

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Die Rolle des NLRP3 Inflammasoms in Podozyten bei der
strukturellen Anpassung an Diabetes-induzierte glomeruläre
Hyperfiltration**

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

vorgelegt von
Sophie Carina Kunte

aus
München

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Hans-Joachim Anders
Zweites Gutachten: Prof. Dr. Christoph Walz
Drittes Gutachten: Prof. Dr. Alexander Dietrich

Promovierter Mitbetreuer: Prof. Dr. Peter Nelson

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2024

Vorbemerkungen:

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2020 bis Dezember 2022 in den Forschungslaboren des Nephrologischen Zentrums der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV, LMU Klinikum, LMU München in der Arbeitsgruppe Prof. Anders durchgeführt. Die Arbeit wurde betreut von Herrn Professor Dr. med. Hans-Joachim Anders.

Rechtliche Grundlagen:

Bei der Durchführung der Versuche wurde darauf geachtet, das Leiden der Versuchstiere auf ein Minimum zu reduzieren. Alle mit dieser Dissertation verbundenen Tierexperimente waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt worden (ROB-55.2-2532.Vet_02-18-127). Ein LAS interactive Kurs zum Erlangen der theoretischen Qualifikation nach Anlage 1 Abschnitt 3 TierSchVersV wurde hierfür erfolgreich absolviert.

Förderung der Arbeit:

Die Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiums „klinisch-translationale Medizin“, durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU München unter der Leitung von Prof. Dr. med. Thomas Gudermann unterstützt. S. C. K. erhielt zusätzlich eine ideelle und finanzielle Förderung von Seiten der Studienstiftung des deutschen Volkes. Das Projekt wurde mit dem Projektpreis der AG Diabetes und Niere 2021 der Deutschen Diabetes Gesellschaft ausgezeichnet. 2022 wurde das Projekt mit dem Posterpreis der AG Diabetes und Niere der Deutschen Diabetes Gesellschaft sowie dem Posterpreis der Deutschen Diabetes Gesellschaft ausgezeichnet.

Aus dieser Arbeit gingen folgende Publikationen / Präsentationen hervor:

Präsentationen:

1. *Influence of the NLRP3 inflammasome on pathogenesis of diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus*, MMS ScienceCon, Juni 2020, München.
2. *Die Rolle des NLRP3 Inflammasoms in Podozyten in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie bei Typ 1 Diabetes mellitus*, Junge Niere, April 2021, DGfN.
3. *Die Rolle des NLRP3 Inflammasoms in Podozyten in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie bei Typ 1 Diabetes mellitus*, Statusseminar des Graduiertenkollegs FöFoLe, April 2021, Herrsching.
4. *Die Rolle des NLRP3 Inflammasoms in Podozyten in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie bei Typ 1 Diabetes mellitus*, Jahrestagung 2021, DDG.
5. *Die Rolle des NLRP3 Inflammasoms in Podozyten in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie bei Typ 1 Diabetes mellitus*, Jahrestagung 2021, DGfN.
6. Poster: *Influence of the NLRP3 inflammasome in podocytes on the pathogenesis of diabetes dependent hyperfiltration-induced CKD*, IDF Congress 2021.
7. Poster: *Die Rolle des NLRP3 Inflammasoms in Podozyten in der Pathogenese der Hyperfiltrations-induzierten CKD bei Typ 1 Diabetes mellitus*, Jahrestagung 2022, DDG.

Publikationen:

1. **Kunte SC**, Marschner J, Motrapu M, Nelson PJ, Anders HJ. Influence of the NLRP3 inflammasome in podocytes on the pathogenesis of diabetes dependent hyperfiltration-induced CKD. *IDF21-0092 Diabetes Research and Clinical Practice*. 2022; 186: 109629. doi:10.1016/j.diabres.2022.109629.
2. **Kunte SC**, Marschner J, Motrapu M, Nelson PJ, Anders HJ. Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der Pathogenese der Hyperfiltrations-induzierten CKD bei Diabetes mellitus Typ 1. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2022; 17(S 01): S50. doi: 10.1055/s-0042-1746346.
3. **Kunte SC***, Marschner JA*, Klaus M, Honda T, Li C, Motrapu M, Walz C, Angelotti ML, Antonelli G, Melica ME, De Chiara L, Semeraro R, Nelson PJ, Anders HJ. No NLRP3 inflammasome activity in kidney epithelial cells, not even when the NLRP3-A350V Muckle-Wells variant is expressed in podocytes of diabetic mice. *Front Immunol*. 2023 Aug 23;14:1230050. doi: 10.3389/fimmu.2023.1230050.

*gleichwertiger Beitrag

*Gewidmet meinen Eltern
in Dankbarkeit.*

Zusammenfassung	8
Abstract.....	9
Abbildungsverzeichnis.....	10
Tabellenverzeichnis.....	11
Abkürzungsverzeichnis.....	12
1. Einleitung.....	14
1.1 Aufbau und Funktion der Niere	14
1.2 Diabetes mellitus Typ 1	17
1.3 Diabetische Nephropathie	19
1.3.1 Molekulare Mechanismen	19
1.3.2 Das NLRP3 Inflammasom	23
1.3.3 Klinischer Verlauf	27
2. Zielsetzung	31
3. Material und Methoden.....	32
3.1 Material	32
3.1.1 Tierhaltung	32
3.1.2 Einwegmaterialien.....	32
3.1.3 Laborgeräte	33
3.1.4 Assays und Kits.....	34
3.1.5 Chemikalien.....	34
3.1.7 Software	36
3.1.8 Oligonukleotidprimer für PCR und qPCR	37
3.1.9 Kulturmedien	37
3.2 Methoden	38
3.2.1 Tierexperimentelle Methoden	38
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	47
3.2.3 Histologische Methoden.....	52
3.2.4 Histopathologische Befundung	56
3.2.5 Zellkultur Methoden	60
3.2.6 Datenaufbereitung, Statistik und Darstellung.....	63
4. Ergebnisse.....	64
4.1 Kanonische Funktion von podozytärem NLRP3 <i>in vitro</i>	64
4.2 Bedeutung des podozytären NLRP3 Inflammasoms bei DN <i>in vivo</i>	67
4.2.1 Induktion der anhaltenden glomerulären Hyperfiltration <i>in vivo</i>	67
4.2.2 Überaktives NLRP3 Inflammasom in PodoCre;Nlrp3 ^{WT/A350V} Mäusen	78
4.2.3 Podozytäres NLRP3 als therapeutisches Target bei DN	82
5. Diskussion	88
5.1 Kanonische, proinflammatorische Funktion von podozytärem NLRP3 <i>in vitro</i> ...	89

5.2 Bedeutung des podozytären NLRP3 Inflammasoms bei glomerulärer Hyperfiltration <i>in vivo</i>	90
5.2.1 PodoCre;Nlrp3 ^{WT/A350V} Mäuse zeigen keinen aggravierten Phänotyp der anhaltenden glomerulären Hyperfiltration	92
5.2.2 Eine Therapie mit NLRP3 Inflammasom Inhibitoren führt zu keiner Verbesserung des renalen Phänotyps in PodoCre;Nlrp3 ^{WT/A350V} Mäusen .	94
5.3 Limitationen der Arbeit.....	95
5.4 Ausblick.....	98
Literaturverzeichnis	100
Danksagung.....	111
Affidavit	112

Zusammenfassung

Die diabetische Nephropathie (DN) tritt als Komplikation nach langjährigem Bestehen eines Diabetes mellitus Typ 1 (DM1) auf und gilt als Risikofaktor für ein terminales Nierenversagen. Zugrunde liegt mitunter ein Entzündungsprozess in der Niere, bei dem das Nod-like Rezeptor Protein 3 (NLRP3) Inflammasom, durch Reifung proinflammatorischer Interleukine (IL-1 β , IL-18) relevant zu sein scheint. Da bisher zwar der proinflammatorische Einfluss des NLRP3 Inflammasoms in spezialisierten Immunzellen gezeigt werden konnte, die Ergebnisse für parenchymale Zellen jedoch umstritten sind, soll mit diesem Projekt die Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms in Podozyten in der Frühphase der Hyperfiltrations-induzierten chronischen Nierenerkrankung (CKD) bei DM1 untersucht werden.

Untersucht wurden die Hypothesen, dass 1. Podozyten über kein NLRP3 Inflammasom verfügen, 2. podozytäres NLRP3 keine kanonische, proinflammatorische Funktionen erfüllt, 3. podozytäres NLRP3 nicht zur Progression der Hyperfiltrations-induzierten CKD beiträgt und 4. podozytäres NLRP3 kein therapeutisches Target bei Hyperfiltrations-induzierter CKD darstellt.

Diese Fragen wurden durch *in vitro* Analyse humaner Podozyten sowie *in vivo* Untersuchungen an Mäusen mit Hyperfiltrations-induzierter CKD und überaktivem NLRP3 Inflammasom sowie anschließender Inhibition durch verschiedene Pharmazeutika geklärt.

In humanen Podozyten konnte keine IL1- β oder IL-18 Sekretion nachgewiesen werden. Trotz ausgeprägten, diabetischen Phänotyps zeigte sich bei überaktivem NLRP3 Inflammasom in Podozyten keine Aggravation einer CKD in transgenen Mäusen. Durch NLRP3-Inhibitoren konnte keine phänotypische Verbesserung in der Frühphase der DN erzielt werden.

Die vorliegenden Daten deuten daher auf keine Beteiligung des kanonischen NLRP3 Inflammasoms in Podozyten bei Hyperfiltrations-induzierter CKD hin. Es ist jedoch nicht ausreichend geklärt ist, inwiefern nicht-kanonische Funktionen des NLRP3 Inflammasom in Podozyten und anderen parenchymalen Zellen der Niere relevant sind.

Abstract

Diabetic nephropathy (DN) is one of the most severe complications of Type 1 diabetes and also a risk factor for end-stage renal disease (ESKD). Amongst other proinflammatory mediators, pattern recognition receptors are important mediators of disease pathology. Recent studies suggest the NLRP3 inflammasome multiprotein complex as an important mediator in the pathogenesis of DN. Activation of the NLRP3 inflammasome promotes the maturation of proinflammatory IL-1 β and IL-18 (canonical pathway). However, the NLRP3 inflammasome also seems to mediate innate inflammatory response (non-canonical pathway). Whereas processes of the NLRP3 inflammasome in specialized immune cells were described recently, its role in pathogenesis and homeostasis of renal parenchymal cells remains controversially discussed.

With this project we aim to better understand the canonical and non-canonical function of the NLRP3 inflammasome in podocytes.

Therefore, we investigated human derived podocytes *in vitro* and *in vivo* hyperfiltration-induced CKD in NLRP3 overactive mice with and without inflammasome inhibitors. Our data suggest that human derived podocytes are not susceptible for metabolic stress dependent canonical NLRP3 inflammasome signaling. Even though mice presented with severe diabetes and polyuria, we did not observe a significant deterioration of CKD in mice with NLRP3 overactivation. Also, the treatment with NLRP3 inhibitors did not ameliorate hyperfiltration-induced CKD.

Our study provides a better understanding of the functionality of the NLRP3 inflammasome in podocytes in the pathogenesis of diabetes-dependent, hyperfiltration-induced CKD. The data do not support the hypothesis, that the specific inhibition of inflammasome-associated proteins have synergistic effects in inflammatory processes in CKD. However, it remains unclear if non-canonical pathways might be relevant in DN.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Niere	15
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Glomerulus	16
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Glucoserückresorption im proximalen Tubulus	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung des NLRP3 Inflammasoms.....	24
Abbildung 5: Genetisches Modell der PodoCre;Nlrp3WT/A350V Mäuse	39
Abbildung 6: Verpaarungsstrategie zum Erhalt von PodoCre;Nlrp3WT/A350V Mäusen	40
Abbildung 7: Histopathologische Befundung der glomerulären Hypertrophie	56
Abbildung 8: Histopathologische Befundung der glomerulären Fibrose	57
Abbildung 9: Histopathologische Befundung der Podozyten	58
Abbildung 10: Histopathologische Befundung des NLRP3 Inflammasoms	58
Abbildung 11: Histopathologische Befundung der pankreatischen β -Zellmasse.....	60
Abbildung 12: mRNA-Expressionsprofil der Podozytenmarker in differenzierten Podozyten	65
Abbildung 13: Verwendete Zelllinien und Methodik zur IL-1 β Detektion aus Literaturrecherche.....	66
Abbildung 14: Studiendesign zur Etablierung eines Modells für DM1	70
Abbildung 15: C57BL/6J Mäuse zeigen nach STZ-Behandlung Dosis-abhängig klinisch einen DM1	71
Abbildung 16: STZ-Behandlung bewirkt in C57BL/6J Mäusen eine Gewichtsabnahme	72
Abbildung 17: Nur 120 mg/kg KG STZ bewirkt eine signifikante ACR-Erhöhung.....	73
Abbildung 18: 60 mg/kg KG führt zu einer Erhöhung des BUN bei C57BL/6J Mäusen	74
Abbildung 19: 60 mg/kg KG STZ zeigt nach 6 Wochen keine Hypertrophie der Niere oder Glomeruli	75
Abbildung 20: Histopathologische Befunde nach 60 mg/kg KG STZ und 6 Wochen Experimentdauer.....	76
Abbildung 21: DM1 bewirkt keine Expressionsänderung podozytenspezifischer Gene	77
Abbildung 22: Genotypisierung von Nlrp3WT/A350V Mäusen.....	78
Abbildung 23: Biochemische Charakterisierung der frühen DN in PodoCre;Nlrp3WT/A350V Mäusen	80
Abbildung 24: Histopathologische Befunde der Nieren nach 12-wöchiger Hyperglykämie in PodoCre;Nlrp3WT/A350V Mäusen	81
Abbildung 25: Inflammasom Inhibitoren zeigt keine Amelioration biochemischer Parameter bei C57BL/6J Mäusen	83
Abbildung 26: Inflammasom Inhibitoren bewirken keine histopathologische Amelioration bei C57BL/6J Mäusen	84
Abbildung 27: Eine BHB Therapie zeigte keinen signifikanten Effekt bei PodoCre;Nlrp3WT/A350V Mäusen	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: DM1-assoziierte Folgeerkrankungen	19
Tabelle 2: Verwendete Mauslinien	38
Tabelle 3: Mastermix der Endpunkt PCR.....	41
Tabelle 4: Thermocycler Programm für PCR.....	41
Tabelle 5: Länge der PCR-Produkte.....	41
Tabelle 6: Mixtur für Arzneimittel für 1000g KG und Dosierung für operative Eingriffe	43
Tabelle 7: Mastermix der Reversen-Transkriptase-PCR.....	48
Tabelle 8: Mastercycler®pro Programm für Reverse-Transkriptase-PCR.....	48
Tabelle 9: Mastermix der quantitativen Real-Time PCR	49
Tabelle 10: LightCycler 480 Programm für Quantitative Real-Time PCR.....	49
Tabelle 11: Paraffineinbettung	52
Tabelle 12: Vorbereitung der Objektträger.....	53
Tabelle 13: Entparaffinisierung und Rehydrierung	53
Tabelle 14: Entparaffinisierung und Rehydrierung für immunhistochemische Färbungen	53
Tabelle 15: PAS-Färbung.....	54
Tabelle 16: SR-Färbung	54
Tabelle 17: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie.....	55
Tabelle 18: Stimulation von Podozyten.....	66
Tabelle 19: Mausmodelle des Diabetes mellitus Typ 1	68
Tabelle 20: Behandlungsregime zur Etablierung eines DM1 Modells.....	69

