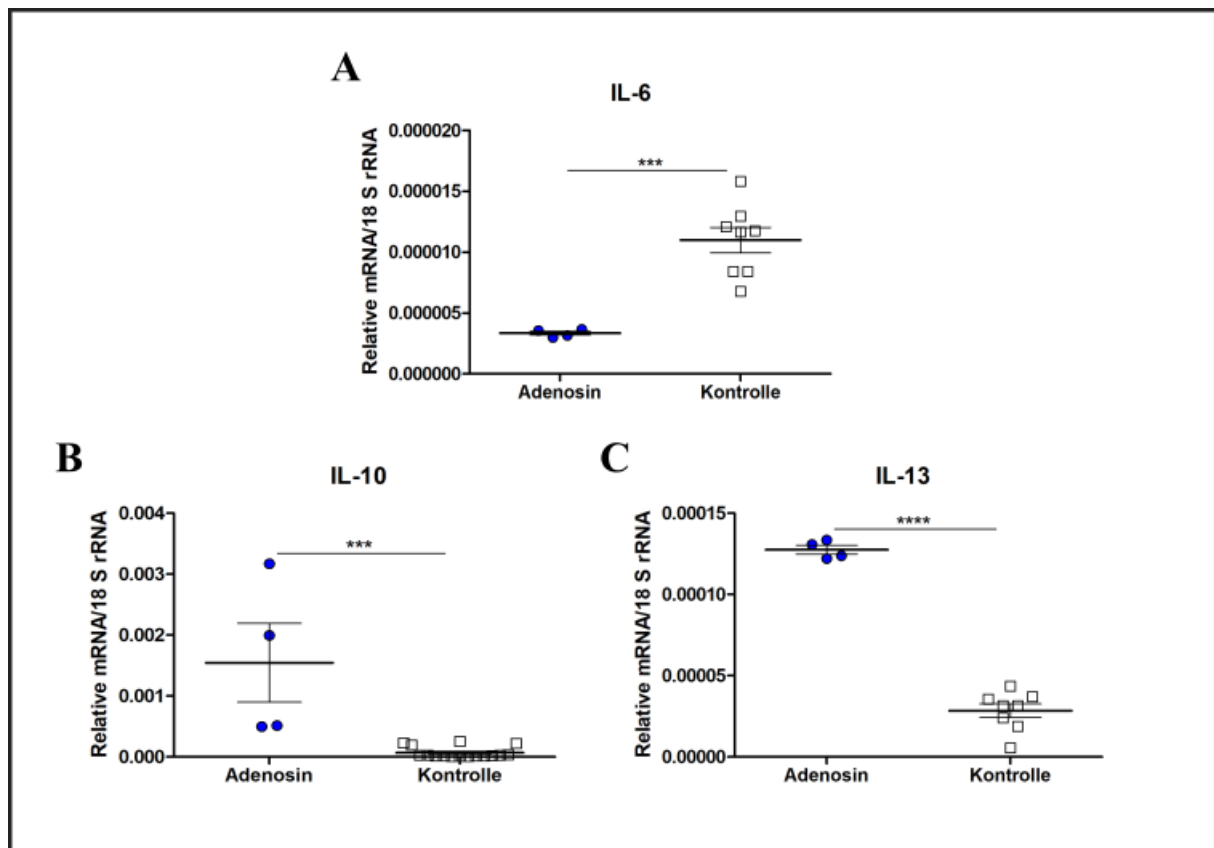


Abbildung 39: Adenosin-Behandlung bewirkt eine reduzierte renale Inflammation.

Ermittlung der Expression pro- und antiinflammatorischer Gene in den Nieren von Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen mittels qRT-PCR: IL-6 (A), IL-10 (B) und IL-13 (C). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=8. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (unverbundener Student's T-Test). [29]

Bei der Analyse der histologischen Schnitte zeigte sich, dass unter der Behandlung mit Adenosin nach 32 Tagen signifikant weniger Granulome in den Nieren zu finden waren (Abb. 40A). Dies ging einher mit einer geringer ausgeprägten renalen Fibrose (Abb. 40B), sowie einer geringeren renalen Expression des profibrotischen Gens *Fibronectin 1* (Abb. 40C). Die weiteren

Fibrosemarker, *Fsp-1* und *Collagen1a1*, zeigten hingegen keine signifikante Änderung in der Expression unter Therapie mit Adenosin (Abb. 40D+E).

In allen weiteren mittels qRT-PCR überprüften renalen und kardialen Gene konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Adenosin-behandelten und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind als Heatmap in Abbildung 41 dargestellt.

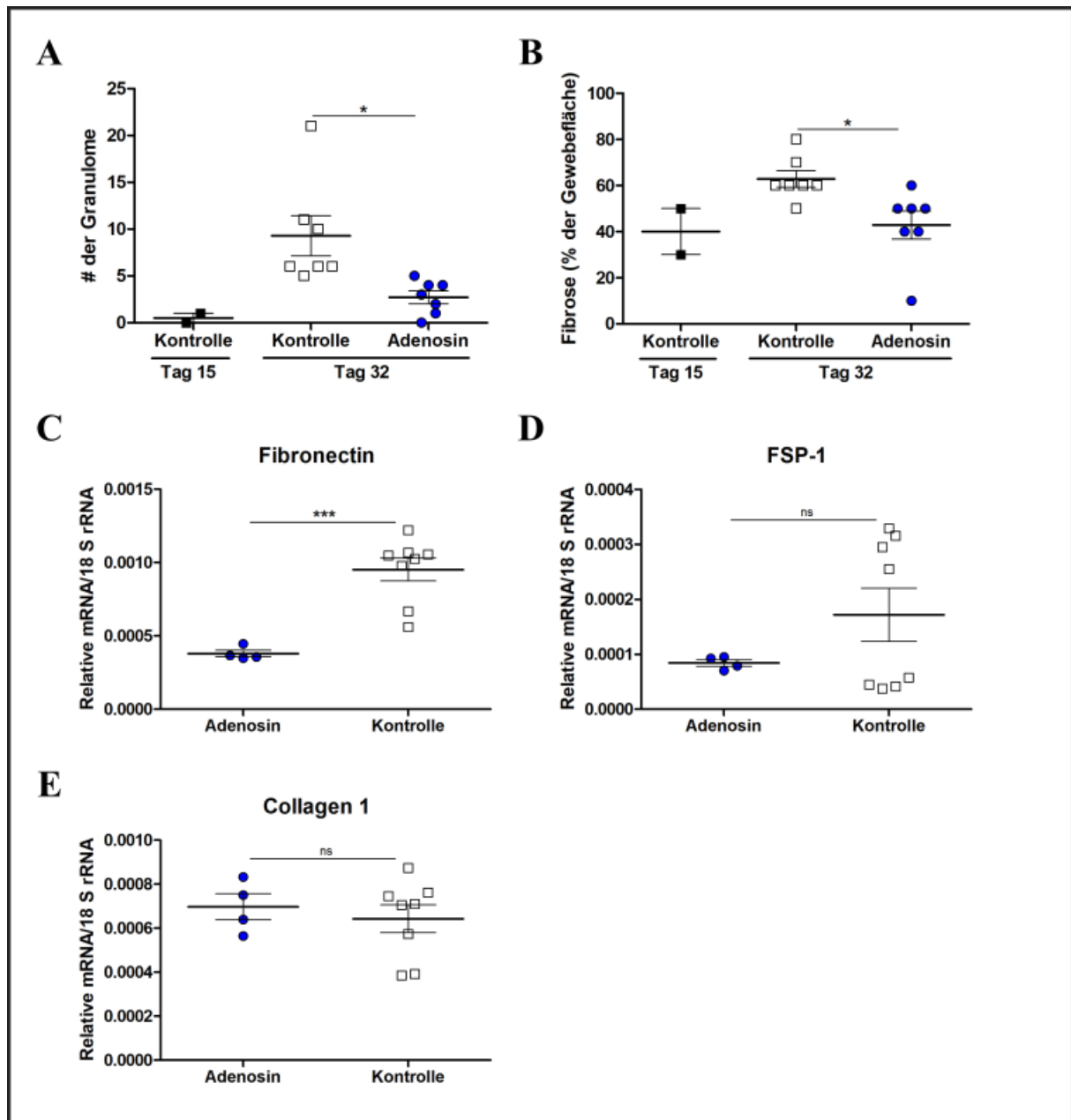


Abbildung 40: Adenosin-Behandlung führt zu einer geringeren Anzahl renaler Granulome und einer reduzierten renalen Fibrosierung.

Anzahl der renalen Granulome pro Nierenschnitt (A) und Fibrosegrad (B) der Nieren von Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen. Analyse des renalen Expressionsmusters profibrotischer Gene: *Fibronectin* (C), *Fsp-1* (D) und *Collagen 1* (E). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, n=8. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (unverbundener Student's T-Test). [29]

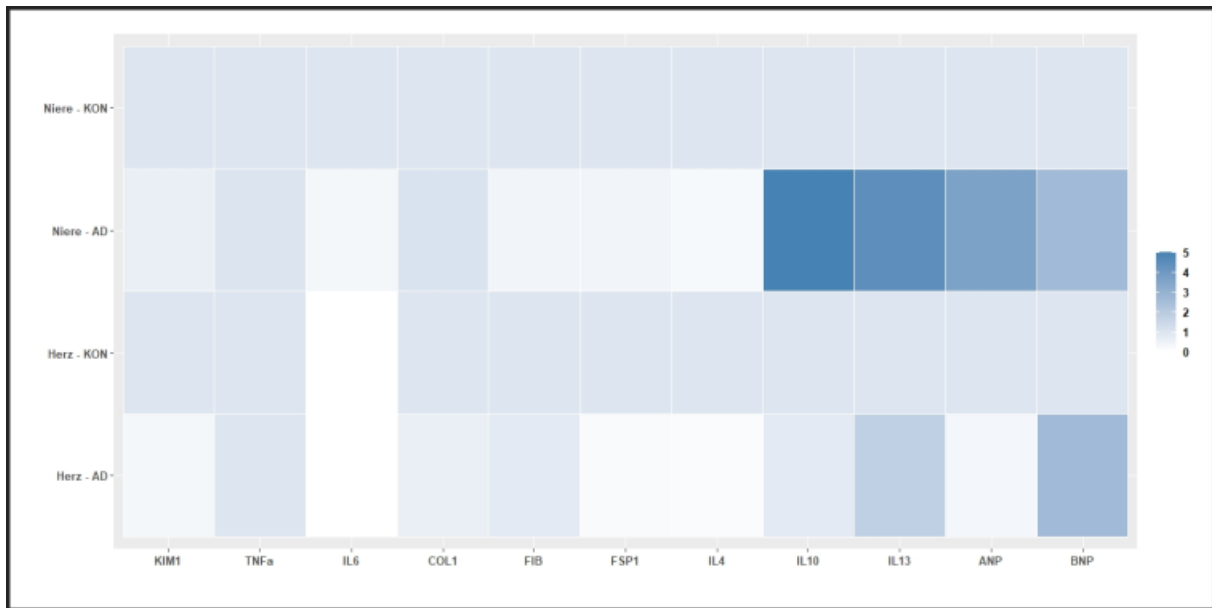


Abbildung 41: Renales und kardiales Genexpressionsmuster von Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox} Mäusen unter Adenosin-Behandlung.

Übersicht über das Expressionsprofil folgender Gene in den Nieren und Herzen von Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox} Mäusen mit (AD) und ohne (KON) Behandlung mit Adenosin: *Kim-1*, *Tnf- α* , *Il-6* (enthält keinen Wert für das Herzgewebe), *Collagen 1* (COL1), *Fibronectin* (FIB), *Fsp-1*, *Il-4*, *Il-10*, *Il-13*, *Anp* und *Bnp*.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Gabe von Adenosin die strukturellen Veränderungen einer chronischen Uratnephropathie in den Nieren verlangsamt, insbesondere die Inflammation und progrediente Fibrosierung sowie die Entstehung von Granulomen, die unter der Einwirkung einer Hyperurikämie in Kombination mit einer azidogenen, fettreichen Ernährung auftraten.