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria	IRI	Ischämie-Reperfusion-Verletzung
Abb.	Abbildung	JAK/STAT	Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription
ACR	Albumin-Kreatinin-Ratio	Kap.	Kapitel
AGEs	Advanced glycation end products	KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
ANP	atriales natriuretisches Peptid	KG	Körpergewicht
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein	LDH	Lactat Dehydrogenase
AT2	Angiotensin II	LPS	Lipopolysaccharid
ATP	Adenosintriphosphat	MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
BHB	β-Hydroxybutyrat	MD-2	Myeloid differentiation protein 2
bp	Basenpaare	MP	Murine Podozyten
BSA	Bovines Serum Albumin	MPC-5 mRNA	Muriner Podozytenklon 5 Messenger
BUN	Blut Harnstoff	n.d.	nicht nachweisbar
CKD	Chronische Nierenerkrankung	NF- κB	Nuclear factor κB
CP	Crossing Point	NLRP3	Nod-like Rezeptor Protein 3
DAMPs	Damage associated molecular patterns	NOD-like	Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	NPSH1	Nephrin
DM1	Diabetes mellitus Typ 1	NPSH2	Podocin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium	PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
DN	Diabetische Nephropathie	PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
dNTPs	Desoxyribonucleotide	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DTT	Dithiotreitol	PMA	Phorbolmyristateacetat
E	Amplifikationseffizienz	PRRs	Pattern-recognition receptors
ECGM	Endothelial cell growth Medium	q.a.d.	Quaque alternis die
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure	qPCR	Quantitative (Real-Time) PCR
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ESKD	End-stage kidney disease	RAGE	Receptors for advanced glycation end-products
FCS	Fetales Kälberserum	RNA	Ribonucleinsäure
GAD65A	Autoantikörper gegen Glutamat-Decarboxylase der β-Zelle	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate	RPCs	Renale Progenitorzellen
GIMP	GNU Image Manipulation Program	rpm	Umdrehungszahl pro Minute
HLA	human Leukocyte Antigen	RT	Raumtemperatur
HP	Humane Podozyten	RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
IA-2	Autoantikörper gegen Tyrosin-Phosphatase	s.c.	Subkutan
IA-2β	Autoantikörper gegen Tyrosin-Phosphatase	sog.	sogenannt
IAA	Autoantikörper gegen Insulin	SPF	spezifisch pathogenfrei
ICA	Autoantikörper gegen Inselzellen	SR	Picro-Sirius-Red
IFN	Interferon	STZ	Streptozotocin
IHP	Immortalisierte humane Podozyten	Tab.	Tabelle
IMP	Immortalisierte murine Podozyten	Taq	Thermus aquaticus
IL	Interleukin	TBE	TRIS-Bocat-EDTA
i.p.	Intraperitoneal	TGF-β	Transforming Growth Factor β

Abkürzungsverzeichnis

TLR	Toll-like Rezeptor	VEGF	Vaskuläre endotheliale
TMB	Tetramethylbenzidin		Wachstumsfaktoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor α	WT-1	Wilms-Tumor 1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)- Aminomethane	ZnT8	Autoantikörper gegen den Zink-Transporter 8 der β - Zelle
u.a.	unter anderem		
UnX	Uninephrektomie		
V.	Vena		

1. Einleitung

Die diabetische Nephropathie (DN) tritt als Komplikation des Diabetes mellitus Typ 1 (DM1) auf und gilt als wichtiger Risikofaktor für die Entstehung eines terminalen Nierenversagens. Zugrunde liegt u.a. ein Entzündungsprozess in der Niere, der durch Mediatoren wie NOD-like-Rezeptoren vermittelt wird. Vor allem der Multiproteinkomplex, Nod-like Rezeptor Protein 3 (NLRP3) Inflammasom, scheint durch die Reifung proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-18) eine entscheidende Rolle zu spielen.

1.1 Aufbau und Funktion der Niere

Die Niere als paarig angelegtes, retroperitoneal lokalisiertes Organ, wird in Mark und Rinde unterteilt und spielt bei verschiedenen Stoffwechselprozessen eine entscheidende Rolle (Abb. 1). Hierzu gehören die Ausscheidung körpereigener, harnpflichtiger Abbauprodukte, Regulation des Elektrolyt-, Wasser- und Säure-Base-Haushalts sowie die Produktion von Erythropoetin zur Stimulation der Blutbildung. Ihre kleinste Funktionseinheit ist das Nephron. Dieses besteht aus einem Glomerulus und einem Tubulusapparat. In der Rinde sind die Glomeruli lokalisiert. Abhängig von ihrer Lage unterscheidet man kortikale und juxtamedulläre Glomeruli. Der Tubulusapparat reicht von der Rinde bis ins Mark und tritt am Harnpol, in dem weitere Filtrationsprozesse stattfinden, aus (Abb. 1). Seine Segmente gliedern sich in proximalen Tubulus, Henle Schleife, distalen Tubulus und Sammelrohre. Von dort gelangt der Harn über das Nierenbecken zum Ureter (Abb. 1). Die Blutversorgung der Niere erfolgt über die A. und V. renalis [1, 2].

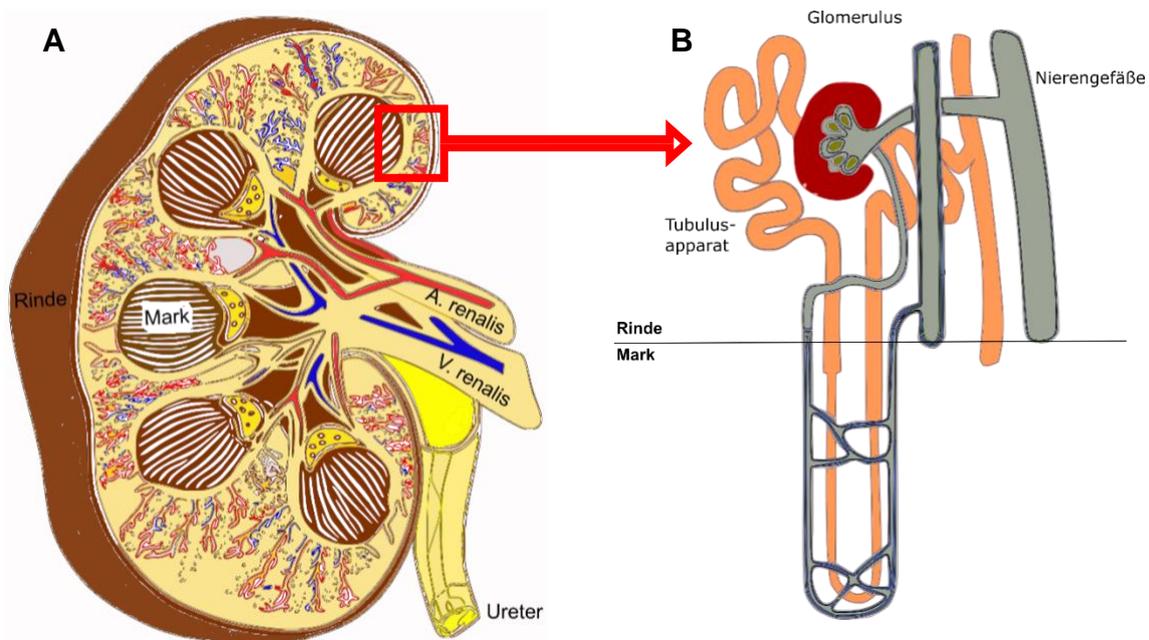


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, das in Mark und Rinde unterteilt wird. Die A. renalis versorgt die Niere mit arteriellem Blut, die V. renalis führt venöses Blut zurück in den Körperkreislauf. Der Ureter transportiert den produzierten Urin in die Harnblase. (B) Das Nephron ist die kleinste, funktionelle Einheit der Niere und besteht aus Glomerulus und Tubulussystem, das sich von der Rinde bis in das Mark zieht. Im Glomerulus werden harnpflichtige Substanzen aus dem Blut filtriert, im Tubulussystem finden sekretorische und resorptive Prozesse zur Regulation der Elektrolyt-, Wasser- und Säure-Base-Haushalts statt.

Der Glomerulus wird mit Blut über eine afferente Arteriole, die am Gefäßpol mündet, versorgt. Hier tritt auch die efferente Arteriole aus (Abb. 2). Im Kapillarnetz des Glomerulus findet die glomeruläre Filtration harnpflichtiger Substanzen aus dem Blut durch den hydrostatischen Druckgradienten als treibende Kraft statt. Der Glomerulus ist hierzu mit spezialisiertem Gewebe, dem Mesangium, ausgekleidet. Es spielt eine entscheidende Rolle für die glomeruläre Filtration. Seine Filtrationsbarriere besteht aus drei Schichten: gefensterter Kapillarendothel ohne Membran (Durchmesser: 50-100 nm) mit anionischer Glykokalix, einer dreischichtigen Basalmembran mit Negativladungen und einem viszeralen Blatt des Bowman-Kapsel Epithels bestehend aus Podozyten mit anionischer Glykokalix. Podozyten entstehen durch Differenzierung aus renalen Stammzellen vornehmlich während der Entstehung der Glomeruli in der Embryonalperiode. Bei Podozyten handelt es sich um terminal differenzierte, postmitotische Zellen [3]. Sie entwickeln sich, indem sie als parietale Epithelzellen der Bowman-Kapsel zum glomerulären Schlingenapparat wandern und sich dort zu Podozyten differenzieren können [4]. Zur Filtration des Blutes sind Podozyten über ihre Podozytenfortsätze miteinander vernetzt, sodass Schlitze entstehen. Diese sogenannte Schlitzmembran enthält das Protein Nephrin. Zwischen den Nephrinmolekülen liegen die Schlitzporen. Die Filtration

des Blutes erfolgt entlang der Schlitzmembran und -poren, entsprechend einer semipermeablen Membran. So entsteht ein Ultrafiltrat aus Wasser und Molekülen mit einer Größe von 6-15 kDa, der Primärharn [5]. Während der Primärharn dann im Tubulussystem in Richtung Nierenbecken fließt, wird er zu Endharn konzentriert. Der Endharn wird vom Nierenbecken in den Ureter und dann in die Harnblase abgeleitet [2].

Die Filtration wird über das tubuloglomeruläre Feedback der Macula densa im Tubuluslumen reguliert (Abb. 2). Durch diesen Mechanismus werden die glomeruläre Filtration und die Resorption im Tubuluslumen synchronisiert, um Elektrolyt-, Wasser- und Säure-Base-Haushalt in Homöostase zu halten [6]. Der gesamte Filtrationsmechanismus unterliegt zudem dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Das RAAS ist die wichtigste Regulationsinstanz für Wasserhaushalt und Blutdruck, sodass auf diese Weise eine Integration der Nierenfunktion in den Gesamtorganismus gewährleistet wird [7].

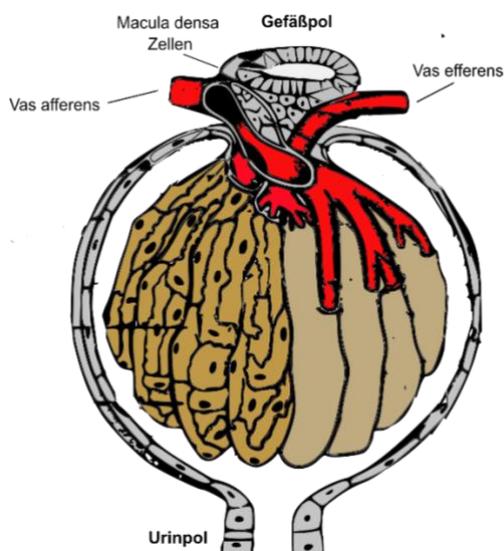


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Glomerulus

Die Blutversorgung des Glomerulus erfolgt über eine afferente und efferente Arteriole. Im Glomerulus erfolgt die Filtration des Blutes entlang einer semipermeablen Membran aus Schlitzmembran und -poren, die von Podozyten und ihren Fortsätzen gebildet wird. Dabei entsteht der Primärharn.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit sollen die pathophysiologischen Mechanismen der Podozyten stehen. Da Podozyten aufgrund ihrer postmitotischen Eigenschaft nicht regenerationsfähig und somit sehr anfällig für Noxen sind, sind etwaige Läsionen fatal. Zwar proliferieren Epithelzellen, aus denen sich Podozyten differenzieren, lebenslanglich mit niedriger Mitoserate und können so geringe glomeruläre Läsionen ausgleichen, sie können jedoch vor allem bei chronischem Podozytenstress die Filtrationsbarriere nicht dauerhaft

erhalten [8, 9]. Diese podozytären Pathomechanismen lassen sich nur durch Verwendung von Podozyten mit identischer, mitotischer Aktivität sinnvoll untersuchen. Um dies *in vitro* zu imitieren, können Podozyten aus renalen, humanen Stammzellen in reife Podozyten differenziert werden [10].

Podozytenstress kann durch Einwirkung toxischer Substanzen, z.B. Medikamente oder durch Anpassungsmechanismen, z.B. Hyperfiltration, auf homöostatische Veränderungen entstehen. Homöostatische Veränderungen werden exemplarisch durch Übergewicht, eine proteinreiche Ernährung oder einen Diabetes mellitus begünstigt [11-13].

1.2 Diabetes mellitus Typ 1

Diabetes mellitus Typ 1 ist eine chronische Autoimmunerkrankung. Ursächlich hierfür ist der durch das Immunsystem vermittelte, progressive Verlust der β -Zellen des Pankreas [14-17]. Eigentlich ist es Aufgabe des Immunsystems, Fremdantigene zu erkennen und zu bekämpfen. Wichtig ist hierbei die Unterscheidung von körpereigenen Strukturen: werden bei der Reifung von T-Lymphozyten im Thymus und B-Lymphozyten im Knochenmark autoreaktive Zellen erkannt, werden diese abgebaut. Man spricht von negativer Selektion. Wenn diese nicht eliminiert werden und in die Peripherie gelangen, kann es zu Autoimmunerkrankungen, wie dem DM1, kommen [7, 18-20]. Nach Einsetzen der autoimmunen Reaktion kommt es zu einer charakteristischen, lymphozytären Infiltration der β -Zellen, einer Insulitis. Hierdurch werden die Insulinproduzierenden Zellen zerstört, was sich schließlich im Krankheitsbild des DM1 äußert. In diesen Prozess sind Zellen des angeborenen Immunsystems involviert, welche reaktiv Zytokine produzieren und so die Apoptose der β -Zellen steigern. Weiterhin werden die β -Zellen von Inselzell-spezifischen T-Zellen infiltriert [21-23]. Bei den T-Zellen handelt es sich vor allem um CD_4^+ und CD_8^+ T-Lymphozyten [24-26]. CD_4^+ T-Helferzellen (Th_{1-2} und T_{reg}) unterteilt man gemäß ihrer Zytokinproduktion [27, 28]. Die Zytokine der Th_1 -Zellen sind für die zelluläre Immunantwort verantwortlich und lösen eine rasch fortschreitende Reaktion aus, wie sie beim DM1 zu beobachten ist [29].

Da sich die Erkrankung in der Regel klinisch erst bei einem Verlust von 90-95% der β -Zellen äußert, wird die Diagnose oft erst im Stadium der Ketoazidose gestellt [14]. Patienten präsentieren sich häufig zunächst mit Polyurie, Polydipsie

und Gewichtsverlust, aber auch mit allgemeinen Symptomen wie Übelkeit und Erbrechen [30]. Für die Diagnose „Diabetes mellitus“ müssen gemäß der American Diabetes Association folgende Kriterien erfüllt sein:

- entweder Nüchternplasmaglucoose ≥ 126 mg/dl
- oder der Wert der zwei Stunden Plasmaglucoose des Oralen Glucosetoleranztests >200 mg/dl (durchgeführt gemäß World Health Organisation)
- oder der HbA1c $\geq 6,5\%$
- oder ein Zufallswert der Plasmaglucoose ≥ 200 mg/dl bei Vorhandensein typischer klinischer Symptomatik einer Hyperglykämie vorliegen [31].

Aufgrund des Autoimmungeschehens lassen sich bei DM1 serologische Marker als Hinweis für das Vorliegen eines DM1 bestimmen. Hierzu zählen Autoantikörper gegen Insulin (IAA), Tyrosin Phosphatase (IA2 und IA2- β), Glutamat-Decarboxylase der β -Zelle (GAD65A), Zinktransporter 8 der β -Zelle (ZnT8) und Inselzellantikörper (ICA) [32-37]. Durch die Autoantikörper-vermittelte Zerstörung der β -Zellen kommt es zu einem absoluten Insulinmangel. Entsprechend besteht die Standardtherapie in der Substitution von Insulin [38].

Eine Prädisposition für das Auftreten eines DM1 kann durch bestimmte genetische Faktoren gegeben sein, die die HLA Haplotypen der Klasse II auf Chromosom 6p21 betreffen [39]. Antigene werde von diesen HLA Haplotypen über Aminosäuren präsentiert. Durch genetisch bedingten Austausch dieser Aminosäuren kann es zu einer verstärkten Präsentation von Autoantigenen kommen [16, 17]. Auch eine positive Familienanamnese kann das Risiko, an DM1 zu erkranken, erhöhen [40]. Die Zahl, der an DM1 erkrankten Kinder und Jugendlichen in Deutschland in einem Alter zwischen 0 bis 19 Jahren, wurde 2012 auf 30.000 bis 32.000 geschätzt, denn es gibt keinen nationalen Register für DM1 [41]. DM1 ist die häufigste Stoffwechselerkrankung im Kindesalter, wobei die Inzidenzrate bei 13,1/100.000 Kindern im Alter zwischen 0 bis 14 Jahren liegt und jedes Jahr um 3-4% ansteigt. Jungen sind häufiger betroffen als Mädchen [42, 43].

Im Verlauf des DM1 kann es zu mikro- und makrovaskulären Komplikationen kommen (Tab. 1). 30-35% der Typ 1 Diabetiker entwickeln eine diabetische Nephropathie, die zu einem terminalen Nierenversagen (ESKD) führen kann [44].

Tabelle 1: DM1-assoziierte Folgeerkrankungen

mikrovaskulär	makrovaskulär
Nephropathie [70-74]	Kardiovaskuläre Erkrankungen [75-77]
Neuropathie [78, 79]	
Retinopathie [80-82]	

1.3 Diabetische Nephropathie

Die diabetische Nephropathie entsteht nach mehrjährigem Bestehen des DM1, wenn die Niere längerfristig hohen Glucosekonzentrationen ausgesetzt war [45-47].

1.3.1 Molekulare Mechanismen

Metabolische Signalwege

Durch die Hyperglykämie werden Proteine nicht-enzymatisch zu advanced glycation endproducts (AGEs) glykiert. Sie bilden sehr stabile, stark vernetzte Komplexe, die nicht von Enzymen abgebaut werden können und sich im Gewebe anreichern [48-53]. Auch in renalen Strukturen kommt es zur Akkumulation, was durch eine Strukturänderung des Gewebes zu einem Funktionsverlust führt [54]. AGEs binden an die Oberflächen von Zellen und können Einfluss auf die Zellaktivität nehmen [55-60]. So werden bei Bindung an den receptor for AGEs (RAGE) werden intrazellulär die nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B), Phosphoinositid-3-Kinase/Akt und mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalwege aktiviert. Die Aktivierung dieser Signalwege führt zu einer verstärkten Produktion proinflammatorischer Zytokine [61, 62]. Weiterhin werden durch die Bindung von AGEs intrazellulär reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. Diese steigern über NF- κ B die Expression des Wachstumsfaktors Transforming Growth Factor β (TGF- β). TGF- β regt die Bildung von Extrazellulärmatrix an und führt so zu einer Entstehung von Fibrose [63, 64]. Strukturelle Umbauprozesse des Tubulussystems werden zudem durch Zytokine und Wachstumsfaktoren begünstigt [65]. Durch vermehrte Natriumrückresorption im proximalen Tubulus, sowie einen gesteigerten Einbau von Natrium-Glucose-Co-Transportern kommt es zu einem Druckabfall in der afferenten Arteriole. Durch den reduzierten hydrostatischen Druck in Tubulus und Arteriole sowie den veränderten Natriumgehalt im Tubulussystem, wird über das tubuloglomeruläre Feedback der Macula densa die Filtration gesteigert. Es kommt zur glomerulären Hypertension und Hyperfiltration. So werden der

verringerte Druck und die veränderten Natriumkonzentrationen kompensiert [13, 66, 67]. Im Verlauf kommt es zur Tubulopathie mit Einlagerung von Glykogen in den Tubuli (Armanni-Ebstein-Zellen). Tubuloepitheliale Zellen hypertrophieren und Entzündungszellen infiltrieren das Gewebe [68].

Weiterhin wirken ROS durch Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms proinflammatorisch. AGEs induzieren zudem einen apoptotischen Zelltod von Mesangiumszellen. Auf diese Weise geht die Filtrationsbarriere der Niere zugrunde, sodass es zu einer Hyperfiltration und Mikroalbuminurie kommt – Veränderungen, die der Frühphase der diabetischen Nephropathie entsprechen [69]. Bei fortbestehender Hyperglykämie aggravierern sich die initialen Umbau- und Adaptionprozesse der Niere zu chronischen Läsionen. Durch tubulointerstitielle Fibrosierung und Mesangiolyse kommt es zu einer Makroalbuminurie und schließlich zum Funktionsverlust der Niere [68, 70, 71].

Erhöhte Glucosewerte führen zudem zu einer gesteigerten Aktivität der Aldose Reduktase, die Glucose über Sorbitol zu Fructose umgewandelt. Akkumuliertes Sorbitol führt zu oxidativem Stress. Eine vermehrte Aktivierung des Polyol-Weges begünstigt ebenfalls die glomeruläre Hyperfiltration [72, 73].

Hämodynamische Signalwege

Der proximale Tubulus spielt bei der Rückresorption von Wasser und Elektrolyten eine entscheidende Rolle. Die Resorption wird durch den elektrochemischen Natrium Gradienten reguliert, der durch die Natrium-Kalium-ATPase erzeugt wird. Durch diesen Gradienten können Natrium-gekoppelte Transportprozesse stattfinden, beispielsweise die Glucoseresorption über den Natrium-Glucose-Co-Transporter [74]. Hyperglykämie bedingt kommt es zunächst zu einer proportional verstärkten Glucoseresorption, wodurch auch das Gesamtkörperrnatrium und das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen ansteigen (Abb. 3).

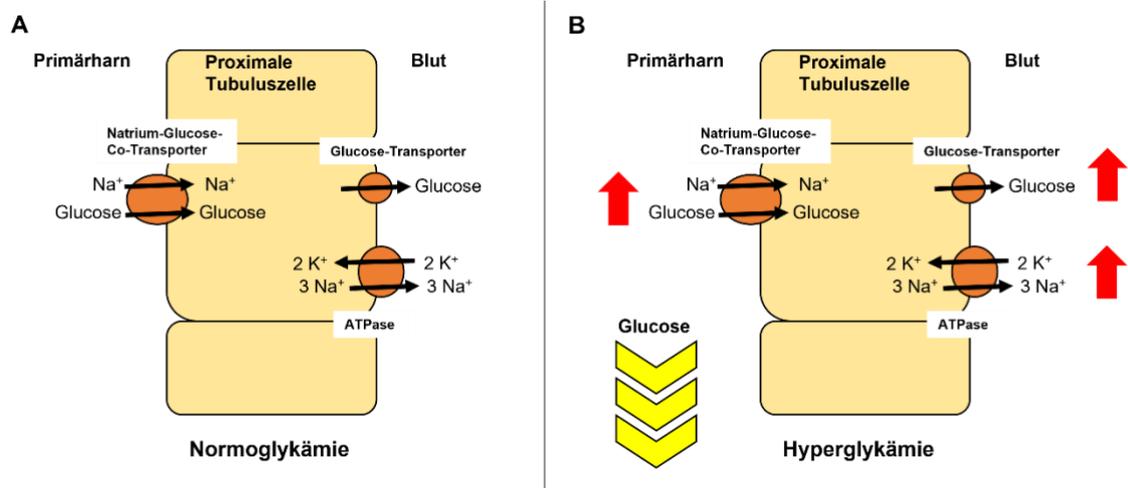


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Glucoserückresorption im proximalen Tubulus

Die Glucoserückresorption im proximalen Tubulus aus dem Primärharn erfolgt über den Natrium-Glucose-Co-Transporter (schematisch dargestellt). Die treibende Kraft ist der durch die Natrium-Kalium-ATPase erzeugte elektrochemische Natrium Gradient. Über einen Glucosetransporter gelangt die Glucose in den Blutkreislauf. Im Gegensatz zur Normoglykämie (A) kommt es bei Hyperglykämie (B) zunächst zu einer gesteigerten Rückresorption, bei Erreichen der Kapazitätsgrenze des Transporters verbleibt jedoch die überschüssige Glucose im Primärharn und wird über den Urin ausgeschieden.

Reaktiv wird atriales natriuretisches Peptid (ANP) freigesetzt, das den erhöhten Natriumspiegel durch Steigerung der Natriumausscheidung kompensiert. ANP dilatiert dazu über Kopplung mit dem RAAS die afferente Arteriole des Glomerulus, wodurch der intraglomeruläre Druck und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) steigen. Der verstärkte Blutfluss und erhöhte intrakapilläre Druck verringern die Stickstoffmonoxid Produktion an der efferenten Arteriole, sodass die Sensitivität für Angiotensin II (AT₂) steigt. AT₂ wird mit einer Stimulation von Wachstumsfaktoren und proinflammatorischen Mediatoren assoziiert [75-77]. Bei einer langfristigen Exposition des Glomerulus gegenüber der glomerulären Hypertension kommt zu den DN-typischen irreversiblen, pathologischen glomerulären Veränderungen [7, 70, 78]. Es zeigen sich mikroskopisch eine mesangiale Proliferation der Glomeruli, sowie im Verlauf zunehmend verdickte Basalmembranen [68]. Durch Apoptose der Podozyten kommt es zu einer Podozytopathie und chronischem Defekt der Filtrationsbarriere im Glomerulus [79]. Ist das Transportmaximum des Natrium-Glucose-Co-Transporters erreicht, verbleibt die überschüssige Glucose im Tubulussystem und wird mit dem Urin ausgeschieden [74].

Immunsystem und Immunantwort

Patienten mit längerfristig bestehendem DM1 präsentieren sich in der Regel mit erhöhten Entzündungsmarkern im Blutserum [80]. Chronische, inflammatorische

Prozesse lassen sich mit einer strukturellen Destruktion der Glomeruli und Tubuli, im Sinne von Podozytopathie und Tubulopathie, assoziieren. Die Ursache hierfür liegt in der Reaktion des Immunsystems.