3.4.5. Adenosin-Behandlung begünstigt die Polarisation von M2-Makrophagen in Mäusen mit chronischer Uratnephropathie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden verschiedene Leukozytenpopulationen in den Nieren von Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox} Mäusen quantitativ bestimmt, die ab Tag 15 nach Induktion des Knockdowns entweder mit Adenosin oder mit Wasser alle zwei Tage intraperitoneal behandelt worden waren.

Die Anzahl der CD45⁺-Zellen, das heißt Leukozyten im Allgemeinen, blieb über die Zeit ohne signifikante Änderung (Abb. 42A). Auch eine Behandlung mit Adenosin blieb ohne Einfluss. Ebenso ohne signifikante Unterschiede zeigte sich die Anzahl der Monozyten bzw. Neutrophilen Granulozyten (CD45⁺F4/80⁻CD11b⁺Gr1⁺) sowie der Gesamt-Makrophagen, weder über die

Zeit noch unter der Gabe von Adenosin (Abb. 42B+C). Nach zweiwöchiger Behandlung mit Adenosin zeigten sich in den Nieren der Mäuse signifikant weniger proinflammatorische M1-like-Makrophagen ($CD45^+F4/80^+CD11b^+CxCR1^+CD206^-$) als in den Nieren der unbehandelten Kontrolle (Abb. 42D).

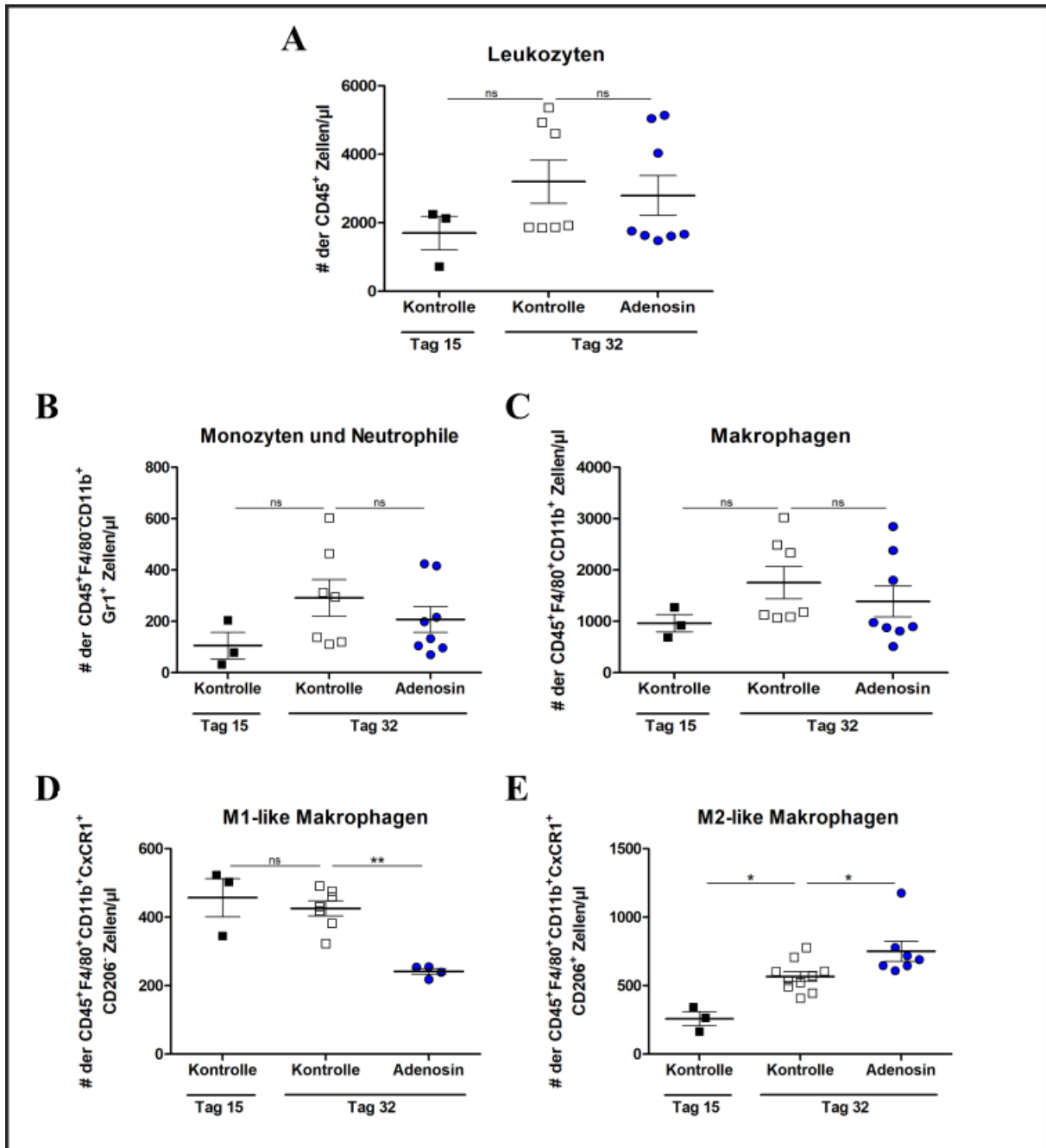


Abbildung 42: Adenosin begünstigt die Polarisation von M2-Makrophagen.

FACS-Analyse der Nieren von Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen mit und ohne Behandlung mit Adenosin. Untersucht wurde die Anzahl der Leukozyten (A), der Monozyten und Neutrophilen (B), der Gesamt-Makrophagen (C), der M1-like (D) sowie der M2-like (E) Makrophagen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=8. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (unverbundener Student's T-Test). [29]

Der Vergleich der Kontrolltiere an Tag 15 mit Tag 32 zeigte keine quantitative Änderung der Anzahl der M1-Makrophagen. Im Gegensatz dazu nahm die Anzahl der M2-like-Makrophagen (CD45⁺F4/80⁺CD11b⁺CxCR1⁺CD206⁺) in den Nieren über die Zeit zu (Abb. 42E). Unter Adenosin-Behandlung war dieser Effekt noch ausgeprägter, so dass sich an Tag 32 signifikant mehr M2-Makrophagen in den Nieren der therapierten Mäuse im Vergleich zur Kontrolle befanden.

Die Behandlung mit Adenosin bewirkte einen Switch der Polarisierung der Makrophagen weg von einem proentzündlichen hin zu einem antientzündlichen M2-like Makrophagen-Typ. Die Gesamtzahl der Leukozyten blieb hierbei unverändert.

4. Diskussion

4.1 Überblick

Die chronische Uratnephropathie ist eine Erkrankung, die als Krankheitsbild bis heute kontrovers diskutiert wird. Die Hauptfrage hierbei ist, ob ein erhöhter Harnsäurespiegel ursächlich für eine CKD sein kann oder ob dieser nur Ausdruck einer Niereninsuffizienz anderer Genese ist. Letztere Ansicht wurde von zahlreichen Publikationen vertreten und die Hyperurikämie als Auslöser einer CKD verneint [41] [42]. Bei bisherigen retrospektiven Studien von Patienten mit Niereninsuffizienz, bei denen eine diagnostische Nierenbiopsie oder Autopsie durchgeführt wurde, wurden bei 0,3-8% der Nierenschnitte Harnsäurekristallgranulome identifiziert. [42] [113] [114] [115] Diese renalen Harnsäure-Kristallgranulome waren histopathologisch mit dem typischen Befund einer fortgeschrittenen CKD assoziiert, bis heute blieb aber ungeklärt, ob sich die Entstehung von Granulomen eher positiv oder negativ auf den Verlauf der Niereninsuffizienz und der diversen anderen granulomatösen Erkrankungen auswirkt [78] [83]. Eine abschließende Beurteilung der Rolle der Granulome wird auch dadurch erschwert, dass bis heute kein geeignetes Tiermodell etabliert ist. Zwar wurde durch die Arbeitsgruppe um Frédéric Preitner ein Mausmodell zur akuten Uratnephropathie entwickelt [91] [13], allerdings steht ein chronisches Modell nach wie vor nicht zur Verfügung. Letzteres ist aber zur Untersuchung der längerfristigen Rolle der Makrophagen und der Granulomentstehung von entscheidender Bedeutung.

Zum besseren Verständnis des zugrundeliegenden Pathomechanismus war das erste Ziel dieser Arbeit, Faktoren zu identifizieren, die die Bildung von Riesenzellen aus Makrophagen *in vitro* fördern oder inhibieren und ggf. zur Granulombildung *in vivo* beitragen. Zunächst wurde die Literatur nach passenden Substanzen durchsucht und anschließend wurden Experimente für die Zellkultur konzipiert. Diese beinhalteten zum einen Versuche zur Riesenzell-Entstehung unter dem Einfluss verschiedener Zytokine bzw. Inhibitoren und zum anderen die Auswirkungen der Stimulation auf den Zellzyklus. Mit Hilfe von Tofacitinib konnte die IL-4-getriggerte Bildung mehrkerniger Zellen zuverlässig inhibiert werden. Dagegen hatte es keinen Einfluss auf die Phase des Zellzyklus, während Stattic bei gleichzeitiger Stimulation mit IL-4 zu einem G0/G1-Arrest der Makrophagen führte. Außerdem hatte die unterschiedliche Stimulation Auswirkungen auf die Expression von CDK (*cyclin-dependent kinase*)-Inhibitoren. Im Gegensatz zu IL-4, das eine reduzierte Expression von *p27* bewirkte, führte der Einfluss von IL-10 und IL-13 zu einer verstärkten Expression von *p21*.

Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse sollten nun zur Behandlung der chronischen Uratnephropathie in einem *in vivo* Modell angewendet werden. Hierfür war es zunächst notwendig, ein passendes Tiermodell zu entwickeln. Durch die Verwendung von Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen [13] [91] konnten wir sicherstellen, dass die Mäuse tatsächlich eine Hyperurikämie entwickeln. Normalerweise wandelt die Maus als Nagetier, wie auch die meisten anderen Säugetiere im Gegensatz zum Menschen die anfallende Harnsäure in den Hepatozyten mittels Urikase in das besser wasserlösliche Allantoin um, sodass Wildtyp-Mäuse keine Hyperurikämie entwickeln können [116]. Über den Knockout des hepatischen Urattransporters *Glut9* kann nun der Transport der Harnsäure in die Hepatozyten und somit der Kontakt der Harnsäure mit Urikase verhindert werden. Folglich akkumuliert die Harnsäure, da sie nicht mehr in Allantoin umgewandelt werden kann und die Mäuse entwickeln nach Gabe von Inosin eine asymptotische Hyperurikämie. Darüber hinaus war es notwendig, den Mäusen eine azidogene Diät zu füttern, um aus einer asymptotischen Hyperurikämie eine manifeste granulomatöse Nephritis zu entwickeln. Mit Hilfe dieses innovativen Modells wurde in der vorliegenden Arbeit zwei Fragen nachgegangen. Zum einen inwiefern eine zugrundeliegende CKD die Bildung renaler Harnsäurekristallgranulome begünstigt und zum anderen ob durch spezifische Inhibitoren die Bildung dieser Granulome in den Nieren unterdrückt und somit die Progression der interstitiellen Uratnephropathie verlangsamt werden kann. Wir konnten zeigen, dass die Hyperurikämie mit begleitender Harnsäurekristall-assoziiierter Granulom-Bildung zur CKD-Progression beiträgt. Hierbei stellten wir fest, dass die Anzahl der Granulome mit dem Ausmaß der Nierenschädigung korreliert. Die Granulome, die in den Nieren der Mäuse gefunden wurden, entsprachen in Aufbau und Struktur denen, die aus Humanbiopsien bekannt sind.