Das Immunsystem wird in das angeborene und erworbene Immunsystem unterteilt. Das angeborene Immunsystem existiert von Geburt an und schützt den Körper durch eine unspezifische Immunreaktion vor Pathogenen und wird typischerweise initial aktiviert. Pathogene besitzen bestimmte Strukturen auf Oberflächen, die Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs), die beispielsweise Bestandteile der bakteriellen DNA sein können. Die Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere Monozyten und neutrophile Granulozyten, können die PAMPs mittels Pattern Recognition Receptors (PRRs) erkennen. Hierzu zählen Toll-like Rezeptoren oder Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomänen (NOD-like) Rezeptoren, durch die das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden können. Das Immunsystem kann zusätzlich körpereigene Gefahrensignale, sogenannte damage associated molecular patterns (DAMPs), erkennen, die bei Gewebeschädigung freigesetzt werden. Bei Detektion von PAMPs oder DAMPs werden von den Immunzellen reaktiv Zytokine und Chemokine sezerniert [81-83]. Auch Zellen, die nicht dem Immunsystem zuzuordnen sind, können PRRs exprimieren und so zur Initiation von Immunreaktionen führen [84]. Durch oxidativen Stress in der Niere bei DN interagieren ROS mit PRRs und führen über Aktivierung von NF- κ B zu einer gesteigerten Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukine (IL) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) [85]. IL-1 stimuliert die Expression chemotaktischer Faktoren, sowie die Proliferation mesangialer Zellen und erhöht die vaskuläre Permeabilität [86, 87]. IL-6 ist mit mesangialer Proliferation assoziiert und dient so als Biomarker für die Progression der DN [88-91]. IL-18 wird von aktivierten Makrophagen sezerniert und stimuliert die Sekretion von Interferon γ sowie weiterer proinflammatorischer Zytokine [86]. Weiterhin ist die IL-18 Konzentration positiv mit der Urin-Albumin-Exkretion korreliert [90-92]. TNF- α wirkt lokal proinflammatorisch und begünstigt die Chemotaxis [93]. Weiterhin sezerniert das geschädigte Nierengewebe Chemokine. Chemokine wirken homöostatisch und inflammatorisch [94]. Die Chemokinfamilie CCL2 fördert die Differenzierung von Makrophagen und fördert so die Immunantwort [95]. Durch verstärkte Zytokin- und Chemokin-Sekretion wird das erworbene, adaptive Immunsystem aktiviert. Das adaptive

Immunsystem besteht aus der zellulären (T-Zellen) und humoralen (B-Zell-Antikörper und Plasmazellen) Immunantwort. Zunächst werden T-Zellen rekrutiert [96]. Bei DN wird nach Detektion des Antigens die Immunantwort durch Interaktion mit T-Zellen initiiert. Antigen-präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen im Tubulointerstitium, erkennen mit ihren PRRs extrinsische Pathogene oder intrinsische Faktoren. Durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wird die Immunreaktion potenziert [97-99]. Weitere T- und B-Zellen werden angezogen. Durch die B-Zell vermittelte Produktion von Antikörpern gegen das entsprechende Antigen, wird das immunologische Gedächtnis gebildet. Durch die Gedächtnisbildung kommt es bei erneutem Kontakt mit dem Antigen reaktiv zu einer effektiveren und schnelleren Immunantwort [100].

Im Rahmen der Immunantwort werden auch Makrophagen aktiviert, die reaktiv die Niere infiltrieren. Die Stärke der Infiltration durch Makrophagen korreliert mit dem Grad der Glomerulosklerose, interstitiellen Fibrose und Proteinurie [101-103]. Makrophagen aktivieren den TNF- α vermittelten JAK/STAT Signalweg, wodurch die Synthese von Extrazellulärmatrix und die Produktion von ROS gesteigert wird [104, 105]. Neutrophile Granulozyten scheinen ebenfalls an der Pathogenese der DN beteiligt zu sein. In diversen Studien wird die Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio als Prädiktor für den renalen, funktionellen und strukturellen Schaden herangezogen [106-108].

Aufgrund der engen Zusammenhänge zwischen Immunantwort und renalen Erkrankungen, soll der Einfluss des Immunsystems in der Pathogenese der DN in dieser Arbeit weiter untersucht werden.

1.3.2 Das NLRP3 Inflammasom

Inflammasome sind eine heterogene Gruppe zytoplasmatischer Multiproteinkomplexe, die eine Schlüsselfunktion bei der Vermittlung der angeborenen Immunantwort einnehmen. Durch ihre Rezeptoren erkennen Inflammasome Pathogene oder Noxen und aktivieren proinflammatorische Enzyme, welche dann eine Immunantwort durch gesteigerte Sekretion von Zytokinen und Chemokinen initiieren. Jedes Inflammasom verfügt über ein spezifisches Sensorprotein, mit dem es definierte Pathogene und Noxen detektieren kann [109].

Das NLRP3 Inflammasom verfügt über das Sensorprotein NLRP3. NLRP3 ist aus einer aminoterminalen Pyrin-Domäne, einer zentralen NACHT-Domäne und einer carboxyterminalen Leucin-reichen Region aufgebaut. Die NACHT-Domäne verfügt über eine ATPase Aktivität, die eine zentrale Rolle in der Rekrutierung der anderen Proteine des Inflammasoms einnimmt. Das carboxyterminale Ende ist an der Autoinhibition des Inflammasoms beteiligt [110-115]. Weiterhin enthält das NLRP3 Inflammasom das Adapterprotein ASC. ASC besitzt eine aminoternale Pyrin-Domäne und eine carboxyterminale, Caspase-Rekrutierungs-Domäne [116, 117]. Die Effektorcaspase des NLRP3 Inflammasoms ist die Caspase-1. Diese besteht aus einer aminoterminalen Caspase-Rekrutierungs-Domäne, einer zentral gelegenen katalytischen p20-Domäne und einer carboxyterminalen katalytischen p10-Untereinheit [118, 119]. Der Multiproteinkomplex ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Caspase-1 kann über zwei Signalwege aktiviert werden.

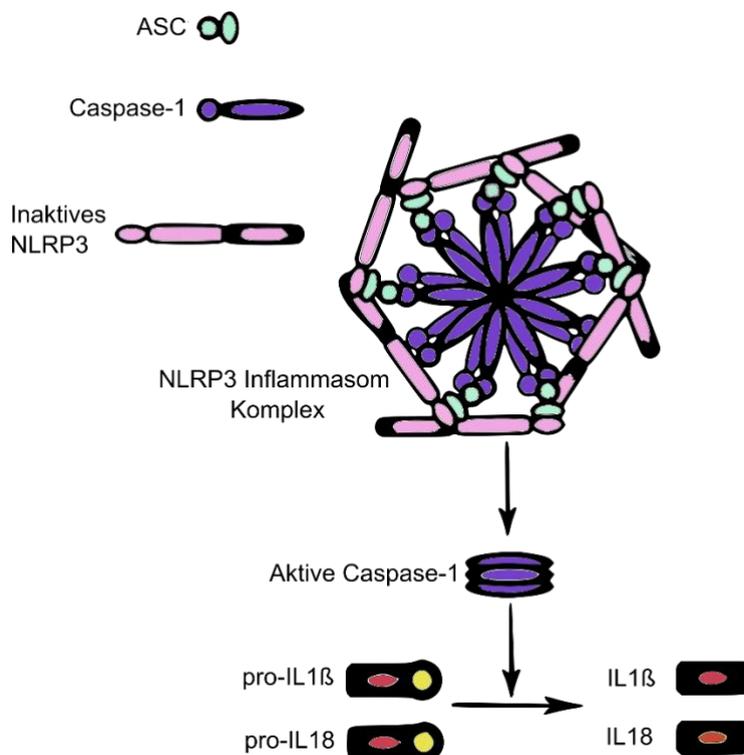


Abbildung 4: Schematische Darstellung des NLRP3 Inflammasoms

Das NLRP3 Inflammasom besteht aus drei Komponenten: dem Sensorprotein NLRP3, dem Adapterprotein ASC und der Effektorcaspase-1. Durch einen stimulierenden Reiz oligomerisiert NLRP3 und aktiviert ASC durch Bindung. Daraufhin wird die Caspase-1 aktiviert und spaltet proteolytisch die proinflammatorischen IL-1 β und IL-18 in ihre reifen Formen.

ASC Apoptosis-associated speck-like protein; IL Interleukin; NLRP3 Nod-like Rezeptor Protein 3

Kanonischer Signalweg

Veränderungen des Kalium-, Chlorid- und Calcium-Flusses, lysosomale oder mitochondriale Dysfunktion und metabolische Veränderungen gelten als

upstream Signale, die zu einer Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms führen [120-125]. Bei Detektion eines stimulierenden Reizes erfolgt zunächst das Priming, wodurch die Expression der beteiligten Proteine, NLRP3, ASC und Caspase-1, erhöht wird [126]. Bei anschließender Aktivierung oligomerisiert NLRP3 durch Interaktion seiner NACHT-Domänen, sowie der Serin-Threonin-Protein-Kinase NEK7. Durch Rekrutierung von ASC interagieren dann die Pyrin-Domänen beider Proteine und ermöglichen eine Strukturänderung von ASC aus einem helikalen Zustand zu einer Filamentbildung. Durch Zusammenlagerung vieler ASC Filamente entsteht der ASC-Speck-Komplex [127-130]. ASC-Speck aktiviert dann Caspase-1 über Interaktion der jeweiligen Caspase-Rekrutierungs-Domänen, welche sich dann selbst am Übergang der p20- in die p10-Untereinheit spaltet. Die p20-Untereinheit und die Caspase-Rekrutierungs-Domäne bleiben weiterhin am ASC-Komplex (p33) gebunden und verfügen so über eine proteolytische Funktion. Insgesamt führt die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms zu einer Aktivierung der Effektorcaspase-1 und so zu einer proteolytischen Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 (Abb. 4) [112]. Aufgrund ubiquitär exprimierter IL-1 Rezeptoren führt die IL-1 β Sekretion zu einer lokalen Entzündung, die auch auf benachbarte Zellen übergreift. Dort wirkt IL-1 β über NF- κ B Aktivierung proinflammatorisch. Die lokale Entzündung verstärkt sich selbst durch passiv sezerniertes IL-1 α , das ebenfalls proinflammatorisch auf umgebende Zellen wirkt [131, 132]. Eine Inhibition der proteolytischen Aktivität erfolgt durch Abspaltung der Caspase-1 aus dem Inflammasom-Komplex [133].

Nicht-kanonischer Signalweg

Im Falle einer bakteriellen Infektion mit gramnegativen Erregern kommt es zu einer erhöhten Lipopolysaccharid-(LPS)-Konzentration. LPS bindet an den PRR TLR4. TLR4 bildet mit dem myeloid differentiation protein 2 (MD-2) einen Komplex, der die Produktion proinflammatorischer Zytokine auslöst. Die Immunantwort potenziert sich reaktiv durch eine verstärkte Aktivierung von Caspase-4, Caspase-5 und Caspase-11. Diese Caspasen spalten Gasdermin D proteolytisch und induzieren Pyroptose [134-138]. Der nicht-kanonische Signalweg spielt also insbesondere im Pathomechanismus des Zelltodes eine Rolle. Allerdings kommt es durch Pyroptose zu einem verstärkten Kalium-Ausstrom aus der Zelle. Dieser Reiz ist wiederum ein Stimulus für die Aktivierung

des kanonischen Signalwegs. Es kommt durch Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und der Caspase-1 zu einer gesteigerten IL-1 β Sekretion und so sekundär zu proinflammatorischen Effekten [139]. Unabhängig von immunologischen Funktionen spielt das NLRP3 Inflammasom auch eine Rolle in der epithelial-mesenchymalen-Transition. So konnte gezeigt werden, dass NLRP3 den profibrotischen TGF- β Signalweg aktivieren kann und es konsekutiv zu fibrotischen Veränderungen im Tubulussystem bei CKD kommt [140-142].

Assoziierte Erkrankungen

Wenn das Gen für NLRP3 mutiert ist, resultiert eine abnorme, mechanistische Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms. Das Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrom fasst drei autoinflammatorische Erkrankungen zusammen, die auf genetischen Mutationen im Gen (CIAS1) für NLRP3 auf Chromosom 1q44 beruhen. Das Muckle-Wells-Syndrom ist eine autosomal-dominante Erkrankung, bei der sich Patienten mit rezidivierenden, periodischen Fieberschüben, Myalgien und Arthropathien präsentieren. Die Vererbung des familiären, kälteinduzierten, autoinflammatorischen Syndroms folgt einem autosomal-dominanten Muster und manifestiert sich klinisch mit urtikariellen Exanthenen nach Kälteexposition. [143, 144]. Das chronisch, infantile, neurologisch-kutane-artikuläre Syndrom kann autosomal-rezessiv oder dominant vererbt werden und zeichnet sich durch urtikarielle Exantheme, neurologische Symptome und Arthropathien aus. Bei allen Erkrankungen kommt es zu unspezifischen, für Inflammation typischen, serologischen Veränderungen, wie einem Anstieg des C-reaktiven Proteins und der Erythrozytensedimentationsrate, Anämie, Leukozytose und Thrombozytose [145].

Das NLRP3 Inflammasom spielt also eine zentrale Rolle bei etwaigen Entzündungsprozessen. Aufgrund der ubiquitären Expression von IL-1 Rezeptoren kann durch Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms die IL-1 β Sekretion zu systemischer Inflammation führen [131]. Um diese fulminante Entzündungsreaktionen eindämmen zu können, benötigt es Inhibitoren, die die Aktivität des Inflammasoms oder die Bindung von IL-1 β an seinen Rezeptor unterbinden. So wird das Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrom typischerweise mit dem IL-1 Rezeptorantagonist Anakinra therapiert. Dieser verhindert die Bindung von IL-1 β an den IL-1 Rezeptor [146]. Oridonin ist hingegen ein spezifischer NLRP3 Inflammasom-Inhibitor. Es bindet kovalent an

das Cystein an Stelle 279 in der NACHT Domäne des NLRP3 Proteins. Auf diese Weise wird die Interaktion mit NEK7 und folglich die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms verhindert [147]. Auch der Ketonkörper β -Hydroxybutyrat (BHB) verhindert die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms. Die Wirkung beruht auf einer Inhibition des Kalium-Ausstroms und einer konsekutiv erhöhten intrazellulären Kalium-Konzentration. Auf diese Weise kann sich kein ASC-Speck bilden [148, 149].

1.3.3 Klinischer Verlauf

Zusammengefasst führt eine chronische Hyperglykämie zu Adaptions- und dauerhaften Umbauprozessen in der Niere, die sich auf zellulärer, metabolischer und hämodynamischer sowie auf immunologischer Ebene abspielen und zu chronischer Inflammation führen. Mikroskopisch kann man diese Strukturveränderungen darstellen. Ursprünglich wurde die DN histologisch als Kimmelstiel-Wilson-Glomerulopathie mit diffuser, nodulärer Glomerulosklerose beschrieben. Jedoch präsentieren sich in der klinischen Routine nur noch wenige Patienten mit diesen Läsionen [150]. Klassischerweise kommt es zu einer mesangialen Proliferation in den Glomeruli [68]. Mit Progredienz der DN verdicken sich die Basalmembranen diffus [151, 152]. Durch chronischen Podozytenstress kommt es via Apoptose zu einer sekundären Podozytopathie, entsprechend nimmt die Podozytenzahl ab und die Funktion der Filtrationsbarriere wird insuffizient [79]. Aufgrund des erhöhten intraglomerulären Drucks in den Glomeruli und der afferenten Arteriole im Rahmen der Hyperfiltration entstehen vaskulären Läsionen und durch Hypoxie eine diabetische Arteriopathie in der Niere, die sich als Sklerosierung der Arteriolen histologisch nachweisen lässt [68, 71]. Im Verlauf kommt es zu einer Hypoxie der Niere aufgrund der strukturellen, vaskulären Schäden [153]. Auch an der basolateralen Seite des proximalen Tubulus kommt es zu Veränderungen. Die erhöhte Glucose- und Natriumrückresorption sowie der gesteigerte tubuläre Fluss führen zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf. Zur Aufrechterhaltung der Homöostase dient die Natrium-Kalium-ATPase. Dieser erhöhte Bedarf kann aufgrund von Kapazitätsgründen jedoch nicht kompensiert werden. Es kommt zu Hypoxie und oxidativem Stress, durch welche eine Inflammation begünstigt wird [154, 155]. Im Tubulussystem resultieren im Verlauf zunächst Fibrosierung und Mesangiolyse, dann aufgrund gesteigerter Glykogenspeicherung in den Tubuli

eine diabetische Tubulopathie. Tubuluszellen erscheinen hypertroph (Armanni-Ebstein-Zellen). Dies begünstigt die Aggravation von Resorptionsstörungen im Tubulussystem. Weiterhin kann die reaktive Infiltration von Entzündungszellen in renale Strukturen nachgewiesen werden [68].

Klinisch nimmt die Filtrationsleistung nach initialer Hyperfiltration ab, was sich in einer Abnahme der GFR widerspiegelt. Die reduzierte GFR führt zu einer Akkumulation von Kreatinin und Harnstoff im Plasma [7, 156]. Die Leitlinie der Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) teilt die DN entsprechend ihrem Verlauf in fünf Stadien ein. Dabei werden die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und Albuminurie als renale Funktionsparameter betrachtet:

- Stadium I: GFR: ≥ 90 mL/min/1,73 m² durch erhöhten glomerulären Druck und renalen Plasmafluss [157, 158]
- Stadium II: Normoalbuminurie, GFR: 60-89 mL/min/1,73 m², histopathologische Veränderungen (verdickte Basalmembran und mesangiale Expansion)
- Stadium III: Mikroalbuminurie (30-300 mg/24 Stunden), GFR: 30-59 mL/min/1,73 m²
- Stadium IV: Makroalbuminurie (> 300 mg/24 Stunden), GFR: 15-29 mL/min/1,73 m²
- Stadium V: ESRD, GFR: < 15 mL/min/1,73 m² [153, 159, 160]

Zusammenfassend sind mehrere Prozesse in der Entwicklung der DN beteiligt: Durch die Hyperglykämie kommt es zu hämodynamischen und metabolischen Änderungen sowie zur Aktivierung proinflammatorischer Immunzellen in der Niere. Reaktive Anpassungen auf zellulärer Transkriptionsebene führen zu Fibrose und Atrophie von Tubuli, Podozytopathie und einem Defekt der Filtrationsbarriere sowie glomerulärer Hypertension. Klinisch zeigt sich dies in Hypertension, Albuminurie und Niereninsuffizienz [161].

Die Primärprävention der DN besteht folglich in der Optimierung der Stoffwechseleinstellung mit angestrebtem HbA1c-Wert zwischen 6,5% und 7,5% [162].

Zur Sekundärprävention der DN werden Patienten mit Glucosestoffwechselstörung regelmäßige Urin und Blutuntersuchungen

empfohlen. Die Detektion einer Mikroalbuminurie in der Urinuntersuchung entspricht dem Frühstadium der Hyperfiltration der DN [70, 163].

Die Tertiärprävention bei DN, insbesondere im Frühstadium, kann nur sinnvoll erfolgen, wenn der Pathomechanismus genau verstanden ist. Auf diese Weise könnte frühzeitig interveniert werden, bevor es zu einer starken Inflammation kommt, und die Progression der DN verhindert oder prolongiert werden. Hyperglykämie-bedingte metabolische und hämodynamische Veränderungen führen letztendlich im Verlauf immer zu einer Aktivierung der Immunantwort, im Sinne einer gemeinsamen Endstrecke. Da die resultierende Inflammation ein wesentlicher Bestandteil in der Pathogenese der DN ist und die Progression weiter begünstigt, erscheint hier ein Angriffspunkt zur Tertiärprävention als besonders geeignet. Auch bei anderen akuten und chronischen Nierenerkrankungen konnte durch *in vivo* Experimente bereits die Relevanz der Immunregulation gezeigt werden. So wurde das NLRP3 Inflammasom als Vermittler systemischer Inflammation über Zytokin-Sekretion in diesem Kontext genauer untersucht. Hierfür wurden *Nlrp3*, *Asc* oder *Caspase-1* defiziente Mäusen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass sich bei diesen Mäusen keine renale Inflammation bildete [164, 165]. Weiterhin konnte in Wildtyp Mäusen gezeigt werden, dass bei akuten Nierenerkrankungen spezialisierte Immunzellen, wie intrarenale Makrophagen und dendritische Zellen, DAMP-like Agonisten sezernierten. Durch Interaktion mit PRRs das NLRP3 Inflammasom wurde das NLRP3 Inflammasom kanonisch aktiviert und es kam zu einer lokalen IL-1 β -induzierten Inflammation [164]. Die Rolle des kanonischen NLRP3 Inflammasoms in renalen nicht-Immunzellen bleibt jedoch aufgrund widersprüchlicher Daten zur IL-1 β Sekretion aus dem Nierenparenchym kontrovers diskutiert [166, 167]. Im Rahmen der Pathogenese der DN führt möglicherweise eine verstärkte mitochondriale ROS-Produktion durch Interaktion mit PRRs des NLRP3 Inflammasoms zu einer Aktivierung von diesem [167]. Allerdings ist die Datenlage zu diesem Punkt sehr dünn. Nur wenige Studien konnten eine Sekretion von reifem IL-1 β in parenchymalem Gewebe, Immunzell-unabhängig, nachweisen. Die Ergebnisse waren jedoch inkonsistent und teils methodisch inkorrekt generiert [166, 168-170]. Publierte Daten legen weiterhin die Aggravation der DN durch nicht-kanonische, TGF- β -abhängige, profibrotische Einflüsse in tubulären Epithelzellen nahe [140]. Aufgrund widersprüchlicher Aussagen in Bezug auf die Fähigkeit von parenchymalen,

renalen Zellen, das NLRP3-Inflammasom zu bilden, sowie teils methodisch inkorrekt generierten Ergebnissen, konnten noch nicht abschließend die Rolle des NLRP3 Inflammasoms in renalen Parenchymzellen in der Pathogenese der DN geklärt werden [166, 171].

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, aufgrund der widersprüchlichen Aussagen zur Fähigkeit von parenchymalen, renalen Zellen, das NLRP3-Inflammasom zu bilden, die Rolle des NLRP3 Inflammasoms in renalen Parenchymzellen zu klären. Als exemplarischer Podozytenstress wurde für diese Studie ein DM1 gewählt. Auf diese Weise soll die Möglichkeit der Tertiärprävention Hyperfiltrations-bedingter, struktureller Veränderungen durch gezielte Hemmung der immun-vermittelten Inflammation getestet werden. Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit sind renale, parenchymale Zellen. Die Pathogenese der DN eignet sich als zugrundeliegendes Modell gut, da hier der podozytäre Schaden eine zentrale Rolle einnimmt. Die Hypothesen, die in der vorliegenden Arbeit getestet werden sollen, sind:

1. Das podozytäre NLRP3 Inflammasom erfüllt keine kanonischen und proinflammatorischen Funktionen.
2. Die Progression der Hyperfiltrations-induzierten CKD als Frühstadium der DN wird nicht durch das podozytäre NLRP3 vermittelt.
3. Für eine Tertiärprävention eignet sich das podozytäre NLRP3 als therapeutisches Target bei Hyperfiltrations-induzierter CKD nicht. Die Progression der DN kann also nicht durch Inhibition des NLRP3 Inflammasoms als Vermittler von Inflammation verhindert werden.

Die Überprüfung dieser Hypothesen soll *in vitro* und *in vivo* erfolgen. Auf diese Weise soll auf zellulärer Ebene die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms an humanen Podozyten untersucht werden. Im Gegensatz zu anderen Publikationen, werden hier postmitotische, humane Podozyten verwendet, um die physiologischen Bedingungen in der Niere nachzubilden. Um die Aktivierung des podozytären NLRP3-Inflammasoms im Kontext des Gesamtorganismus im Frühstadium der DN zu untersuchen, werden zunächst bereits existierende Mausmodelle zur Diabetesinduktion optimiert. Daraufhin wird der Phänotyp des Frühstadiums der DN in genetisch modifizierten Mäusen mit überaktivem NLRP3 Inflammasom (NLRP3+) im Podozyten untersucht. Anschließend soll der Effekt auf das frühe Stadium der DN durch Inhibition des NLRP3 Inflammasoms mit Oridonin und BHB in diabetischen Wildtyp Mäusen mit dem in NLRP3+ Mäusen verglichen werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tierhaltung

Zusammensetzung des Standardfutters (ssniff Spezialdiäten GmbH)

Inhaltsstoffe	[%]	Zusatzstoffe	pro kg
Rohprotein	22	Vitamin A	25000 U
Rohfett	4,5	Vitamin D3	1500 U
Rohfaser	3,9	Vitamin E	125 mg
Rohasche	6,7	Eisen-(II)-sulfat Monohydrat	100 mg
Kalzium	1	Zinksulfat Monohydrat	50 mg
Phosphor	0,7	Mangan-(II)-sulfat Monohydrat	30 mg
		Kupfer-(II)-sulfat Pentahydrat	5 mg
		Natriumselenit	0,1 mg
		Kalziumiodat Anhydrat	2,0 mg

Fütterung mit 1,3-Butandiol Spezialfutter

Versuchstiere, die unter dem Einfluss von β -Hydroxybutyrat untersucht wurden, erhielten 1,3-Butandiol Spezialfutter ad libitum. Das Futter wurde von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH zubereitet.

+ 20% 1,3-Butandiol			
Inhaltsstoffe	[%]	Zusatzstoffe	pro kg
Rohprotein	22	Vitamin A	25,000 IU/IE
Rohfett	4,5	Vitamin D3	1,500 IU/IE
Rohfaser	3,9	Vitamin E	125 mg
Rohasche	6,7	Vitamin K3	20 mg
Stärke	34,9	Vitamin C	-
Zucker	5,2	Kupfer	5 mg

Sonstige Materialien für die Tierhaltung

Name	Hersteller
1,3-Butandiol Spezialfutter	ssniff
Einstreu aus Espenholz	ssniff Spezialdiäten GmbH
Käfige	Tecniplast
Mouse House red	Tecniplast
Nagestübchen aus Espenholz	Tapvei
Nestlets	Ancare
Standardfutter	ssniff Spezialdiäten GmbH
Tierfutter	Tecniplast
Tränkeflasche	Tecniplast

3.1.2 Einwegmaterialien

Sofern nicht anders beschrieben, wurden Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen von Carl Roth GmbH & Co. KG, Corning Science, Eppendorf AG, Greiner Bio One International GmbH und TPP Techno Plastic Products AG bezogen.

Name	Hersteller
96 Well Lightcycler Platte	Sarstedt AG & Co. KG
96F microwell plate without lid	Thermo Fisher Scientific Inc.
96 well Zellkultur	TPP Techno Plastic Products AG
BD Microlance™ 3, 30G 1 2"	Becton, Dickinson & Company Ltd
BD Plastipak™ Spritze	Becton, Dickinson & Company Ltd
Disposable scalpel No. 11 pfm	Feather Safety Razor Co. Ltd.
Einbettkassetten	neoLab Migge GmbH
Ethibond Excel 5-0	Ethicon Deutschland
Kapillarröhrchen beidseitig offen 32 x 0,8mm ø, nicht heparinisiert	neoLab Migge GmbH
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt AG & Co. KG
Leukoplast® hospital	BSN medical GmbH
Lysing Matrix D, 2 mL Tube	MP Biomedicals, LLC
Menzel Deckgläser für Mikroskopie	Thermo Fisher Scientific Inc.
Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc.
Paraplast® for tissue embedding	Merck KGaA
Quali-PCR-Tubes	Kisker Biotech GmbH
Rasierklingen	Wilkinson
Sterile Mulltupfer	Verbandmittel Danz GmbH
Vicryl™ 5-0	Ethicon Deutschland
Zellkulturplatten 6 Well	TPP Techno Plastic Products AG
Zellkulturschalen 10 cm ²	TPP Techno Plastic Products AG

3.1.3 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Blutzuckermessgerät Accu Chek	Roche, Mannheim, DE
Brutmaschine Brinsea Octagon 20 Advance	J.Hemel Brutgeräte GmbH & Co.KG
Brutschrank (Hera Cell 150)	Heraeus Instruments
Deba key vascular forceps, cardio-grip, tissue angled	Integra LifeSciences Services
Decloacking Chamber NxGen Manual	Biocare Medical
Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® Tetra System)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Elektrochirurgisches Gerät (50 W)	Kruuse, Dänemark
Elektrophorese-Netzgerät (PowerPac 300)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Eye forceps, dressing, half curved	Integra LifeSciences Services
Karussell-Gewebeeinbettautomat	Shandon Citadel™, Thermo Electron Corporation
Kleintier-OP-Tisch	Medax GmbH
Knapp iris scissors, curved	Integra LifeSciences Services
Labtop Cooler Nalgene®	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Mikroskop Histologie (Leica DMRBE Research Microscope)	Leica Microsystems
Mikroskop Zellkultur (DMIL)	Leica Microsystems
Mikrowelle (800)	Severin
Modulare Paraffin-Ausgießstation (EC 350)	Microm International GmbH
Paraffin-Ausgießstation	EC 350, Microm International GmbH
Photometer (GENios Plus)	Tecan Austria GmbH
Pipetten Pipetman® P 200µl	Gilson, Middleton, USA
Pipetten 20 µl, 200 µl, 500 µl	Eppendorf
PJ3000 Waage	Mettler-Toledo
Real-Time PCR-System (LightCycler 480)	Roche Diagnostics GmbH

Rotationsmikrotom	HM 340 E, Microm International GmbH
SBA32 Waage	Scaltec
Spektrophotometer (NanoDrop 1000)	Thermo Scientific Inc.
Sterilwerkbank (Microflow Biological Safety Cabinet)	Nunc GmbH
Teststreifen Accu Chek	Roche, Mannheim, DE
Thermo-Cycler Mastercycler®pro	Eppendorf AG
Tube Roller SRT6	Stuart Equipment
Vaporizer for Forane Anesthetic (100 Series Forane Vaporizer 100 Vaporizer SurgiVet)	Smiths Medical
Vortex-Genie™ 2 G-560-E	Scientific Industries, Inc.
Wasserbad	HI 1210, Leica Instruments GmbH
Wasserbad 1013	GFL mbH
Zählkammern Neubauer improved	Roth GmbH & Co. KG
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments

3.1.4 Assays und Kits

Name	Hersteller
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories
Creatinine FS	DiaSys Diagnostic Systems GmbH
Creatinine Standard FS	DiaSys Diagnostic Systems GmbH
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
ELISA Ready-Set-Go für humanes IL-1β	Invitrogen Ltd.
Instant-ELISA Kit für humanes IL-18	Invitrogen Ltd.
Mouse Albumin ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories
PureLink™ RNA Mini Kit	Invitrogen Ltd.
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen GmbH
Urea FS	DiaSys Diagnostic Systems GmbH
VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit	Vector Laboratories

3.1.5 Chemikalien

Substanz	Hersteller
10X Standard Taq Reaction Buffer	New England Biolabs® Inc.
10X Taq Buffer without Detergent	Thermo Fisher Scientific Inc.
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
6X DNA Loading	Thermo Fisher Scientific Inc.
Aceton	Merck KGaA
Agarose	Invitrogen Ltd.
Aliquot DAB	Alfa Aesar
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG
Antigen Demasking Solution	Vector Laboratories
Anti-mouse CD31, Clone SZ31; Kat. Nr.: TA323326	Dianova
Anti-mouse WT1; Kat. Nr.: sc-393498	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-NLRP3 Rabbit Polyclonal; Kat. Nr.: DIA-310	OriGene
Aqua ad injectabilia	Braun
Atipamezol (Revertor®)	CP-Pharma
ATP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
BioStab PCR Optimizer	Biomol GmbH
Bovine Serum Albumin Fraction V	Roche, Mannheim, DE
Bovine Serum Albumin PCR grade	Thermo Fisher Scientific Inc.