Nach der Etablierung eines geeigneten Tiermodells ging es nun um die Entwicklung therapeutischer Strategien und deren Anwendung *in vivo*. Bei den Versuchen in der Zellkultur kristallisierten sich zwei Kandidaten, Adenosin und Tofacitinib, für die Anwendung *in vivo* heraus. Ab der Induktion des *Glut9*-Knockouts in sechs Wochen alten Mäusen mittels Tamoxifen wurden die Tiere mit einer fettreichen und Inosin-angereicherten Nahrung gefüttert. Über zwei Wochen, in denen die Mäuse keine weitere Behandlung erhielten, kam es zur Manifestation einer chronischen Uratnephropathie mit bereits signifikanter Beeinträchtigung der Nierenfunktion. Erst ab Tag 15 begannen wir mit der Therapie der Mäuse entweder mit Adenosin oder mit Tofacitinib. Nach zweiwöchiger Behandlung wurden noch einmal die Retentionsparameter im Serum und die GFR der Mäuse gemessen und diese danach getötet. Den toten Tieren wurden die Nieren sowie die Herzen entnommen, die anschließend für weiterführende histologische Untersuchungen, PCR-Analysen und die Durchflusszytometrie vorbereitet wurden. Die Mäuse,

die mit Adenosin behandelt wurden, wiesen eine deutlich höhere GFR, niedrigere Spiegel der Retentionsparameter Kreatinin und BUN, eine größere Anzahl an M2-Makrophagen, sowie eine geringere Expression profibrotischer und proinflammatorischer Gene in den Nieren auf. Darüber hinaus zeigten die histologischen Schnitte von Nieren dieser Tiere einen geringeren Grad der Fibrosierung, einen geringeren Schädigungsindex (PAS-Score) und weniger Granulome. Unter der Gabe von Tofacitinib kam es dagegen im Hinblick auf diese Parameter zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe. Lediglich die Expression von IL-6 zeigte sich durch die Therapie mit Tofacitinib erniedrigt. Die Progression der chronischen Uratnephropathie entsprach folglich dem der unbehandelten Kontrolle.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Therapie von Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen mit Adenosin zu mehr M2-polarisierten Makrophagen in den Nieren führt, die Anzahl der Granulome reduziert und die Progression einer manifesten CKD verlangsamt. Die Gabe von Tofacitinib blieb dagegen ohne signifikanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf.

4.2. Tofacitinib hemmt die IL-4-getriggerte Riesenzellbildung aus Makrophagen

Bis heute ist der Mechanismus der Riesenzellentstehung nicht im Detail verstanden [83]. Das lange Zeit vorherrschende Konzept von der Verschmelzung zweier Zellen [75] wurde durch neuere Experimente um Fehler bzw. geänderte Abläufe in der Mitose und der Zytokinese ergänzt [86]. Ausgehend von diesen Erkenntnissen und um Ansätze für die Verhinderung von Granulomen im Mausmodell zu entwickeln, inkubierten wir sowohl Peritonealmakrophagen als auch *in vitro* differenzierte Makrophagen mit verschiedenen Zytokinen und Inhibitoren. Dabei konnten wir bei beiden Makrophagen-Arten die IL-4 getriggerte Entstehung von mehrkernigen Riesenzellen mit Tofacitinib hemmen. Dagegen konnten wir bei unseren Experimenten keinen Einfluss der Hemmung mit Tofacitinib auf die Zellzyklusphase, in der sich die Zellen befanden, feststellen. Eine STAT 3-Inhibition mit Stattic führte zu einer erhöhten Anzahl von Makrophagen in der G0/G1-Phase, einem G0/G1-Arrest entsprechend.

Die Analyse von Expressionsmustern unter verschiedenen Stimuli ergab, dass unter IL-4-Einfluss die Expression von IL-10 nach unten reguliert wird. Darüber hinaus bewirkte eine Stimulation eine reduzierte Expression von *p27*. In der Regulation des Zellzyklus hemmt der Einfluss von *p27* während der G0- und der frühen G1-Phase, beim G1/S-Übergang, sowie während der S-, der G2- und der M-Phase [117]. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit IL-10 und

IL-13 zu einer verstärkten Expression von *p21*, das einen inhibierenden Einfluss auf die Transition von der G1- in die S-Phase, innerhalb der S-Phase und von der G2- in die M-Phase besitzt [118]. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass IL-4 zum einen die Hemmung des Zellzyklus aufhebt und zum anderen den Einfluss von IL-10, das über *p21* den Zellzyklus inhibiert, vermindert. Beides führt dazu, dass ein vermehrter Ablauf des Zellzyklus ermöglicht wird, während IL-10 und IL-13 den gegenteiligen Effekt besitzen.

Die Fragen inwieweit pro- oder anti-entzündliche Zytokine zur Bildung von Makrophagen-vermittelter Riesenzellen beitragen und welcher Makrophagen-Phänotyp zur Bildung von Granulomen beiträgt, wurden im Anschluss *in vivo* näher untersucht. Auf der Grundlage unserer eigenen, hier beschriebenen *in vitro* Experimente als auch der Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen [58] [110] [111] [112], wurden für diese Versuche im Mausmodell als Therapeutika Tofacitinib und Adenosin ausgewählt, die beide über die Hemmung der Entstehung von Riesenzellen potenziell die Anzahl der Granulome in den Nieren reduzieren könnten.

4.3. Harnsäurekristallgranulome entstehen als Folge einer zugrundeliegenden Fibrose und tragen zu Progression der Niereninsuffizienz bei

In der Pathophysiologie der chronischen Uratnephropathie ist seit langem eine Korrelation zwischen CKD und Hyperurikämie bekannt. Allerdings bleibt die Frage nach der Kausalität nach wie vor ein Henne-und-Ei-Problem, da bisher nicht abschließend beurteilt werden konnte, ob die Hyperurikämie ein eigenständiger Risikofaktor für die Progression der CKD ist oder die Erhöhung der Harnsäure als Retentionsparameter nur Ausdruck der bereits beeinträchtigten Nierenfunktion ist [41] [4] [42]. Bis dato bleibt darüber hinaus unklar, inwieweit sich Harnsäurekristallgranulome protektiv oder schädlich auf die Progression der chronischen Uratnephropathie auswirken und zu welchem Zeitpunkt sie entstehen [78] [83].

Um diese offenen Fragen zu adressieren, etablierten wir zunächst ein Tiermodell für die chronische Uratnephropathie unter Verwendung von Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen. Alleinige Induktion des Knockouts und Inosin-Gabe führte zu einer asymptomatischen Hyperurikämie ohne Beeinflussung der Nierenfunktion und Erkrankungsprogression. Eine asymptomatische Hyperurikämie war in unserem Modell folglich kein Risikofaktor für die Ausbildung einer CKD [29]. Erst die zusätzliche Gabe einer azinogenen HFD+Inosin führte über die Ansäuerung des Urins zur Kristallation der Harnsäure in den Nieren und somit zur Entwicklung einer manifesten sowie im Verlauf progredienten Nephropathie. Dabei entsprach das *in vivo* Modell den

humanen Verhältnissen auch in Details, wie z.B. der Granulomentstehung in den Nieren [119] [120] [29]. In der Analyse des zeitlichen Verlaufs konnten wir zeigen, dass sich bereits nach zwei Wochen eine deutliche Einschränkung der Nierenfunktion und eine manifeste renale Fibrose entwickelt hatten, allerdings noch kaum Granulome zu finden waren. Diese traten erst in der Spätphase der Nierenerkrankung auf, bilden sich also als Folge einer zugrundeliegenden Fibrose. In einer großen Fall-Kontroll-Studie mit diagnostischen Nierenbiopsien hat unsere Arbeitsgruppe herausgefunden, dass Harnsäurekristallgranulome mit einer ausgedehnten Nierenfibrose assoziiert sind, unabhängig von der chronischen Nierenerkrankung, z.B. diabetische Nephropathie, IgA Nephropathie, Arterionephrosklerose, Fokal Segmentale Glomerulosklerose, Tubulointerstitielle Nephritis. D.h. die Bildung von Harnsäurekristallgranulomen ist unabhängig von der zugrundeliegenden CKD (unveröffentlichte Daten aus der Doktorarbeit von Moritz Roman Hernandez Petzsche, 2020). Lokalisiert waren die Granulome vor allem im Nierenmark der Mäuse, wo sie sich um ausgefallene Harnsäurekristalle herum formierten. Dies entspricht der Pathophysiologie humaner Biopsien von CKD-Patienten, bei denen Granulome aber auch häufiger in der inneren Hälfte der Nierendrinde auftreten [29] [42] [121] [119]. Die murinen Granulome ähneln sehr stark denen, die man an menschlichen Biopsien findet und die aus einem zentralen Freiraum, der je nach Färbung und Fixierung noch Kristalle enthält, umgeben von Fremdkörper-Riesenzellen und mononukleären Zellen, bestehen [119] [29]. Entsprechend den humanen Verhältnissen konnten wir in den Nierenschnitten der Mäuse sowohl eine Atrophie als auch eine Dilatation der distalen Tubuli (*pars convoluta*) nachweisen [119] [29]. Im Gegensatz zu den Untersuchungen an menschlichem Gewebe sahen wir in der Nierendrinde keine Ansammlungen von Harnsäurekristallen [119] [29]. Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir die M1-polarisierten Makrophagen als die Zellen identifizieren, die die Granulome bilden. Nur vereinzelt konnte wir in den murinen Nieren dagegen Riesenzellen nachweisen, die nach unseren *in vitro* Daten überwiegend von M2-Makrophagen gebildet werden [29]. Diese Beobachtung konnten wir an einer humanen Nierenbiopsie eines Patienten mit Hyperurikämie bestätigen, die eine hohe Infiltrationsrate von CD68⁺-Makrophagen sowohl in den Granulomen als auch im Interstitium aufwies. Dabei bestanden die medullären Harnsäurekristalle überwiegend aus HLA-DR⁺-M1-Makrophagen, während die CD163⁺-M2-Makrophagen eher diffus im Interstitium verteilt waren [29]. Das heißt die Riesenzellbildung spielt im Gegensatz zu unserer ursprünglichen Annahme in der Granulombildung und CKD-Progression im Tiermodell primär keine Rolle. Inwiefern dies auf die Verhältnisse im Menschen übertragen werden kann, bleibt bisher unklar. Vermutlich sind die Riesenzell-vermittelten Granulome aber in der Pathogenese

von Erkrankungen wie beispielsweise der Tuberkulose wichtiger als bei der chronischen Uratnephropathie. Zusätzlich fällt auf, dass an Tag 32, das heißt spät im Krankheitsverlauf, generell mehr M2-Makrophagen in den murinen Nieren nachgewiesen werden konnten. Möglicherweise tragen folglich neben den M1-Makrophagen (über die Granulome) auch die M2-Makrophagen zur interstitiellen Fibrose bei. Dass M2-Makrophagen profibrotisches Potenzial besitzen, belegen Daten aus anderen Tiermodellen zur CKD [122] [47] [49].

Insgesamt betrachtet lässt sich festhalten, dass eine isolierte Hyperurikämie in unserem Modell ohne Einfluss auf die Nierenfunktion blieb. Erst in Kombination mit einer azinogenen Diät kam es zu einer progredienten Niereninsuffizienz. Die für die chronische Uratnephropathie typischen Granulome, die sich um renale Harnsäurekristallablagerungen ausbilden, formieren sich hierbei erst spät im Krankheitsverlauf in bereits fibrotisch umgebauten Gewebe.

4.4. Adenosin nicht aber Tofacitinib inhibiert die Progression der chronischen Uratnephropathie im Mausmodell

Die zentralen Akteure in der Granulom-Entwicklung sind neben anderen Immunzellen insbesondere Makrophagen [83], sodass wir den Ansatz verfolgten, durch einen Eingriff in die Harnsäurekristall-induzierte Entzündungsreaktion (die Mikroumgebung in der Niere [50] [123] [47] [49]) und die Makrophagen-Differenzierung die Bildung der Granulome und somit die CKD-Progression zu beeinflussen. In dieser Arbeit haben wir einen therapeutischen Ansatz zur Behandlung der chronischen Uratnephropathie gewählt, da dieser Versuchsaufbau den realen Verhältnissen näherkommt als die im experimentellen Setting oft übliche Behandlung von Beginn an [124] [125]. Denn im Normalfall entwickelt sich zunächst eine Nierenschädigung, bevor die funktionelle Einschränkung des Organs zur Konsultation eines Arztes und der Stellung einer Diagnose mit Einleitung einer Therapie führt. Diese zeitliche Latenz kann dazu führen, dass strukturelle Veränderungen, die zu Beginn reversibel gewesen wären, nun irreversibel sind und eine Therapie dementsprechend schwieriger wird bzw. eine *Restitutio ad integrum* nicht mehr erreicht werden kann.