Buprenorphin (Buprenovet)	Bayer Vital GmbH
Citronensäure-Monohydrat	PanReacAppliChem ITW Reagents
Creatinine FS	DiaSys GmbH
D(+)-Glucose-Monohydrat	CARL ROTH Chemikalien
Direct Red 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DirectPCR® Lysis Reagent Tail	PEQLAB Biotechnologie GmbH
DMEM (1X) + GlutaMAXTM-I	Thermo Fisher Scientific Inc.
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
dNTP Set	Thermo Fisher Scientific Inc.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS Modified 10X)	PAN-Biotech GmbH
Ethanol 96% EMSURE®	Merck KGaA
Ethanol EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur	Merck KGaA
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG
FBS	Biochrom GmbH
FBS Hyclone	Thermo Fisher Scientific Inc
Fentanyl (Fentanyl-Janssen®)	Janssen-Cilag GmbH
Flumazenil (Anexate®)	Hexal AG
Formalin, 4 % neutral gepuffert	Morphisto GmbH
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Goat Anti Rabbit IgG (H+L); Kat. Nr.: ZRB1001	LINARIS GmbH
Hexanucleotide Mix	Roche Diagnostics GmbH
Human plasma fibronectin purified protein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isofluran CP®	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH
Linear Acrylamide (5 mg/mL)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Low MW DNA Ladder	New England Biolabs® Inc.
LPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Medetomidin (Dorbene vet®)	Zoetis GmbH
Metamizol-Natrium 1 H2O (Novalgin®)	Sanofi-Aventis GmbH
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methylgrün	Fluka
MgCl2 25mM	Thermo Fisher Scientific Inc.
Midazolam (Doricum®)	ratiopharm GmbH
Mouse Albumin Purified	Innovate Research
Naloxon (Naloxon-ratiopharm®)	ratiopharm GmbH
Natriumchlorid	CARL ROTH Chemikalien
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA
Nickelchlorid 8 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Oridonin	Cayman Chemical Company
Panobinostat	Selleck Chemicals Llc
Bepanthen® Augensalbe	Bayer AG
Paraffin	Paraplast®
Paraformaldehyd	Merck KGaA
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech GmbH
peqGREEN DNA/ RNA dye	PEQLAB Biotechnologie GmbH
PMA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Polyethylenglykol 300	Selleck Chemicals Llc
Proteinase K	Qiagen GmbH
R-3-Hydroxybutyric acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Rabbit Anti-Rat IgG (H+L); Kat. Nr.: 406603	Vector Laboratories

Retinoic acid; Kat. Nr.: R2625	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RNAlater	Ambion, Inc.
RNase AWAY®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega GmbH
RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™-I	gibco®
Streptozotocin 1g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
SuperScript™ III Reverse Transcriptase (including 5x First Strand Buffer and 0,1 M DTT)	Thermo Fisher Scientific Inc.
SupplementPack Endothelial Cell GM	PromoCell
SYBR® Green I nucleic acid gel stain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs® Inc.
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences
TRIS Pufferan®	CARL ROTH Chemikalien
Trypsin 0.05 %/EDTA 0.02 %; Kat. Nr.: P10-023100	PAN-Biotech GmbH
Tween	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Urea FS	DiaSys GmbH
VectaMount™	Vector Laboratories r
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck KGaA
Xylol	Fisher Scientific UK Ltd

3.1.6 Zelllinien

RPC: Department of Medical and Surgical Critical Care, and Department of Physiological Science, University of Florence, Florence, Italy.

THP-1: TIB-202®; American Type Culture Collection (ATTC).

3.1.7 Software

Software	Version	Hersteller
ImageJ	1.53a	Wayne Rasband
GNU Image Manipulation Program	2.10.28	Spencer Kimball, Peter Mattis
EndNote X9	X9.3.3	Clarivate Analytics
GraphPad Prism	9.4.0 (673)	Dennis Radushev et al.

3.1.8 Oligonukleotidprimer für PCR und qPCR

Zielgen	Mutante Forward (5' - 3')	Wildtyp Forward (5' - 3')
A350V	GCTACTTCCATTTGTCACGTCC	CACCCTGCATTTTGTGTTG
PodoCre	AGGTTCGTTCACTCATGGA	TCGACCAGTTTAGTTACCC
	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
18s Ribosom human	GCAATTAATTCCCATGAACG	AGGGCCTCACTAAACCATCC
Nephrin human	GTCTGCACTGTTCGATGCCAATC	CCAGTTTGGCATGGTGAATCCG
Podocin human	CTGTGAGTGGCTTCTTGTCTC	CCTTTGGCTCTTCCAGGAAGCA
18s Ribosom murin	GCAATTATTCCCATGAACG	AGGGCCTCACTAAACCATCC
Nephrin murin	CAGCGAAGGTCATAAGGGTC	CACCTGTATGACGAGGTGGA
Podocin murin	CAGGAAGCAGATGTCCCAGT	TGACGTTCCCTTTTTCCATC
WT-1 murin	GGTTTTCTCGCTCAGACCAGCT	ATGAGTCCTGGTGTGGGTCTTC

3.1.9 Kulturmedien

Name	Hersteller	Katalognummer
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	D2906
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell,	C-39210

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimentelle Methoden

Tierhaltung

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit Versuchstieren der Gattung *Mus musculus* (Tab. 2) gearbeitet, die nach FELASA spezifisch pathogenfrei (SPF) gehalten wurden.

Tabelle 2: Verwendete Mauslinien

Bezeichnung im Text	Vollständiger Name	Referenz ID	Züchter
B6/J	C57BL/6J	000664	Charles River Germany (Sulzfeld)
PodoCre	B6.Cg-Tg(NPHS2-cre)295Lbh/J	008205	The Jackson Laboratory (USA)
Nlrp3 ^{WT/A350V}	B6.129-Nlrp3tm1Hhf/J, Nlrp3A350VneoR	017969	The Jackson Laboratory (USA)

Abhängig von ihrem Gewicht wurden die Mäuse in Gruppen von fünf bis acht Tieren gehalten. Die Polypropylenkäfige enthielten Einstreu, Zellstoff und ein Haus. Es herrschten $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, sowie ein zwölf Stunden Licht/Dunkel-Zyklus. Standardfutter und Wasser standen den Mäusen *ad libitum* zu Verfügung. Verwendetes Zubehör wurde bei 120°C und 1 bar Druck für 20 Minuten autoklaviert. Je nach Stärke der Verschmutzung des Käfigs wurden die Tiere bis zu drei Mal pro Woche unter sterilen Bedingungen in einen neuen Käfig umgesetzt. Zur Sicherstellung eines einheitlichen Mikrobioms wurden die Mäuse in einer Gemeinschaft gehalten (sog. Co-Housing). Studien haben gezeigt, dass es bei verschiedenen extraintestinalen Erkrankungen durch eine intestinale Überwucherung durch Pathobionten zu einem lokalen Leck im Darm kommen kann und so Erreger in den systemischen Kreislauf eindringen können. Das Immunsystem wird aktiviert, was zu systemischer Inflammation führt. Da ein ähnlicher Effekt bei der CKD nicht ausgeschlossen werden kann, sollen durch das Co-Housing Einflüsse des Mikrobioms auf inflammatorische Prozesse der Nieren eliminiert werden [172].

Zu jedem Zeitpunkt wurden die Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes eingehalten. Vor Versuchsbeginn wurden alle Tierversuche durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ: ROB-55.2-2532.Vet_02-18-127).

PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse

PodoCre Männchen wurden von The Jackson Laboratory, USA (Stock No: 008205) bezogen. PodoCre Mäuse besitzen das p2.5P-Cre Transgen. Dieses 2,5 kB große Fragment der humanen Promoter Region von NPHS2 liegt upstream einer Cre-Rekombinase Kasse. Daran schließt sich ein murines Polyadenylierungssignal an. Wenn PodoCre Mäuse mit Mäusen verpaart werden, die eine loxP-flankierte Gensequenz besitzen, dient die Cre-Rekombinase als Enzym dazu, die flankierte Sequenz zu deletieren. Die Cre-Rekombinase der PodoCre Mäuse wird ausschließlich in den Podozyten des reifen Glomerulus exprimiert [173].

Nlrp3^{WT/A350V} Weibchen wurden von The Jackson Laboratory, USA (Stock No: 017969) bezogen. Die genetische Modifikation der Mäuse erfolgt, indem ein Target-Vektor zum Einbringen einer loxP flankierten Neomycin Resistenz Kasse hergestellt wurde. Dieser Vektor wurde zusammen mit einer Punktmutation in Exon 3 (Alanin wurde an der Stelle 350 gegen Valin ausgetauscht) in reverser Orientierung in das Intron 2 des Nlrp3 Gens eingefügt. Es ergibt sich eine Missense-Mutation (Abb. 5). Chimäre Mäuse wurden in C57BL/6NCrl Mäusen gezüchtet und mit C57BL/6NCrl Mäusen rückgekreuzt. Heterozygote Spermien wurden zur Befruchtung von Oozyten von C57BL/6NJ Weibchen verwendet [174].

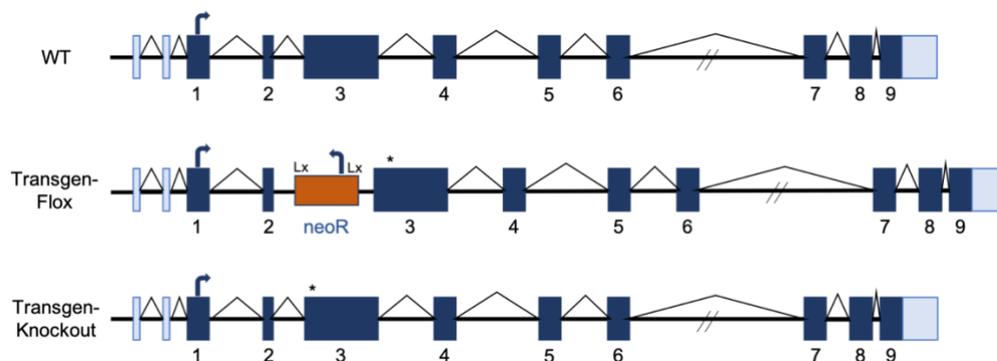


Abbildung 5: Genetisches Modell der PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse

Die genetische Modifikation erfolgt durch Einbringen einer loxP flankierten Neomycin Resistenz Kasse mit Punktmutation in Exon 3 (Alanin wurde an Stelle 350 gegen Valin ersetzt) in reverser Orientierung in das Intron 2 des Wildtyp Gens (WT) für Nlrp3. Es resultiert das Transgen-Flox mit einer Missense-Mutation. Durch Verpaarung dieser Mäuse mit Mäusen, die eine Cre-Rekombinase exprimieren, wird die floxP-Sequenz deletiert (Transgen-Knockout). Es kommt zu einer Überexpression von NLRP3.

Zuchtstrategie

Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse wurden zur Generierung einer Kolonie verwendet. Weibchen einer Tochtergeneration wurden dann mit dem PodoCre Männchen verpaart, um

PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse zu erhalten (Abb. 6). Durch Verpaarung von Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen mit PodoCre Mäusen kommt es zu einer Deletion der floxP-flankierten Sequenz, was zu einer verstärkten Expression von NLRP3 führt [175].

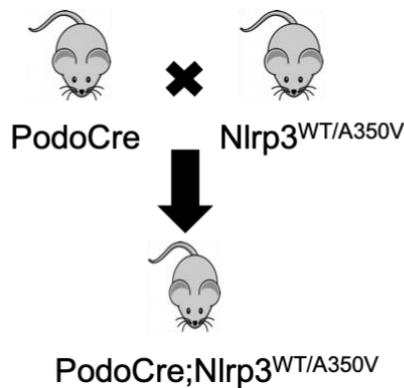


Abbildung 6: Verpaarungsstrategie zum Erhalt von PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen

PodoCre Mäuse werden mit Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen verpaart, um PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse zu generieren.

Für den Erhalt der PodoCre Linie wurde das PodoCre Männchen mit einem Wildtyp B6/J Weibchen verpaart.

Genotypisierung

Um den Erfolg der Verpaarungen zu garantieren, wurde jeder Wurf vollständig genotypisiert. Ohrlochstanzen wurden ohne Analgesie für die Genotypisierung und die eindeutige Markierung der Tiere gewonnen. Die Gewebeprobe wurde bei -20°C gelagert, bis 150 µl Direct PCR Tail Peggold und 1 µl Proteinase K zugefügt wurden. Nach vollständiger Lyse in einem Thermocycler für drei bis vier Stunden bei 55°C und 800 rpm, wurden die Proben auf 85°C für 45 Minuten erwärmt, um die Proteinase K zu deaktivieren. Das Lysat wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Das Lysat wurde für eine Endpunkt-Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Hierzu wurde ein Mastermix aus ddH₂O, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), Primern für die Zielgene, sowie einer Taq-Polymerase mit entsprechendem Puffer hergestellt (Tab. 3). Für die Reaktion wurden 24 µl des Mastermix mit 1 µl Lysat in 0,2 µl Quali-PCR-Tubes gemischt und anschließend gemäß des Protokolls in Tabelle 4 in einem Thermocycler amplifiziert. Als Kontrolle wurde stets eine Leermessung (ddH₂O), eine Wildtyp-, homozygote und heterozygote Probe mitgeführt.

Tabelle 3: Mastermix der Endpunkt PCR

Reagenz	1 [mL]
10x PE Puffer	2,5
11,25 mM dNTPs	4
Forward Primer WT	1
Forward Primer KO	1
Reverse Primer	1
Taq-DNA-Polymerase	0,2
ddH ₂ O	14,3
Gesamt	24

dNTPs: Desoxyribonucleotide, ddH₂O: doppelt destilliertes Wasser

Tabelle 4: Thermocycler Programm für PCR

Programm	Wiederholungen	Zieltemperatur [°C]	Dauer [s]
Initiale Denaturierung	1	94	300
		94	30
Amplifikation	38	59	30
		72	30
Abkühlen	1	10	∞

Für die Darstellung der Reaktionsprodukte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Für ein 2%iges Agarosegel wurden 3 g Agarose mit 150 mL 0,5 X TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) gelöst und für drei Minuten bei 600 Watt in einer Mikrowelle erwärmt. Anschließend wurde die Lösung durch dauerhaftes Schwenken des Gefäßes unter fließendem Wasser auf etwa 60°C abgekühlt und mit 7,5 µl peqGREEN als DNA-interkalierenden Farbstoff versetzt. Das Gel wurde dann in eine Gelkammer gegossen und härtete für 30 Minuten aus. Die Gelkammer wurde in die Gelelektrophoreseapparatur eingelegt und mit TBE-Puffer bedeckt. Die PCR-Produkte wurden mit jeweils 5 µl 6X DNA Loading gemischt, bevor 12 µl jedes Produkts in die Geltaschen aufgetragen wurden. Zusätzlich wurde in eine Geltasche eine DNA-Leiter (sog. Low MW DNA-Ladder) als Komigrationsstandard geladen. Die Auftrennung erfolgte unter Nutzung eines geeigneten Netzteils bei einer Spannung von 200 V für 30 Minuten. Die einzelnen Banden konnten mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und die Längen abgelesen werden. Die Längen der PCR-Produkte sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Länge der PCR-Produkte

Genotyp	Wildtyp	Homozygot	Heterozygot
A350V	248 bp	430 bp	248 bp, 430 bp
A350V*	356 bp	248 bp	356 bp, 248 bp

*bp: Basenpaare, * nach Entfernung der Neomycin Kasette durch die Cre-Rekombinase*

Expression der Cre-Rekombinase

Zur Klärung der Frage, ob die Cre-Rekombinase in PodoCre Mäusen spezifisch exprimiert wird, wurde eine Ohrstanze genommen, lysiert und mittels quantitativer PCR (Kap. 3.2.12) analysiert. Anhand der Ergebnisse der quantitativen PCR konnte nachgewiesen werden, ob die Mäuse die Cre-Rekombinase homozygot, heterozygot oder nicht (Wildtyp) exprimieren.

Intraperitoneale Injektionen

Für intraperitoneale Injektionen (i.p.) wurden die Versuchstiere im Nacken fixiert und in Rückenlage gebracht. Dabei wurde das Tier zum Kopf hin leicht schräg nach unten gehalten, sodass sich innere Organe in Richtung des Thorax verlagern konnten. Die Kanüle wurde in den rechten unteren Quadranten in einem Winkel von etwa 45° eingestochen und die Injektion injiziert. Maximal wurde ein Volumen von 10 mL/kg Körpergewicht appliziert. Das maximal zulässige Injektionsvolumen betrug für Narkotika 200 µl, für Pharmazeutika 100 µl.

Subkutane Injektionen

Für subkutane (s.c.) Injektionen wurden die Versuchstiere so fixiert, dass eine Hautfalte am Nackenfell mit Daumen und Zeigefinger gebildet werden konnte. Injiziert wurde mit einem maximalen Volumen von 10 mL/kg Körpergewicht.

Induktion des Diabetes durch Streptozotocin

Der DM1 wurde in den Mäusen durch Injektion des β -Zellgifts Streptozotocin induziert. Die Injektionslösung besteht aus Citratpuffer (drei Teile Natriumcitrat (1,47 g Natriumcitrat in 50 mL doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O)) mit 2 Teilen Zitronensäure (1,05 g Zitronensäure in 50 mL ddH₂O)) zu pH 4. Nachdem der Puffer unter sterilen Bedingungen mit einem Filter der Größe 22 µm filtriert wurde, wurde Streptozotocin in dem Puffer zu einer Konzentration von 10 mg/mL gelöst. Gewichtsadaptierte Streptozotocin Injektionen wurden, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, durchgeführt. Abhängig von dem verwendeten Versuchsprotokoll wurden 50 mg/kg KG, 60 mg/kg KG oder 120 mg/kg KG injiziert.

Oridonin Injektionen

Versuchstiere, die unter dem Einfluss von Oridonin untersucht wurden, erhielten für zwei Wochen täglich Oridonin Injektionen i.p.. Hierfür wurde eine Dosierung von 10 mg/kg KG auf Grundlage anderer Studien gewählt [176]. 2,8 mg Oridonin wurden in 140 µl DMSO zu einer Konzentration von 20 mg/mL gelöst. Anschließend wurden 560 µl PEG300 und 2,1 mL ddH₂O hinzugefügt und vermischt. Gewichtsadaptierte i.p. Injektionen wurden, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, durchgeführt.

Narkotisierung, Antagonisierung und Analgesie bei Uninephrektomie

Für die Durchführung operativer Maßnahmen wurden die Versuchstiere in das Anästhesiestadium III 2 mithilfe einer vollständig antagonisierbaren Injektionsnarkose gebracht (Tab. 6). Präoperativ wurden die Substanzen auf 37°C erwärmt und den Versuchstieren dann gewichtsadaptiert i.p. mit einer 30 G Kanüle injiziert (Kap. 3.2.1) Das Narkoseregime gewährleistete eine Narkosedauer von einer Stunde bei 37,5°C Körperkerntemperatur. Die chirurgische Toleranz wurde nach ungefähr zehn Minuten durch Testung des Zwischenzeh-Reflexes getestet. Erst wenn diese erreicht war, wurde mit der Uninephrektomie begonnen.

Tabelle 6: Mixtur für Arzneimittel für 1000g KG und Dosierung für operative Eingriffe

Verwendung	Arzneimittel	Konzentration [mg/mL]	Volumen [mL]	Dosierung [mg/kg KG]
Narkose	Fentanyl	0,05	1	0,05
	Midazolam	5	1	5
	Medetomidin	1	0,5	0,5
Antagonisierung	Flumazenil	0,1	5	1,2
	Atimapezol	5	0,5	0,5

KG: Körpergewicht

Etwa 10 Minuten vor Ende des operativen Eingriffs wurde das postoperative Schmerzmanagement durch Injektion von 0,1 mg/kg KG Buprenorphin s.c. (Kap. 3.2.1) eingeleitet. Die Narkose wurde durch s.c. Verabreichung des Antagonisten beendet. Die Versuchstiere wurden stets überwacht und in einer Brutmaschine (37,0°C) vom Zeitpunkt der Narkoseeinleitung bis zum vollständigen Erwachen warmgehalten. Der operative Eingriff wurde auf einem 42°C erwärmten Kleintier-OP-Tisch durchgeführt. Die Gabe von Buprenorphin in gleicher Dosierung wurde im 8 Stunden Rhythmus für mindestens drei aufeinanderfolgende Tage zur Schmerzreduktion fortgesetzt.

Uninephrektomie

Die Uninephrektomie der Versuchstiere wurde von Herrn Dr. Julian Marschner und Frau Dr. Manga Motrapu durchgeführt.

Sobald die Maus erfolgreich in Narkose gelegt worden war, wurde diese mit Klebestreifen an allen vier Extremitäten auf einer Wärmeplatte atraumatisch fixiert und das OP-Feld desinfiziert und rasiert. Nach Überprüfung der Narkosetiefe mittels Zwischenzehenreflex wurde einseitig mit einem ca. 2cm langen Schnitt die Haut der Flanke eröffnet. Der Retroperitonealraum wurde eröffnet, die Bauchhöhle blieb intakt. Die linke Niere wurde hervorgelagert und mit einem resorbierbaren Faden (Ethicon; Vicryl 3-0) zwei Ligaturen nahe des Nierenhilus gesetzt. Gefäße und Ureter wurden scharf durchtrennt und mit einem elektro-chirurgischen Gerät (50 W) verödet. Wenn keine Blutungszeichen vorlagen, wurde der Ligationsstumpf in das Retroperitoneum zurückverlagert. Der Wundverschluss der Flanke erfolgte mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl; Ethicon 5-0). Die oberen Hautschichten wurden vernäht.

Postoperativ wurde auf eine reizlose Wundheilung geachtet. Der Allgemeinzustand der Versuchstiere wurde anhand von Score-Sheets nach Schema begutachtet.

Scoring

Gemäß den Vorgaben der Regierung von Oberbayern wurden der Allgemeinzustand aller Mäuse täglich begutachtet. Hierbei wurden, der körperliche Zustand, das Fressverhalten und Sozialverhalten bewertet und Punkte von 0 bis 4, 0 unauffällig und 4 sehr schwer gestört, pro Maus vergeben. Bei einer der einmaligen Vergabe von 4 Punkten wurde das Versuchstier sofort euthanasiert. Bei der Vergabe eines Scores von 2 oder 3 Punkten, wurde die Maus beobachtet und der Score erneut nach sechs, beziehungsweise 12 Stunden erhoben. Bei jeglichen Unsicherheiten wurde stets der verantwortliche Veterinärmediziner konsultiert.

Blutentnahme, Blutzuckermessung, Uringewinnung

Zur Gewinnung von Vollblut am Versuchsende wurde den Versuchstieren nach Euthanasie durch zervikale Dislokation mit einer abgebrochenen, nicht heparinisierten Kapillare Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Das Blut wurde mit einem Tube mit 10 µl 0,5 M EDTA aufgefangen und bei 8000g für sechs Minuten zentrifugiert. Die Blutzuckerbestimmung wurde mit einem konventionellen Blutzuckermessgerät durchgeführt. Hierfür wurde entweder ein Tropfen des retrobulbär gewonnenen Blutes am Versuchsende oder mittels Schwanzspitzenbiopsie im Verlauf des Versuchs verwendet. Urin wurde mit 1,5 mL Tubes gesammelt und bei 10000g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt. Plasma und Urin wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Kreatinin Bestimmung nach Jaffé

Zur Bestimmung des Kreatiningehalts wurden 10 µl Urin (im Verhältnis 1:9 mit ddH₂O verdünnt) auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Zudem wurden 5 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl, 30 µl, 35 µl Standardlösung und 35 µl des Leerwerts (ddH₂O) in die Wells pipettiert. Das pikrinhaltige Versuchsreagenz wurde gemäß Herstellerinformation aus R1 (4 Teile) und R2 (1 Teil) hergestellt und die Platte mit je 200 µl pro Well inkubiert. Absorptionmessungen bei 492 nm wurden nach 60 (T1) und 120 (T2) Sekunden sowie 20 Minuten durchgeführt. Der Absorptionmesswert nach 60 Sekunden, sowie der Leerwert wurden von dem Wert nach 120 Sekunden subtrahiert:

$$(y = (T2 - T1) - \text{Leerwert})$$

Durch Erstellen einer Standardkurve und einer linearen Regression aus Standardwert und Absorptionwert der Probe, konnte der Kreatinin Messwert [mg/dl] bestimmt werden. Grundlage der Reaktion ist die Bildung eines orangen Farbkomplexes durch Reaktion der Pikrinsäure mit dem Kreatinin unter alkalischen Bedingungen.

Harnstoff Bestimmung (BUN)

Zur Bestimmung des Harnstoffgehalts wurden 2 µl Plasma (unverdünnt) auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Zudem wurden 2 µl, 4 µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl, 12 µl, 14 µl Standardlösung und 14 µl des Leerwerts (ddH₂O) in die Wells pipettiert. Das

Versuchsreagenz (Urease, Glutamatdehydrogenase, α -Ketoglutarat, NADP(H)) wurde gemäß Herstellerinformation aus R1 (4 Teile) und R2 (1 Teil) hergestellt und die Platte mit je 200 μ l pro Well inkubiert. Absorptionsmessungen bei 340 nm wurden nach 60 (T1) und 120 (T2) Sekunden und nach 20 Minuten durchgeführt. Der Absorptionsmesswert nach 120 Sekunden, sowie der Leerwert wurden von dem Wert nach 60 Sekunden subtrahiert. Das Ergebnis wurde mit 0,467 multipliziert:

$$(y = ((T1 - T2) - \text{Leerwert}) * 0,467)$$

Durch Erstellen einer Standardkurve und einer linearen Regression aus Standardwert und Absorptionswert der Probe konnte der Harnstoff Messwert [mg/dl] bestimmt werden. Grundlage der Reaktion ist eine doppelte enzymatische Reaktion. Urease spaltet den Harnstoff in Ammoniumionen und Hydrogencarbonat. Die Ammoniumionen werden dann von der Glutamatdehydrogenase zur Aminierung von α -Ketoglutarat zu L-Glutamat unter Verbrauch von NADP(H) verwendet.