Klassischerweise wird die M2-Differenzierung von IL-4 bzw. IL-13 getriggert, genauer die Ausbildung von M2a-Makrophagen, die die Fähigkeit besitzen, Bestandteile der extrazellulären Matrix zu produzieren, das heißt potenziell in den Prozess der Fibrose involviert sind [49]. Unser erster Therapie-Ansatz war deshalb, die Weitergabe des IL-4/IL-13-Signals zu unterbin-

den und somit den möglichen proentzündlichen und -fibrotischen Effekt der Makrophagen auszuschalten. Da wir durch die selektive JAK-Inhibierung mittels Tofacitinib *in vitro* zuverlässig die IL-4-getriggerte Riesenzellbildung aus Makrophagen hemmen konnten, beschlossen wir, dieses Medikament in unserem *in vivo* Modell der chronischen Uratnephropathie zu testen. Entgegen unseren Erwartungen hatte diese Therapie allerdings keine signifikanten Auswirkungen im Tiermodell, weder auf die Polarisierung der Makrophagen noch auf die strukturelle oder funktionelle Schädigung der Nieren. Dass wir nur aufgrund einer möglichen Unterdosierung keinen therapeutischen Nutzen von Tofacitinib zeigen konnten, hatten wir bereits zu Beginn durch Bestimmung des IL-6-Spiegels im Serum ausgeschlossen. Diese Analyse belegte, dass auch in der von uns gewählten Dosis eine antiinflammatorische Wirkung in den Mäusen nachweisbar war und dementsprechend ein wirksamer Spiegel in den Tieren erreicht wurde. Dies weist darauf hin, dass Tofacitinib tatsächlich keinen Einfluss auf die Harnsäurekristall-induzierte Entzündung und Progression der CKD im Modell der chronischen Uratnephropathie hat. In der Klinik wird Tofacitinib aktuell insbesondere bei entzündlichen Erkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder der Psoriasis eingesetzt [112] [126] [111]. Warum es bei der chronischen Uratnephropathie keinen Effekt zu haben scheint, muss bisher offenbleiben. Eventuell könnte dies daran liegen, dass Tofacitinib vor allem bei Erkrankungen mit Episoden akuter Inflammationsgeschehen seine volle Wirksamkeit entfaltet.

Da die selektive JAK-Inhibierung ein zu unspezifischer Angriffspunkt und als solcher nicht zielführend war, beschlossen wir, in die Polarisierung der Makrophagen einzugreifen und diese hin zu einem antiinflammatorischen M2-Typ zu ändern, um direkt an der Granulomentstehung anzusetzen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Adenosin einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion und Polarisierung von Makrophagen ausübt. Neben der regulierenden Wirkung auf die M1-Makrophagen über A_{2A}R beeinflusst Adenosin über A_{2B}R auch die alternative Makrophagen-Aktivierung hin zum antiinflammatorischen M2-Typ [62]. Unter der Therapie mit Adenosin erhöhte sich zum einen die Anzahl der antiinflammatorischen M2-polarisierten Makrophagen, zum anderen reduzierten sich die Granulom-Bildung in den Nieren und der Grad der renalen Fibrosierung. Auch die Analyse verschiedener Fibrose- und Entzündungsmarker mittels qRT-PCR zeigte, dass es unter Adenosin-Behandlung zu einer geringeren Expression profibrotischer und proinflammatorischer Proteine kam. Dies steht im Einklang mit bereits publizierten Daten im Tiermodell [127]. Gleichzeitig ergab sich eine signifikant bessere Nierenfunktion in der behandelten Gruppe.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass die Behandlung von Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen mit bereits bestehender Uratnephropathie mit Adenosin eine Verlangsamung der Progression der CKD bewirkt. Dies zeigt sich sowohl strukturell in einem geringeren Ausmaß der Nierenschädigung als auch funktionell in einer verbesserten Nierenfunktion. Da Adenosin hierbei keinerlei Auswirkungen auf den pH-Wert des Urins der Mäuse hatte, beruht dessen therapeutischer Effekt nicht auf einer Veränderung des Löslichkeitsproduktes der Harnsäure und einem geringeren Ausfall von Uratkristallen in den Nieren, sondern in seinen immunmodulatorischen Eigenschaften, das heißt in der Induktion des antiinflammatorischen M2-like Makrophagen-Typs.

4.5. Limitationen der Studie

Eine erste Limitation der Studie ist die Verwendung von *in vitro* Experimenten. Diese sind notwendig und wichtig, um spezifische Fragestellungen zu klären. Allerdings können sie keine über die Fragestellung hinaus gehenden Antworten zu den komplexen Mechanismen von (patho-)physiologischen Abläufen in lebenden Organismen liefern. Die in solchen Experimenten generierten Erkenntnisse bedürfen also einer weiteren Überprüfung im Tiermodell oder im menschlichen Körper.

Eine weitere Limitation der Studie ist die Verwendung eines Tiermodells. Zwar ist für die Erforschung von Pathomechanismen von Erkrankungen einerseits die Verwendung von Tiermodellen notwendig, andererseits ist die Aussagekraft von Ergebnissen zunächst auf den jeweiligen Modellorganismus beschränkt und diese nur bedingt auf die Verhältnisse im menschlichen Körper übertragbar [128]. Konkret heißt das, dass wir mit unseren Versuchen im Tiermodell gezeigt haben, dass die Behandlung mit Adenosin zu einer Reduktion der Anzahl der Granulome und zu einer verbesserten Nierenfunktion führt. Dies bedeutet allerdings nicht, dass damit bereits auch eine Wirksamkeit im menschlichen Körper nachgewiesen wäre. Insbesondere die Verwendung des kardial belastenden Medikaments Adenosin, bei gleichzeitig geringer Halbwertszeit muss hierbei gut abgewogen werden [129] [130]. Entsprechend können unsere negativen Resultate zu Tofacitinib einen möglicherweise positiven Effekt auf den Verlauf der chronischen Uratnephropathie nicht endgültig ausschließen. Im Rahmen anderer chronischer Entzündungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis, der atopischen Dermatitis oder der Colitis ulcerosa, etabliert sich Tofacitinib nämlich zunehmend als Mitglied verschiedener Therapie-Regime [111] [112] [131] [132]. Außerdem besteht trotz des Nachweises, dass Tofacitinib in

der von uns gewählten Dosis eine antiinflammatorische Reaktion im Körper hervorruft ohne Einfluss auf die Progression der CKD zu haben, die Möglichkeit, dass Tofacitinib in einer anderen Dosis den Verlauf der Uratnephropathie positiv beeinflussen könnte.

4.6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein innovatives Tiermodell für die chronische Uratnephropathie entwickelt, mit dem nachgewiesen werden konnte, dass medulläre Harnsäurekristallgranulome von M1-Makrophagen gebildet werden, dass in diesen nur vereinzelt Riesenzellen auftreten und dass diese Granulome wiederum zur Progression einer CKD beitragen (vgl. Abb. 43). Wir konnten zudem zeigen, dass Tofacitinib *in vitro* zwar die IL-4-getriggerte Riesenzellbildung aus Makrophagen hemmt, allerdings keinen therapeutischen Effekt im Tiermodell hat. Dagegen bewirkte die Adenosin-Behandlung von Alb-creERT2;*Glut^{0lox/lox}* Mäusen mit manifester CKD eine Reduktion in der Anzahl medulläre Granulome und eine verlangsamte Progression der Nephropathie. Zwar entstehen die Granulome erst spät im Verlauf der Erkrankung als Resultat einer manifesten Fibrose, einmal entstanden tragen sie aber zu einer weiteren Progression der Fibrosierung und der damit verbundenen funktionellen Verschlechterung der Nierenfunktion bei. Das bedeutet, dass die Granulome auch noch im Verlauf der CKD ein lohnendes therapeutisches Angriffsziel darstellen.

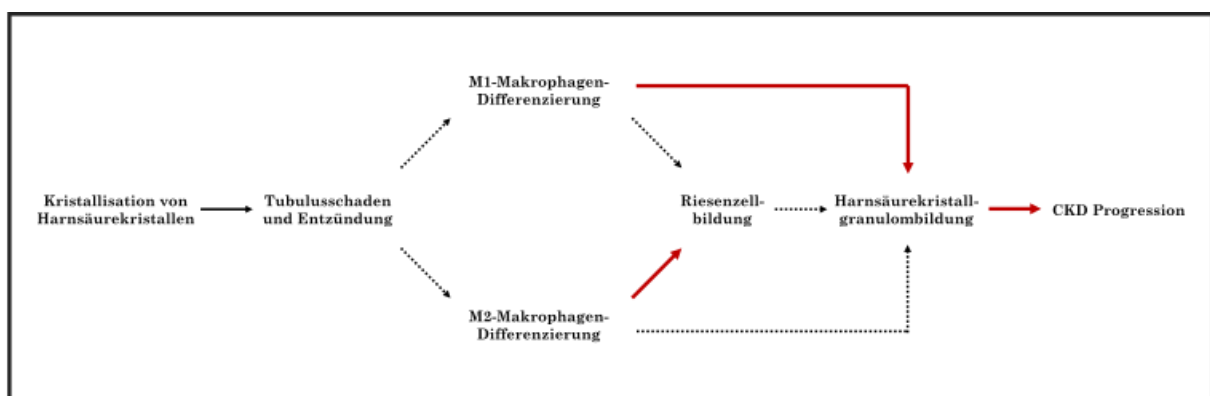


Abbildung 43: Schematischer Überblick über die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

In rot sind die neu belegten kausalen Zusammenhänge markiert.

Wenn man die mit dieser Arbeit für das Tiermodell gewonnene Erkenntnis, dass die Reduktion der Anzahl der Granulome zu einer verbesserten Nierenfunktion bzw. zu einer Verlangsamung der Progression der CKD führt, auch auf den Menschen übertragen möchte, erfordert dies unbedingt noch weiterführende Forschung. Dies beinhaltet zunächst die Suche nach einem beim

Menschen sinnvoll und sicher einsetzbarem Medikament, das zu einer Reduktion der Harnsäure-Granulome führt. Anschließend muss nachgewiesen werden, dass die medikamentös erreichte Reduktion der Granulome auch beim Menschen eine Verlangsamung der Progression der CKD bewirkt und somit therapeutisch und prognostisch relevant ist. Für zukünftige Untersuchungen und Experimente sind mehrere Ansatzpunkte möglich. Stand der aktuellen Forschung ist, dass eine Harnsäure-senkende Therapie mit Allopurinol keinen Einfluss auf die Progression der CKD hat [133]. Allerdings bleibt weiterhin unklar, ob speziell Patienten mit CKD auf den Boden einer chronischen Uratnephropathie von einer medikamentösen Senkung der Harnsäure profitieren würden, da im Rahmen der bisher durchgeführten RCTs nicht nach Harnsäurekristallen im Urin gesucht wurde und sich unter den eingeschlossenen Patienten auch keine mit der expliziten Diagnose chronische Uratnephropathie befanden. [134] [133] [135] [136] [137] Ein weiterer möglicher therapeutischer Ansatzpunkt ist es, die Krisatllisation der Harnsäure zu verhindern, in dem man z.B. über die Gabe von Natriumbicarbonat den Urin-pH alkalisiert [138]. Desweiteren wäre analog zur Behandlung der Gicht die Blockade des IL-1-Signalwegs z.B. mittels Anakinra eine weitere interessante therapeutische Option [139].

Ein weiterer Punkt, der noch weitergehender Untersuchungen bedarf, ist der Umgang mit einer asymptomatischen Hyperurikämie. Wir konnten in unserem Modell zeigen, dass eine isolierte Erhöhung des Harnsäurespiegels nicht zur Ausbildung einer CKD führt. Allerdings haben wir uns in unseren Experimenten hauptsächlich auf die Nieren fokussiert. Histologisch sowie in der Expression von Fibrose und Inflammationsmarkern konnten wir in den Herzen der Mäuse keine Veränderungen durch die Hyperurikämie detektieren. Funktionelle Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System, z.B. die Entwicklung eines Hypertonus, wurden nicht betrachtet, können in unserem Modell also nicht ausgeschlossen werden. Ebenso wenig wurden die strukturellen und funktionellen Einflüsse auf weitere Organsysteme untersucht. Die Frage, für welche Erkrankungen die Hyperurikämie ein unabhängiger Risikofaktor ist und ab wann behandelt werden sollte, bleibt folglich nach wie vor ungeklärt.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CKD-Prognose-Score der KDIGO in Abhängigkeit von GFR und Albuminurie...	2
Abbildung 2: Darstellung von Erkrankungen mit einem kausalen Einfluss der Hyperurikämie..	5
Abbildung 3: Übersicht über die verschiedenen Makrophagen-Subpopulationen.....	8
Abbildung 4: Übersicht über die Entstehung und Funktion mehrkerniger (Riesen-)Zellen.....	11
Abbildung 5: Ungeklärte Fragen in der Pathogenese der chronischen Uratnephropathie.....	15
Abbildung 6: Injektion von DPBS in die Peritonealhöhle.....	28
Abbildung 7: Mausmodell der chronischen Uratnephropathie.....	32
Abbildung 8: Vorbereitung des NIC-Devices.....	34
Abbildung 9: Histogramm für die Analyse des Zellzyklus.....	44
Abbildung 10: Die Stimulierung mit IL-4 bewirkt die Ausbildung von Riesenzellen bei Peritonealmakrophagen.....	49
Abbildung 11: Tofacitinib hemmt die IL-4-getriggerte Ausbildung von Riesenzellen bei Peritonealmakrophagen.....	50
Abbildung 12: Stattic hat keine Auswirkung auf die Ausbildung von Riesenzellen bei Peritonealmakrophagen.....	51
Abbildung 13: Stattic bewirkt in Kombination mit IL-4 einen G0/G1-Arrest von Peritonealmakrophagen.....	53
Abbildung 14: Genexpressionsmuster von Peritonealmakrophagen unter Stimulation.....	55
Abbildung 15: IL-4-Stimulation bewirkt die Ausbildung von Riesenzellen bei in vitro differenzierten Makrophagen.....	58
Abbildung 16: Tofacitinib hemmt die IL-4-getriggerte Riesenzellbildung aus in vitro differenzierten Makrophagen.....	59
Abbildung 17: Stattic hat keine Auswirkung auf die Riesenzellbildung aus in vitro differenzierten Makrophagen.....	60
Abbildung 18: Peritonealmakrophagen bilden unter Stimulation mehr Riesenzellen als in vitro Makrophagen.....	62
Abbildung 19: Tofacitinib und Stattic bewirken keine Änderung in der Phase des Zellzyklus bei in vitro-Makrophagen.....	64

Abbildung 20: Alb-creERT2;Glut9lox/lox weisen nach Gabe einer azinogenen Diät eine verschlechterte Nierenfunktion auf.....	66
Abbildung 21: Ausfall von Harnsäurekristallen im Urin unter azinogener, fettreicher Diät.....	68
Abbildung 22: Harnsäurekristallablagerungen in den Nieren.....	69
Abbildung 23: Strukturelle Nierenschädigung der Alb-creERT2:Glut9lox/lox Mäuse unter Gabe einer fettreichen Diät mit Inosin.....	71
Abbildung 24: Gesteigerte Inflammation in den Nieren der HU+CKD Mäuse.....	72
Abbildung 25: Granulombildung in den Nieren von Alb-creERT2:Glut9lox/lox Mäusen mit HFD.....	74
Abbildung 26: Myofibroblasten oder tubuläre Epithelzellen sind kein Bestandteil renaler Harnsäuregranulome.....	75
Abbildung 27: Gesteigerte Fibrose in den Nieren der hyperurikämischen Mäusen mit CKD.....	76
Abbildung 28: Renale Harnsäure-Granulome entstehen nach Manifestation einer Fibrose.....	77
Abbildung 29: Makrophagen-Infiltration in die Nieren von Alb-creERT2;Glut9lox/lox Mäusen.....	78
Abbildung 30: Involvierung des JAK/STAT-Signalwegs in die Entstehung einer CKD unabhängig von der Genese.....	80
Abbildung 31: Tofacitinib bewirkt eine Reduktion des IL-6-Spiegels im Serum.....	81
Abbildung 32: Tofacitinib beeinflusst den Verlauf der CKD nicht.....	82
Abbildung 33: Tofacitinib beeinflusst die strukturelle Schädigung der Nieren nicht.....	83
Abbildung 34: Tofacitinib hat keinen Einfluss auf den Makrophagen-Typ in den Nieren.....	84
Abbildung 35: Nierenfunktion von Alb-creERT2;Glut9lox/lox Mäusen unter verschiedenen Adenosin-Dosen.....	86
Abbildung 36: Adenosin verlangsamt die Progression einer vorbestehenden CKD.....	88
Abbildung 37: Adenosin verändert den Urin-pH nicht.....	89
Abbildung 38: Adenosin-Behandlung führt zu einer geringeren strukturellen Schädigung der Nieren.....	90
Abbildung 39: Adenosin-Behandlung bewirkt eine reduzierte renale Inflammation.....	91
Abbildung 40: Adenosin-Behandlung führt zu einer geringeren Anzahl renaler Granulome und einer reduzierten renalen Fibrosierung.....	92

Abbildung 41: Renales und kardiales Genexpressionsmuster von Alb-creERT2;Glut9lox/lox Mäusen unter Adenosin-Behandlung.....	93
Abbildung 42: Adenosin begünstigt die Polarisierung von M2-Makrophagen.....	94
Abbildung 43: Schematischer Überblick über die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.....	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Futterzusammensetzung.....	17
Tabelle 2: Oligonukleotidsequenzen der zur Analyse der Genexpressionen verwendeten murinen PCR-Primer.....	25
Tabelle 3: Kalibrierungswerte zur Bestimmung der Kreatinin-Standardgerade.....	36
Tabelle 4: Kalibrierungswerte zur Bestimmung der BUN-Standardgerade.....	37
Tabelle 5: Darstellung des PAS-(Injury-)Scores.....	39
Tabelle 6: Zusammensetzung des cDNA-Master-Mix.....	41
Tabelle 7: Übersicht über die verschiedenen Schritte der qRT-PCR.....	41
Tabelle 8: Zusammensetzung des qRT-PCR-Master-Mix.....	43
Tabelle 9: Zusammensetzung des AK-Master Mix.....	46

Literaturverzeichnis

- [1] A. Levey und J. Coresh, „Chronic kidney disease,“ *The Lancet*, Bd. 379, Nr. 9811, pp. 165-180, 14 Januar 2012.
- [2] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) , „KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease,“ *Kidney International Supplements*, Bd. 3, Nr. 1, pp. 1-150, Januar 2013.
- [3] A. Webster, E. Nagler, R. Morton und P. Masson, „Chronic kidney disease,“ *The Lancet*, Bd. 389, Nr. 10075, pp. 1238-1252, 25 März 2017.
- [4] R. Johnson, „Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which?,“ *Nephrology Dialysis Transplantation*, Bd. 28, Nr. 9, pp. 2221-2228, September 2013.
- [5] A. Levin, „Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy,“ *The Lancet*, pp. 1-30, 20 April 2017.
- [6] C. Zoccali, R. Vanholder, Z. Massy, A. Ortiz und P. Sarafidis, „The systemic nature of CKD,“ *Nature Reviews. Nephrology*, Bd. 13, Nr. 6, pp. 344-358, Juni 2017.
- [7] T. Dhondup und Q. Qian, „Electrolyte and Acid-Base Disorders in Chronic Kidney Disease and End-Stage Kidney Failure,“ *Blood Purification*, Bd. 43, pp. 179-188, 24 Januar 2017.
- [8] J. H. de Boer, M. L. Caramori, ..., S. Zoungas und P. Rossing, „KDIGO 2020 Clinical Practice Guideline for Diabetes Management in Chronic Kidney Disease ,“ *Kidney International*, Bd. 98, Nr. 4, pp. S1-S115, Oktober 2020.
- [9] D. Jalal, „Hyperuricemia, the Kidneys, and the Spectrum of Associated Diseases: A Narrative Review,“ *Current Medical Research and Opinion*, Bd. 32, Nr. 11, pp. 1863-1869, 28 Juli 2016.
- [10] D. Mahor, A. Priyanka, G. Prasad und K. Thakur, „Functional and Structural Characterization of Purine Nucleoside Phosphorylase from *Kluyveromyces lactis* and Its Potential Applications in Reducing Purine Content in Food,“ *PLoS One*, Bd. 11, Nr. 10, pp. 1-23, 21 Oktober 2016.
- [11] J. Bassingthwaighte und T. Chinn, „Reexamining Michaelis-Menten enzyme kinetics for xanthine oxidase,“ *American Physiological Society Advances in Physiology Education*, Bd. 37, Nr. 1, pp. 37-48, 1 März 2013.

- [12] P. Tan, J. Farrar, E. Gaucher und J. Miner, „Coevolution of URAT1 and Uricase during Primate Evolution: Implications for Serum Urate Homeostasis and Gout,“ *Molecular Biology and Evolution*, Bd. 33, Nr. 9, pp. 2193-2200, 26 Juni 2016.
- [13] F. Preitner, „Urate-induced acute renal failure and chronic inflammation in liver-specific Glut9 knockout mice,“ *American Journal of Physiology Renal Physiology*, Bd. 305, Nr. 5, pp. F786-F795, 1 September 2013.
- [14] U. Kiltz, „Langfassung zur S2e-Leitlinie Gichtarthritis,“ *Zeitschrift für Rheumatologie*, Bd. 75 Suppl. 2, pp. 11-60, August 2016.
- [15] Y. Zhu, B. Pandya und H. Choi, „Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2008,“ *Arthritis and Rheumatism*, Bd. 63, Nr. 10, pp. 3136-3141, Oktober 2011.
- [16] A. So und B. Thorens, „Uric acid transport and disease,“ *The Journal of Clinical Investigation*, Bd. 120, Nr. 6, pp. 1791-1799, 1 Juni 2010.
- [17] C. Agudelo und C. Wise, „Gout: diagnosis, pathogenesis, and clinical manifestations,“ *Current Opinion in Rheumatology*, Bd. 13, Nr. 3, pp. 234-239, Mai 2001.
- [18] N. Dalbeth, T. Merriman und L. Stamp, „Gout,“ *The Lancet*, Bd. 388, Nr. 10055, pp. 2039-2052, 22 Oktober 2016.
- [19] M. Kuwabara, „Hyperuricemia is an independent competing risk factor for atrial fibrillation,“ *International Journal of Cardiology*, Bd. 231, pp. 137-142, 15 März 2017.
- [20] A. Mazza, „Asymptomatic hyperuricemia is a strong risk factor for resistant hypertension in elderly subjects from general population,“ *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Bd. 86, pp. 590-594, Februar 2017.
- [21] H. Prautzsch und B. Engel, „Häufige Gichtanfälle und häufige Gicht,“ *S2e-Leitlinie der DEGAM*, März 2019.
- [22] G. Ragab, M. Elshahaly und T. Bardin, „Gout: An old disease in new perspective – A review,“ *Journal of Advanced Research*, Bd. 8, Nr. 5, pp. 495-511, September 2017.
- [23] E. Gonzalez, „An update on the pathology and clinical management of gouty arthritis,“ *Clinical Rheumatology*, Bd. 31, Nr. 1, pp. 13-21, 2012.
- [24] L. Stamp und P. Chapman, „Gout and its comorbidities: implications for therapy,“ *Rheumatology*, Bd. 52, Nr. 1, pp. 34-44, Januar 2013.
- [25] S. Howard, D. Jones und C.-H. Pui, „The Tumor Lysis Syndrome,“ *The New England Journal of Medicine*, Bd. 364, Nr. 19, pp. 1844-1854, 12 Mai 2011.

- [26] M. Hediger, R. Johnson, H. Miyazaki und H. Endou, „Molecular Physiology of Urate Transport,“ *Physiology*, Bd. 20, Nr. 2, pp. 125-133, 16 März 2005.
- [27] R. Burns, I. Topoz und S. Reynolds, „Tumor lysis syndrome: risk factors, diagnosis, and management,“ *Pediatric Emergency Care*, Bd. 30, Nr. 8, pp. 571-576, August 2014.
- [28] T. Nakagawa, „Hyperuricemia causes glomerular hypertrophy in the rat,“ *American Journal of Nephrology*, Bd. 23, Nr. 1, pp. 2-7, Januar 2003.
- [29] M. Sellmayr, M. R. Hernandez Petzsche, Q. Ma, N. Krüger, H. Liapis, A. Brink, ..., H.-J. Anders und S. Steiger, „Only Hyperuricemia with Crystalluria, but not Asymptomatic Hyperuricemia, Drives Progression of Chronic Kidney Disease,“ *Journal of the American Society of Nephrology*, Bd. 31, Nr. 12, pp. 2773-2792, Dezember 2020.
- [30] D. Bayram, M. T. Sezer, ..., V. Kidir und H. Orhan, „The effects of allopurinol on metabolic acidosis and endothelial functions in chronic kidney disease patients,“ *Clinical and Experimental Nephrology*, Bd. 19, Nr. 3, pp. 443-449, Juni 2015.
- [31] M. Goicoechea, S. García de Vinuesa, ..., D. Arroyo und J. Luño, „Effect of allopurinol in chronic kidney disease progression and cardiovascular risk,“ *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, Bd. 5, Nr. 8, pp. 1388-1393, August 2010.
- [32] M. Goicoechea, S. Garcia de Vinuesa, ..., T. Linares und J. Luño, „Allopurinol and progression of CKD and cardiovascular events: long-term follow-up of a randomized clinical trial,“ *American Journal of Kidney Diseases*, Bd. 65, Nr. 4, pp. 543-549, April 2015.
- [33] D. S. Goldfarb, P. A. MacDonald, ..., S. Chefo und L. McLean, „Randomized controlled trial of febuxostat versus allopurinol or placebo in individuals with higher urinary uric acid excretion and calcium stones,“ *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, Bd. 8, Nr. 11, pp. 1960-1967, November 2013.
- [34] T. Wada, T. Hosoya, ..., D. Okui und K. Kimura, „Uric acid-lowering and renoprotective effects of topiroxostat, a selective xanthine oxidoreductase inhibitor, in patients with diabetic nephropathy and hyperuricemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study (UPWARD study),“ *Clinical and Experimental Nephrology*, Bd. 22, Nr. 4, pp. 860-870, August 2018.
- [35] R. A. Yood, F. D. Ottery, W. Irish und M. Wolfson, „Effect of pegloticase on renal function in patients with chronic kidney disease: a post hoc subgroup analysis of 2 randomized, placebo-controlled, phase 3 clinical trials,“ *BMC Research Notes*, Bd. 7, Nr. 54, 21 Januar 2014.

- [36] T. Hosoya, I. Ohno, ..., T. Yamamoto und S. Hara, „Effects of topiroxostat on the serum urate levels and urinary albumin excretion in hyperuricemic stage 3 chronic kidney disease patients with or without gout,“ *Clinical and Experimental Nephrology*, Bd. 18, Nr. 6, pp. 876-884, Dezember 2014.
- [37] K. Saag, A. Whelton, ..., B. Hunt und L. Gunawardhana, „Impact of Febuxostat on Renal Function in Gout Patients With Moderate-to-Severe Renal Impairment,“ *Arthritis & Rheumatology*, Bd. 68, Nr. 8, pp. 2035-2043, August 2016.
- [38] S. Badve, E. Pascoe, ..., D. Johnson und CKD-FIX Study Investigators, „Effects of Allopurinol on the Progression of Chronic Kidney Disease,“ *The New England Journal of Medicine*, Bd. 382, Nr. 26, pp. 2504-2513, 25 Juni 2020.
- [39] A. Doria, A. Galecki, ..., M. Mauer und PERL Study Group, „Serum Urate Lowering with Allopurinol and Kidney Function in Type 1 Diabetes,“ *The New England Journal of Medicine*, Bd. 382, Nr. 26, pp. 2493-2503, 25 Juni 2020.
- [40] M. Suliman, „J-shaped mortality relationship for uric acid in CKD,“ *American Journal of Kidney Diseases*, Bd. 48, Nr. 5, pp. 761-771, November 2006.
- [41] L. Beck, „Requiem for gouty nephropathy,“ *Kidney International*, Bd. 30, Nr. 2, pp. 280-287, August 1986.
- [42] V. Nickeleit und M. Mihatsch, „Uric acid nephropathy and end-stage renal disease — Review of a non-disease,“ *Nephrology Dialysis Transplantation*, Bd. 12, Nr. 9, pp. 1832-1838, September 1997.
- [43] D. Gustafsson und R. Unwin, „The pathophysiology of hyperuricaemia and its possible relationship to cardiovascular disease, morbidity and mortality,“ *BMC Nephrology*, Bd. 14, Nr. 164, 29 Juli 2013.
- [44] M. Chonchol, M. Shlipak, ..., J. Carney und L. Fried, „Relationship of uric acid with progression of kidney disease,“ *American Journal of Kidney Diseases*, Bd. 50, Nr. 2, pp. 239-247, August 2007.
- [45] J. Desai, S. Steiger und H.-J. Anders, „Molecular Pathophysiology of Gout,“ *Trends in Molecular Medicine*, Bd. 23, Nr. 8, pp. 756-768, August 2017.
- [46] S. Kim, Y. Chang, ..., H. Shin und S. Ryu, „Development of Nephrolithiasis in Asymptomatic Hyperuricemia: A Cohort Study,“ *American Journal of Kidney Diseases*, Bd. 70, Nr. 2, pp. 173-181, August 2017.
- [47] H.-J. Anders und M. Ryu, „Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis,“ *Kidney International*, Bd. 80, Nr. 9, pp. 915-925, 03 August 2011.

- [48] I. Luzina, A. Keegan, N. Heller, G. Rook, T. Shea-Donohue und S. Atamas, „Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”,“ *Journal of Leukocyte Biology*, Bd. 92, pp. 753-764, Oktober 2012.
- [49] H.-J. Anders und M. Weidenbusch, „Tissue microenvironments define and get reinforced by macrophage phenotypes in homeostasis or during inflammation, repair and fibrosis,“ *Journal of Innate Immunity*, Bd. 4, Nr. 5-6, pp. 463-477, 11 April 2012.
- [50] M. Lech, R. Gröbmayr, M. Weidenbusch und H.-J. Anders, „Tissues Use Resident Dendritic Cells and Macrophages to Maintain Homeostasis and to Regain Homeostasis upon Tissue Injury: The Immunoregulatory Role of Changing Tissue Environments,“ *Mediators of Inflammation*, 3 Dezember 2012.
- [51] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi und M. Locati, „The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization,“ *Trends in Immunology*, Bd. 25, Nr. 12, pp. 677-686, 01 Dezember 2004.
- [52] M. Weidenbusch und H.-J. Anders, „Tissue microenvironments define and get reinforced by macrophage phenotypes in homeostasis or during inflammation, repair and fibrosis,“ *Journal of Innate Immunity*, Bd. 4, Nr. 5-6, pp. 463-477, April 2012.
- [53] S. Arora, K. Dev, B. Agarwal, P. Das und M. Syed, „Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases,“ *Immunobiology*, Bd. 223, Nr. 4-5, pp. 383-396, April-Mai 2018.
- [54] D. Chistiakov, Y. Bobryshev, N. Nikiforov, N. Elizova, I. Sobenin und A. Orekhov, „Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes,“ *International Journal of Cardiology*, Bd. 184, pp. 436-445, 01 April 2015.
- [55] R. Yang, Y. Liao, L. Wang, P. He, Y. Hu, D. Yuan, Z. Wu und X. Sun, „Exosomes Derived From M2b Macrophages Attenuate DSS-Induced Colitis,“ *Frontiers in Immunology*, Bd. 10, pp. 1-13, 16 Oktober 2019.
- [56] M. Nishi, T. Matsumoto, ..., T. Yamasaki und I. Sakaida, „Mesenchymal Stem Cells Induce a Fibrolytic Phenotype By Regulating mmu-miR-6769b-5p Expression in Macrophages,“ *Stem Cells and Development*, Bd. 29, Nr. 22, pp. 1457-1466, 15 November 2020.
- [57] S.-Y. Weng, X. Wang, ..., E. Bockamp und D. Schuppan, „IL-4 Receptor Alpha Signaling through Macrophages Differentially Regulates Liver Fibrosis Progression and Reversal,“ *EBioMedicine*, Bd. 29, pp. 92-103, März 2018.
- [58] B. Csóka, Z. Selmeczy, B. Koscsó, Z. Németh, P. Pacher und P. Murray, „Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors,“ *The FASEB*

- Journal: The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Bd. 26, Nr. 1, pp. 376-386, Januar 2012.
- [59] V. Roberts, P. Cowan, S. Alexander, S. Robson und K. Dwyer, „The role of adenosine receptors A2A and A2B signaling in renal fibrosis,“ *Kidney International*, Bd. 86, Nr. 4, pp. 685-692, 23 Juli 2014.
- [60] G. Ghalamfarsa, M. Kazemi, S. Mohseni, A. Masjedi, M. Hojjat-Farsangi, G. Azizi, M. Yousefi und F. Jadidi-Niaragh, „CD73 as a potential opportunity for cancer immunotherapy,“ *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, Bd. 23, Nr. 2, pp. 127-142, Februar 2019.
- [61] G. Garcia, L. Truong, J.-F. Chen, R. Johnson und L. Feng, „Adenosine A(2A) receptor activation prevents progressive kidney fibrosis in a model of immune-associated chronic inflammation,“ *Kidney International*, Bd. 80, Nr. 4, pp. 378-388, 20 April 2011.
- [62] G. Haskó, P. Pacher, E. Deitch und E. S. Vizi, „Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors,“ *Pharmacology & Therapeutics*, Bd. 113, Nr. 2, pp. 264-275, Februar 2007.
- [63] I. Junttila, „Tuning the Cytokine Responses: An Update on interleukin (iL)-4 and iL-13 Receptor Complexes,“ *Frontiers in Immunology*, Bd. 9, 7 Juni 2018.
- [64] W. Leonard, J.-X. Lin und J. O'Shea, „The γ c Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications,“ *Immunity*, Bd. 50, Nr. 4, pp. 832-850, 16 April 2019.
- [65] J. Corren, „Role of Interleukin-13 in Asthma,“ *Current Allergy and Asthma Reports*, Bd. 13, pp. 415-420, 12 September 2013.
- [66] N. Heller, X. Qi, I. Junttila, K. Shirey, S. Vogel, W. Paul und A. Keegan, „Type I IL-4Rs Selectively Activate IRS-2 to Induce Target Gene Expression in Macrophages,“ *Science Signaling*, Bd. 1, Nr. 51, pp. RA1-15, 23 Dezember 2008.
- [67] R. Gieseck, M. Wilson und T. Wynn, „Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis,“ *Nature Reviews Immunology*, Bd. 18, Nr. 1, pp. 62-76, Januar 2018.
- [68] M. Saraiva und A. O'Garra, „The regulation of IL-10 production by immune cells,“ *Nature Reviews Immunology*, Bd. 10, pp. 170-181, 15 Februar 2010.
- [69] M. Mannino, Z. Zhu, H. Xiao, Q. Bai, M. Wakefield und Y. Fang, „The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer,“ *Cancer Letters*, Bd. 367, Nr. 2, pp. 103-107, 28 Oktober 2015.
- [70] W. Ouyang und A. O'Garra, „IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation,“ *Immunity*, Bd. 50, Nr. 4, pp. 871-891, 16 April 2019.

- [71] N. Parameswaran und S. Patial, „Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages,“ *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, Bd. 20, Nr. 2, pp. 87-103, 2010.
- [72] B. Aggarwal, S. Gubta und J. Kim, „Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey,“ *Blood*, Bd. 119, Nr. 3, pp. 651-665, 19 Januar 2012.
- [73] J. Anderson, „Multinucleated giant cells,“ *Current Opinion in Hematology*, Bd. 7, pp. 40-47, 2000.
- [74] W. Brodbeck und J. Anderson, „Giant cell formation and function,“ *Current Opinion in Hematology*, Bd. 16, Nr. 1, pp. 53-57, Januar 2009.
- [75] P. Brooks, M. Glogauer und C. McCulloch, „An Overview of the Derivation and Function of Multinucleated Giant Cells and Their Role in Pathologic Processes,“ *The American Journal of Pathology*, Bd. 189, Nr. 6, pp. 1145-1158, Juni 2019.
- [76] T. Champion, L. Partridge, S.-M. Ong, B. Malleret, S.-C. Wong und P. Monk, „Monocyte Subsets Have Distinct Patterns of Tetraspanin Expression and Different Capacities to Form Multinucleate Giant Cells,“ *Frontiers in Immunology*, Bd. 9, pp. 1-16, 08 Juni 2018.
- [77] A. Vignery, „Macrophage fusion: are somatic and cancer cells possible partners?,“ *Trends in Cell Biology*, Bd. 15, Nr. 4, pp. 188-193, April 2005.
- [78] M. Pereira, E. Petretto, S. Gordon, D. Basset, G. Williams und J. Behmoaras, „Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation,“ *Journal of Cell Science*, Bd. 131, Nr. 11, pp. 1-11, 05 Juni 2018.
- [79] L. Helming und S. Gordon, „Molecular mediators of macrophage fusion,“ *Trends in Cell Biology*, Bd. 19, Nr. 10, pp. 514-522, Oktober 2009.
- [80] R. Milde, J. Ritter, G. Tennent, A. Loesch, F. Martinez, S. Gordon, M. Pepys, A. Verschoor und L. Helming, „Multinucleated Giant Cells Are Specialized for Complement-Mediated Phagocytosis and Large Target Destruction,“ *Cell Reports*, Bd. 13, Nr. 9, pp. 1937-1948, 01 Dezember 2015.
- [81] A. McNally und J. Anderson, „Foreign body-type multinucleated giant cells induced by interleukin-4 express select lymphocyte co-stimulatory molecules and are phenotypically distinct from osteoclasts and dendritic cells,“ *Experimental and Molecular Pathology*, Bd. 91, Nr. 3, pp. 673-681, Dezember 2011.
- [82] K. Minton, „Macrophages: Granuloma macrophage differentiation,“ *Nature Reviews. Immunology*, Bd. 16, Nr. 12, pp. 718-719, 25 November 2016.

- [83] A. Pagán und L. Ramakrishnan, „The Formation and Function of Granulomas,“ *Annual Review of Immunology*, Bd. 36, pp. 639-665, 26 April 2018.
- [84] N. Morrison, C. Day und G. Nicholson, „Dominant Negative MCP-1 Blocks Human Osteoclast Differentiation,“ *Journal of Cellular Biochemistry*, Bd. 115, Nr. 2, pp. 303-312, Februar 2014.
- [85] A. McNally und J. Anderson, „Beta1 and beta2 integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation,“ *The American Journal of Pathology*, Bd. 160, Nr. 2, pp. 621-630, Februar 2002.
- [86] L. Herrtwich, I. Nanda, K. Evangelou, ..., A. Diefenbach, P. Henneke und A. Triantafyllopoulou, „DNA Damage Signaling Instructs Polyploid Macrophage Fate in Granulomas,“ *Cell*, Bd. 167, Nr. 5, pp. 1264-1280, 17 November 2016.
- [87] C. Martin, A. Carey und S. Fortune, „A bug’s life in the granuloma,“ *Seminars in Immunopathology*, Bd. 38, Nr. 2, pp. 213-220, März 2016.
- [88] A. Chhana und N. Dalbeth, „The gouty tophus: a review,“ *Current Rheumatology Reports*, Bd. 17, Nr. 3, pp. 1-9, 12 März 2015.
- [89] Y.-G. Kim, X.-R. Huang, S.-i. Suga, M. Mazzali, D. Tang, C. Metz, R. Bucala, S. Kivlighn, R. Johnson und H. Lan, „Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in experimental uric acid nephropathy,“ *Molecular Medicine*, Bd. 6, Nr. 10, pp. 837-848, Oktober 2000.
- [90] M. Cronan, R. Beerman, A. Rosenberg, ..., J. Stout, S. Lee und D. Tobin, „Macrophage Epithelial Reprogramming Underlies Mycobacterial Granuloma Formation and Promotes Infection,“ *Immunity*, Bd. 45, Nr. 4, pp. 861-876, 18 Oktober 2016.
- [91] F. Preitner, „Glut9 is a major regulator of urate homeostasis and its genetic inactivation induces hyperuricosuria and urate nephropathy,“ *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Bd. 106, Nr. 36, pp. 15501-15506, 08 September 2009.
- [92] C. Kilkenny, W. J. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson und D. G. Altman, „Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research,“ *PLoS Biology*, Bd. 8, Nr. 6, pp. 1-5, 29 Juni 2010.
- [93] L. C. Crowley, B. J. Marfell und N. J. Waterhouse, „Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342,“ *Cold Spring Harbor Protocols*, Bd. 2016, Nr. 9, 01 September 2016.
- [94] ThermoFisher, „User Guide: Hoechst 33342,“ 2010.

- [95] S. Steiger, J. F. Grill, ..., M. Lech und H.-J. Anders, „Anti-Transforming Growth Factor β IgG Elicits a Dual Effect on Calcium Oxalate Crystallization and Progressive Nephrocalcinosis-Related Chronic Kidney Disease,“ *Frontiers in Immunology*, Bd. 9, pp. 1-15, 29 März 2018.
- [96] D. Schock-Kusch, M. Sadick, N. Henninger, B. Kraenzlin, G. Claus und H.-M. Kloetzer, „Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats,“ *Nephrology Dialysis Transplantation*, Bd. 24, Nr. 10, pp. 7997-3001, Oktober 2009.
- [97] J. Grill und J. Marschner, „SOP for non-invasive transcutaneous measurement of renal function in conscious mice,“ April 2016.
- [98] D. Schock-Kusch, S. Geraci, E. Ermeling, Y. Shulhevich, C. Sticht und J. Hesser, „Reliability of Transcutaneous Measurement of Renal Function in Various Strains of Conscious Mice,“ *PLoS One*, Bd. 8, Nr. 8, p. e71519, 19 August 2013.
- [99] A. Schreiber, Y. Shulhevich, S. Geraci, J. Hesser, D. Stsepankou und S. Neudecker, „Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice,“ *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, Bd. 303, Nr. 5, pp. F783-F788, 01 September 2012.
- [100] DiaSys, „Diagnostic reagent for quantitative in vitro determination of creatinine in serum, plasma or urine on photometric systems,“ September 2017.
- [101] DiaSys, „Diagnostic reagent for quantitative in vitro determination of urea in serum, plasma, or urine on photometric systems,“ November 2015.
- [102] B. Systems, „QuantiChrom Uric Acid Kit - Quantitative Colorimetric Uric Acid Determination at 590 nm,“ 2013.
- [103] R. K. Saiki, S. Scharf, ..., H. A. Erlich und N. Arnheim, „Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia,“ *Science*, Bd. 230, Nr. 4732, pp. 1350-1354, 20 Dezember 1985.
- [104] M. Lech und H.-J. Anders, „Expression profiling by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR),“ *Methods in Molecular Biology*, Bd. 1169, pp. 133-142, 31 Mai 2014.
- [105] A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran und A. Nalbant, „Flow cytometry: basic principles and applications,“ *Critical Reviews in Biotechnology*, Bd. 37, Nr. 2, pp. 163-176, März 2017.
- [106] S. Steiger, „Cell Cycle Basics,“ 2017.

- [107] S. Steiger, J. F. Grill, Q. Ma, ..., M. Lech und H.-J. Anders, „Anti-Transforming Growth Factor β IgG Elicits a Dual Effect on Calcium Oxalate Crystallization and Progressive Nephrocalcinosis-Related Chronic Kidney Disease,“ *Frontiers in Immunology*, Bd. 9, Nr. 619, 29 März 2018.
- [108] W. Wilcox und A. Khalaf, „Nucleation of monosodium urate crystals,“ *Annals of the Rheumatic Diseases*, Bd. 34, Nr. 4, pp. 332-339, August 1975.
- [109] F. P. Pérez, „Uric Acid Renal Lithiasis: New Concepts,“ *Contributions to Nephrology*, Bd. 192, pp. 116-124, Januar 2018.
- [110] D. Meyer, M. Jesson, X. Li, M. Elrick, C. Funckes-Shippy, J. Warner, C. Gross, M. Dowty, S. Ramaiah, J. Hirsch, M. Saabye, J. Barks, N. Kishore und D. Morris, „Anti-inflammatory activity and neutrophil reductions mediated by the JAK1/JAK3 inhibitor, CP-690,550, in rat adjuvant-induced arthritis,“ *Journal of Inflammation*, Bd. 7, Nr. 41, pp. 1-12, 11 August 2010.
- [111] E. Lee, R. Fleischmann, S. Hall, B. Wilkinson, J. Bradley, D. Gruben, T. Koncz, S. Krishnaswami, G. Wallenstein, C. Zang, S. Zwillich und R. van Vollenhoven, „Tofacitinib versus Methotrexate in Rheumatoid Arthritis,“ *The New England Journal of Medicine*, Bd. 370, Nr. 25, pp. 2377-2386, 19 Juni 2014.
- [112] S. Dhillon, „Tofacitinib: A Review in Rheumatoid Arthritis,“ *Drugs*, Bd. 77, Nr. 18, pp. 1987-2001, Dezember 2017.
- [113] J. W. Linnane, A. F. Burry und B. T. Emmerson, „Urate deposits in the renal medulla. Prevalence and associations,“ *Nephron*, Bd. 29, Nr. 5-6, pp. 216-222, 1981.
- [114] D. Verger, C. Leroux-Robert, P. Ganter und G. Richet, „Gouty tophi in the renal medulla in chronic uremia. Study of 17 cases discovered from among 62 autopsies,“ *Nephron*, Bd. 4, Nr. 6, pp. 356-370, 1967.
- [115] I. Ayoub, S. Almaani, ..., L. Hebert und B. Rovin, „Revisiting medullary tophi: a link between uric acid and progressive chronic kidney disease?,“ *Clinical Nephrology*, Bd. 85, Nr. 2, pp. 109-113, Februar 2016.
- [116] J. Lu, X. Hou, X. Yuan, ..., Z. Tian, Q.-S. Mi und C. Li, „Knockout of the urate oxidase gene provides a stable mouse model of hyperuricemia associated with metabolic disorders,“ *Kidney International*, Bd. 93, Nr. 1, pp. 69-80, 01 Januar 2018.
- [117] M. Abbastabar, M. Kheyrollah, K. Azizian, N. Bagherlou, S. Tehrani, M. Maniati und A. Karimian, „Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein,“ *DNA Repair*, Bd. 69, pp. 63-72, September 2018.

- [118] A. Karimian, Y. Ahmadi und B. Yousefi, „Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage,“ *DNA Repair*, Bd. 42, pp. 63-71, Juni 2016.
- [119] P. Towiwat , A. Chhana und N. Dalbeth, „The anatomical pathology of gout: a systematic literature review,“ *BMC Musculoskeletal Disorders*, Bd. 20, Nr. 1, 1 April 2019.
- [120] M. A. Lusco, A. B. Fogo, B. Najafian und C. E. Alpers, „AJKD Atlas of Renal Pathology: Gouty Nephropathy,“ *American Journal of Kidney Diseases*, Bd. 69, Nr. 1, Januar 2017.
- [121] J. H. Talbott und K. L. Terplan, „The kidney in gout.,“ *Medicine (Baltimore)*, Bd. 39, pp. 405-467, Dezember 1960.
- [122] E. Cantero-Navarro, S. Rayego-Mateos, ..., R. R. Rodrigues-Diez und M. Ruiz-Ortega, „Role of Macrophages and Related Cytokines in Kidney Disease,“ *Frontieres in Medicine*, 8 Juli 2021.
- [123] M. Lech und H.-J. Anders, „Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair,“ *Biochimica et biophysica acta*, Bd. 1832, Nr. 7, pp. 989-997, Juli 2013.
- [124] C. Roncal-Jimenez, Y. Sato, T. Milagres, ..., L. Sanchez-Lozada, M. Lanaspa und R. Johnson, „Experimental heat stress nephropathy and liver injury are improved by allopurinol,“ *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, Bd. 315, Nr. 3, pp. F726-F733, 01 September 2018.
- [125] T. Chiaro, R. Soto, W. Z. Stephens, ..., R. O'Connell, A. Tebo und J. Round, „A member of the gut mycobiota modulates host purine metabolism exacerbating colitis in mice,“ *Science Translational Medicine*, Bd. 9, Nr. 380, pp. 1-11, 8 März 2017.
- [126] A. Berekmeri, F. Mahmood, M. Wittmann und P. Helliwell, „Tofacitinib for the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis,“ *Expert Review of Clinical Immunology*, Bd. 14, Nr. 9, pp. 719-730, September 2018.
- [127] C. Blume, A. Felix, ..., H. Haller und J. Schrader, „Autoimmunity in CD73/Ecto-5'-nucleotidase deficient mice induces renal injury,“ *PLoS one*, Bd. 7, Nr. 5, 2012.
- [128] M. Osuchowski, D. Remick, J. Lederer, ..., H.-P. Yu, B. Zingarelli und I. Chaudry, „ABANDON THE MOUSE RESEARCH SHIP? NOT JUST YET!,“ *Shock*, Bd. 41, Nr. 6, pp. 463-475, Juni 2014.
- [129] „Fachinformation Adenosin Altamedics 30mg/10ml Infusionslösung,“ Dezember 2018.

- [130] „Rote Liste ADENOSIN Life Medical Injektions-/Infusionslösung,“ Mai 2020.
- [131] S. Sonthalia und P. Aggarwal, „Oral Tofacitinib: Contemporary Appraisal of Its Role in Dermatology,“ *Indian Dermatology Online Journal*, Bd. 10, Nr. 5, pp. 503-518, 28 August 2019.
- [132] A. Fernández-Clotet, J. Castro-Poceiro und J. Panés, „Tofacitinib for the treatment of ulcerative colitis,“ *Expert Review of Clinical Immunology*, Bd. 14, Nr. 11, pp. 881-892, 11 Oktober 2018.
- [133] S. V. Badve, E. M. Pascoe, ..., D. W. Johnson und CKD-FIX Study Investigators, „Effects of Allopurinol on the Progression of Chronic Kidney Disease,“ *New England Journal of Medicine*, Bd. 382, Nr. 26, pp. 2504-2513, 25 Juni 2020.
- [134] R. A. Yood, F. D. Ottery, W. Irish und M. Wolfson, „Effect of pegloticase on renal function in patients with chronic kidney disease: a post hoc subgroup analysis of 2 randomized, placebo-controlled, phase 3 clinical trials,“ *BMC Research Notes*, Bd. 7, Nr. 54, 21 Januar 2014.
- [135] A. Doria, A. Galecki, C. Spino und M. Mauer, „Preventing Early Renal Loss in Diabetes (PERL) Study: Outcome of a 3-Year Trial of Serum Uric Acid Reduction with Allopurinol,“ *abstract FR-OR137 ASN Kidney Week*, 8 November 2019.
- [136] A. J. Ahola, N. Sandholm, ..., P.-H. Groop und FinnDiane Study Group, „The serum uric acid concentration is not causally linked to diabetic nephropathy in type 1 diabetes,“ *Kidney International*, Bd. 91, Nr. 5, pp. 1178-1185, Mai 2017.
- [137] D. M. Jordan, H. K. Choi, ..., T. R. Merriman und R. Do, „No causal effects of serum urate levels on the risk of chronic kidney disease: A Mendelian randomization study,“ *PLoS Medicine*, Bd. 16, Nr. 1, 15 Januar 2019.
- [138] B. Cohen, I. Laish, ..., R. Sagi und G. Michael, „Efficacy of urine alkalinization by oral administration of sodium bicarbonate: a prospective open-label trial,“ *American Journal of Emergency Medicine*, Bd. 31, Nr. 12, Dezember 2013.
- [139] T. Pascart und P. Richette, „Current and future therapies for gout,“ *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, Bd. 18, Nr. 12, pp. 1201-1211, August 2017.
- [141] H. L. Lee, M. H. Park, J. K. Song, Y. Y. Jung, Y. Kim und K. B. Kim, „Tumor growth suppressive effect of IL-4 through p21-mediated activation of STAT6 in IL-4R α overexpressed melanoma models.,“ *Oncotarget*, Bd. 7, Nr. 17, pp. 23425-23438, 26 April 2016.
- [142] A. Parulekar, C. Kao, Z. Diamant und N. Hanania, „Targeting the interleukin-4 and interleukin-13 pathways in severe asthma: current knowledge and future needs,“ *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, Bd. 24, Nr. 1, pp. 50-55, 24 Januar 2018.

- [143] N. Gandhi, G. Pirozzi und N. Graham, „Commonality of the IL-4/IL-13 pathway in atopic diseases,“ *Expert Review of Clinical Immunology*, Bd. 13, Nr. 5, pp. 425-437, 15 März 2017.
- [144] M. Gooderham, C.-h. Hong, P. Eshtiaghi und K. Papp, „Dupilumab: A review of its use in the,“ *Journal of the American Academy of Dermatology*, Bd. 78, pp. S28-S36, März 2018.
- [145] S. Waqas, G. Ampem und T. Röszer, „Analysis of IL-4/STAT6 Signaling in Macrophages,“ *Nuclear Receptors. Methods in Molecular Biology*, Bd. 1966, pp. 211-224, 01 Mai 2019.
- [146] N. Derecki, A. Cardani, C. Yang, K. Quinnies, A. Cihfield, K. Lynch und J. Kipnis, „Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4,“ *The Journal of Experimental Medicine*, Bd. 207, Nr. 5, pp. 1067-1080, 10 Mai 2010.
- [147] X. Liu, J. Liu, S. Zhao, H. Zhang, W. Cai, M. Cai, X. Ji, R. Leak, Y. Gao, Y. Chen und X. Hu, „Interleukin-4 Is Essential for Microglia/Macrophage M2 Polarization and Long-Term Recovery After Cerebral Ischemia,“ *Stroke*, Bd. 47, Nr. 2, pp. 498-504, Februar 2016.
- [148] S. Busque, F. Vincenti, H. Silva, P. O'Connell, A. Yoshida, J. Friedewald, S. Steinberg, K. Budde, E. Broeders, Y. Kim, C. Hahn, H. Li und G. Chan, „Efficacy and Safety of a Tofacitinib-based Immunosuppressive Regimen After Kidney Transplantation: Results From a Long-term Extension Trial,“ *Transplantation direct*, Bd. 4, Nr. 9, pp. 1-9, 08 August 2018.
- [149] J. McMurray, „A New Small-Molecule Stat3 Inhibitor,“ *Chemistry & Biology*, Bd. 13, Nr. 11, pp. 1235-1242, November 2006.
- [150] L. Li und P. Shaw, „Elevated Activity of STAT3C due to Higher DNA Binding Affinity of Phosphotyrosine Dimer Rather than Covalent Dimer Formation,“ *The Journal of Biological Chemistry*, Bd. 281, Nr. 44, pp. 33172-33181, 03 November 2006.
- [151] J. Hamilton, M. Suárez-Fariñas, N. Dhingra, I. Cardinale, X. Li, A. Kostic, J. Ming, A. Radin, J. Krueger, N. Graham, G. Yancopoulos, G. Pirozzi und E. Guttman-Yassky, „Dupilumab improves the molecular signature in skin of patients with moderate-to-severe atopic dermatitis,“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Bd. 134, Nr. 6, pp. 1393-1300, 4 Dezember 2014.
- [152] V. Leidgens, J. Proske, L. Rauer, S. Moeckel, K. Renner, U. Bogdahn, M. Riemenschneider, M. Proescholdt, A. Vollmann-Zwerenz, P. Hau und C. Seliger, „Stat3 and metformin inhibit brain tumor initiating cells by reducing STAT3-phosphorylation,“ *Oncotarget*, Bd. 8, Nr. 5, pp. 8250-8263, 24 Dezember 2016.

- [153] F. Khaki-Khatibi, M. Ghorbani, M. Sabzichi, F. Ramezani und J. Mohammadian, „Adjuvant therapy with statin enriches the anti-proliferative effect of doxorubicin in human ZR-75-1 breast cancer cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis,“ *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Bd. 109, pp. 1240-1048, Januar 2019.
- [154] H. Idriss und J. Naismith, „TNF α and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s),“ *Microscopy Research And Technique*, Bd. 50, Nr. 3, pp. 184-195, 01 August 2000.
- [155] C. Popa, M. Netea, P. van Riel, J. van der Meer und A. Stalenhoef, „The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk,“ *Journal of Lipid Research*, Bd. 48, Nr. 4, pp. 751-762, April 2007.
- [156] S. Yang, J. Wang, D. Brand und S. Zheng, „Role of TNF–TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications,“ *Frontiers in Immunology*, Bd. 19, Nr. 9, pp. 1-11, 19 April 2018.
- [157] T. Berghe, A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak und P. Vandenabeele, „Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways,“ *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, Bd. 15, pp. 135-147, 23 Januar 2014.
- [158] S. Waqas, G. Ampem und T. Röszer, „Analysis of IL-4/STAT6 Signaling in Macrophages,“ *Methods in Molecular Biology*, Bd. 1966, pp. 211-224, 2019.
- [159] A. Latourte, C. Cherifi, J. Maillet, H.-K. Ea, W. Bouaziz, T. Funck-Brentano, M. Cohen-Solal, E. Hay und P. Richette, „Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis,“ *Annals of the Rheumatic Diseases*, Bd. 76, Nr. 4, pp. 748-755, April 2017.
- [160] K. Engeland, „Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM,“ *Cell Death and Differentiation*, Bd. 25, Nr. 1, pp. 114-132, Januar 2018.
- [161] M. R. Hernández Petzsche, „The Pathogenesis of Chronic Uric Acid Crystal Nephropathy,“ 2020.

Lebenslauf

Danksagung

Zum Schluss möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei all denen zu bedanken, die mich auf dem Weg zur Promotion begleitet haben und ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre. Insbesondere gilt mein Dank...

Frau PD Dr. Stefanie Steiger für die kompetente und wertschätzende Betreuung, für ihre zuverlässige Verfügbarkeit und ihr offenes Ohr in Höhen und Tiefen des Projekts.

Frau Qiuyue Ma und Herrn Moritz Hernández Pertsche, sowie allen anderen Mitgliedern des Anders-Vielhauer-Lab für die geduldige Einarbeitung in neue Methoden und Geräte sowie die gegenseitige Hilfe, für unvergessliche Stunden und gemeinsame Erfahrungen in- und außerhalb des Labors.

Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Anders für die Möglichkeit, in seinem Labor das erste Mal in den faszinierenden Kosmos der Forschung und Wissenschaft eintauchen zu können.

Meiner Familie für die liebevolle und geduldige Begleitung, für die großartige Unterstützung und den Rückhalt, natürlich nicht nur im Rahmen der Promotion, sondern schon mein ganzes Leben lang.