Murine Organentnahme

Am Ende des Experiments, wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation euthanasiert. Nach Fixierung der Mäuse wurde mittels Laparotomie der Bauchraum freigelegt. Die Niere wurde aus ihrer Kapsel gelöst und dann mithilfe eines Skalpell entlang der Längsachse halbiert. Eine Nierenhälfte wurde zur histologischen Aufarbeitung für 24 Stunden in einer Einbettkassette in 4% neutral gepuffertes Formalin eingelegt. Die andere Nierenhälfte wurde entlang der Querachse halbiert. Hiervon wurde eine Hälfte in einem Tube bei -80°C und die andere in ein Tube, welches 500 μ l RNAlater zum Schutz vor Gewebeverdau durch RNasen enthielt, bei -20°C gelagert. Mit Leber, Milz, Gehirn und Herz wurde auf gleiche Weise verfahren. Die Tubes wurden bis zum Transfer in die entsprechende Gefriertruhe in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Pankreas wurde zur histologischen Aufarbeitung für 24 Stunden in einer Einbettkassette in 4% neutral gepuffertes Formalin eingelegt.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

Gesamt-RNA-Isolation

Für die Gesamt-RNA-Isolation aus einem Viertel der Niere in RNAlater wurde diese in ein 2,0 mL Tube überführt, das 500 µl eines Lysepuffers (Lösung aus Lyse Puffer des PureLink™RNA Mini Kits mit 1% 2-Mercaptoethanol) enthielt. Die Probe wurde stets auf Eis gekühlt. Mithilfe des ULTRA-TURRAX® wurde eine Homogenisierung durchgeführt (vier Mal 5 Sekunden, Stufe 4). Das Rotorblatt wurde nach jeder Homogenisierung sowohl mit 70% Ethanol als auch mit ddH₂O gereinigt. 500 µl der Suspension wurden dann mit 500 µl 70%-igem, analytischen Alkohol mit einem Vortexmischer gemischt. 700 µl aus dieser Probe wurden dann in die Säulen des PureLink™RNA Mini Kits aufgetragen.

Für die Gesamt-RNA-Isolation aus Zellen, die bei -80 °C gelagert wurden, wurden 300 µl eines Lysepuffers (Lösung aus Lyse Puffer des PureLink™RNA Mini Kits mit 1% 2-Mercaptoethanol) in das Tube zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in der Lösung resuspendiert und mit 300 µl 70%-igem, analytischen Alkohol mit einem Vortexmischer gemischt. 600 µl der Probe wurden dann in die Säulen des PureLink™RNA Mini Kits aufgetragen.

Die Säulen wurden bei 12000g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde wieder bei 12000g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Säule wurden dann mit 350 µl des Waschpuffers 1 des Kits gespült und bei 12000g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dann wurde zur Verhinderung einer Kontamination mit genomischer DNA ein DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set durchgeführt, indem 80 µl der DNase 1 Lösung in der Säule für 15 Minuten inkubiert wurde. Anschließend wurde die Säule wieder mit 350 µl des Waschpuffers 1 gewaschen (Zentrifugation 12000g, 30 Sekunden). Daraufhin wurde mit 500 µl des Waschpuffers 2 des Kits gewaschen (Zentrifugation 12000g, 30 Sekunden), wobei dieser Schritt einmal wiederholt wurde und schließlich die Säule zwei Minuten trocken zentrifugiert wurde. Die Säule wurde dann in ein neues DNase-/RNase-freies 1,5 mL Tube gesetzt und mit 32 µl RNase-freiem Wasser für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (12000g, zwei Minuten). Zuletzt wurde die freie RNA als Überstand bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Um die RNA-Reinheit zu überprüfen, wurde ein NanoDrop 1000 Spektrophotometer verwendet. Weiterhin wurde nur mit Proben gearbeitet, die eine 260/280 Ratio von 1,8 bis 2,2 und eine Konzentration über 120 ng/μl aufwiesen.

Reverse-Transkriptase-PCR

Nach Bestimmung der RNA-Konzentration der Proben wurden diese mit RNase-freiem Wasser zu einer standardisierten Konzentration von 0,13 μg/μl verdünnt und für 10 Minuten im Thermocycler bei 65°C inkubiert, um RNA-Sekundärstrukturen aufzulösen. Zur Verhinderung erneuter Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen wurde die Probe anschließend auf 4°C abgekühlt. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde ein Mastermix aus randomisierten Hexanucleotid-Primern, dNTPs, einer reversen Transkriptase mit entsprechendem Puffer, einem RNase-Inhibitor, Acrylamid und Dithiothreitol (DTT) angefertigt (Tab. 7). 2 μg der RNA wurden dann nach Zugabe von 7,45 μl des Mastermix mit einem Mastercycler®pro gemäß des Protokolls in Tabelle 8 in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Tabelle 7: Mastermix der Reversen-Transkriptase-PCR

Reagenz	1 [μl]
5x First Strand Buffer	4,5
DTT 0,1 M	1
dNTPs (25 mM je Base)	0,45
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0,5
Acrylamid 15 mg/mL	0,25
Hexanucleotid Mix	0,25
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	0,5
Gesamt	7,45

dNTPs: Desoxyribonucleotide, DTT: Dithiothreitol

Tabelle 8: Mastercycler®pro Programm für Reverse-Transkriptase-PCR

Programm	Zieltemperatur	Dauer
Umschreibung	42	120
Beendigung der Reaktion	85	5
Abkühlen	4	∞

Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Zur Umschreibung der mittels Reverser-Transkriptase-PCR erzeugten cDNA wurden 3 μl cDNA mit 126,6 μl Ampuwa® verdünnt. Hiervon wurden 8,64 μl mit 11,36 μl eines Mastermix aus den Primern (Verdünnung 1:10 mit ddH₂O) für die

entsprechenden Zielgene, SybrGreen 2x und Taq-Polymerase in eine 96-Well Platte pipettiert (Tab. 9). Es wurde ausschließlich mit Primern mit einer Schmelztemperatur von $60\pm 1^\circ\text{C}$ gearbeitet. Außerdem wurde für jede Probe die Expression der 18s rRNA (Gewebeprobe / Zellen) oder der IL-2 DNA (Genotypisierung) zur Normierung auf ein unverändertes Gen bestimmt. Nach Verschluss der Platte mit einer transparenten Klebefolie wurde diese bei 500g für 15 Sekunden zentrifugiert. Zur Quantifizierung der mRNA-Transkripte wurde ein LightCycler 480 Real-Time PCR-System (Tab. 10) verwendet. Für die Analyse der Daten wurde die LightCycler® Software verwendet. Für die Crossing-Point Analyse wurden nur Proben verwendet, die eine eindeutig zuordbare sowie von der Wasserkontrolle abweichende Temperatur-Spitze der Schmelzkurve aufwiesen. Der Peak beschreibt den ersten Zyklus, in dem die Fluoreszenz signifikant über der Fluoreszenz des Hintergrunds liegt. Der Crossing-Point (CP) ergibt sich nach Einsetzen in die Formel

$$(\Delta CP = E^{-(CP_{18srRNA} - CP_{Zielgen})})$$

durch Verwendung der softwareeigene, „Second-Derivative-Maximum“ Methode.

Tabelle 9: Mastermix der quantitativen Real-Time PCR

Reagenz	1 [µl]
Forward Primer	0,6
Reverse Primer	0,6
SybrGreen 2x	10
Taq DNA Polymerase	0,16
Gesamt	11,36

DNA: Desoxyribonukleinsäure

Tabelle 10: LightCycler 480 Programm für Quantitative Real-Time PCR

Programm	Wiederholungen	Zieltemperatur [°C]	Dauer [s]	Temperaturänderung [°C /s]
Initiale Denaturierung	1	95	300	4,4
Amplifikation	40	95	15	4,4
		60	15	2,2
		68	20	4,4
Schmelzkurve	1	95	5	4,4
		65	60	2,2
		97	-	0,11
Abkühlen	1	40	30	2,2

Albumin-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Albumin Konzentration wurde bei -20°C gelagerter Urin verwendet. Zunächst wurden die benötigten Puffer gemäß des Herstellerprotokolls vorbereitet und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert:

- Puffer 1: 0,05 M Carbonat-Bicarbonat, pH 9,6
- Puffer 2: 50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8,0
- Puffer 3: 50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, pH 8,0
- Verdünnungslösung: 50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, 0,05% Tween 20

Eine 96-Well Platte wurde mit 100 µl Goat anti-Mouse Albumin Antikörper (1:100 Antikörper in Puffer 1) je Well für eine Stunde bei Raumtemperatur (20-25°C) oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde fünf Mal mit Puffer 2 gewaschen und dann mit 200 µl pro Well des Puffers 3 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubiert. Danach wurde die Platte fünf Mal mit Puffer 2 gewaschen. In der Zwischenzeit wurden die Proben und die Standardlösung mittels Verdünnungsreihe abhängig von der Höhe des Blutzuckers des Versuchstieres dilutiert: zunächst wurden 2 µl des Urins im Verhältnis 1:10, dann weiter zu einem finalen Verhältnis von 1:150 (Blutzucker <200 mg/dl), 1:250 (Blutzucker 200-350 mg/dl) oder 1:500 (Blutzucker >350 mg/dl) verdünnt. Zur Herstellung der Standardlösung aus Maus Albumin Referenz Serum wurden 2 µl des Standards in 6,5 mL der Verdünnungslösung dilutiert. Erneut wurde eine Verdünnungsreihe angelegt: 50 µl der ersten Lösung wurden in 950 µl Verdünnungslösung und daraus 500 µl in 500 µl Verdünnungslösung überführt. Dieser Schritt wurde vier Mal wiederholt. 100 µl des Standards, der Probe oder des Leerwerts (ddH₂O) wurden dann pro Well als Duplikate aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünf Mal gewaschen und mit 100 µl des Goat anti-Mouse Albumin HRP Conjugated Antikörpers in der Verdünnung 1:100.000 für eine Stunde bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubiert. Dann wurde die Platte fünf Mal gewaschen und mit je 100 µl des Tetramethylbenzidin (TMB) Substrats für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl Puffer 3 (0,18 M H₂SO₄) gestoppt. Schließlich wurde die Absorption mit einem ELISA Reader mit einem Filter der Wellenlänge 450 nm gemessen. Für die Auswertung der Daten wurde eine Standardkurve erstellt, indem der Leerwert von dem Mittelwert der Duplikate subtrahiert wurde. Der Graph wurde so

dargestellt, dass die Standard-Konzentrationen auf der Y-Achse und die Albumin Konzentration auf der X-Achse aufgetragen wurden. Mithilfe dieses Graphs konnte die Albumin Konzentration der Probe unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt werden.

IL-1 β ELISA

Zur Bestimmung der IL-1 β Sekretion aus Zellüberständen wurden die bei -20°C gelagerten Proben aufgetaut. Die Durchführung des ELISAs folgte dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wurde eine 96-well Platte mit 100 μ l/well Fangantikörper (Coating Puffer: PBS:ddH₂O 1:10, Fangantikörper:Coating Puffer 1:250) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal gewaschen (Waschpuffer: 1X PBS mit 0,05% Tween-20) und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 200 μ l/well des 5X ELISA/ELISPOT Diluent geblockt (Diluent Konzentrat:ddH₂O 1:5). Nach einmaligem Waschen wurden jeweils 100 μ l der Proben, beziehungsweise des Standards geladen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Platte dreimal gewaschen und je 100 μ l des Detektionsantikörpers in die Wells pipettiert (Detektionsantikörper: ELISA/ELISPOT Diluent 1:250). Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde erneut fünf Mal gewaschen und dann mit je 100 μ l des Avidin-HRP-Antikörpers für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Avidin-HRP-Antikörper: ELISA/ELISPOT Diluent 1:250). Die Platte wurde dann dreimal gewaschen, für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 100 μ l/well TMB Lösung inkubiert und die Reaktion dann mit 100 μ l/well Stop Lösung (2 N H₂SO₄) beendet.

IL-18 ELISA

Zur Bestimmung der IL-18 Sekretion aus Zellüberständen wurden die bei -20°C gelagerten Proben aufgetaut. Die Durchführung des ELISAs erfolgte gemäß des Protokolls des Herstellers. Die Microwell Streifen des Standards wurden mit entsprechend angegebener Menge ddH₂O, beziehungsweise 50 μ l der Proben mit 100 μ l ddH₂O geladen. Die Inkubationszeit belief sich auf 3 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Platte sechs Mal mit Waschpuffer gewaschen (25 mL Waschpuffer Konzentrat mit 1 l ddH₂O). Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 100 μ l/well TMB Lösung wurde die Reaktion mit 100 μ l/well Stop Lösung (2 N H₂SO₄) beendet.

Schließlich wurde die Absorption jeweils mit einem ELISA Reader mit einem Filter der Wellenlänge 450 nm gemessen. Für die Auswertung der Daten wurde eine Standardkurve erstellt, indem der Leerwert von dem Mittelwert der Duplikate subtrahiert wurde. Der Graph wurde so dargestellt, dass die Standard-Konzentrationen auf der Y-Achse und die IL-1 β und IL-18 Konzentration auf der X-Achse aufgetragen wurden. Mithilfe dieses Graphs konnte dann die IL-1 β und IL-18 Konzentration der Proben bestimmt werden. Für die Proben des IL-18 ELISAs mussten die Konzentrationen aufgrund der 1:2 Verdünnung der Proben mit dem Faktor zwei multipliziert werden.

3.2.3 Histologische Methoden

Die unten beschriebene histologischen Aufarbeitung, sowie die Anfertigung etwaiger Färbungen wurden, nach Absprache, von Frau Janina Mandelbaum und Frau Anna Amanafidou (Medizinisch-Technische Assistenten, Nephrologisches Zentrum der Med. Klinik und Poliklinik IV des LMU Klinikums) angefertigt.

Formalin-Fixierung und Paraffineinbettung

Nach der Entnahme des Organs, wurde dieses in 10% neutral gepuffertes Formalin (Anteil an Formaldehyd: 4%) für 24 Stunden eingelegt. Die Volumen Ratio Gewebe:Formalin entsprach hierbei 1:10. Anschließend wurde das Gewebe mit Einbettkassette in 70%igen Ethanol überführt und in einem Karussell- Gewebereinbettautomaten gemäß Tabelle 11 in Paraffin eingebettet.

Tabelle 11: Paraffineinbettung

Schritt	Inhalt	Dauer [Stunden]	Temperatur [°C]
1	70 % Ethanol	2	RT
2	96 % Ethanol	1	RT
3	96 % Ethanol	1	RT
4	100 % Ethanol	1	RT
5	100 % Ethanol	1,5	RT
6	100 % Ethanol	2	RT
7	Xylol	1	RT
8	Xylol	1	RT
9	Xylol	1,5	RT
10	Paraffin	2	60
11	Paraffin	3	60

RT: Raumtemperatur

Nach Prozessierung in einer Paraffin-Ausgießstation wurden die Paraffinblöcke mit einem Rotationsmikrotom in 2 μ m dicke Transversalschnitte geschnitten.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte in einem 50°C warmen Wasserbad auf einen Objektträger (Tab. 12) übertragen und über Nacht bei 50°C getrocknet.

Tabelle 12: Vorbereitung der Objektträger

Schritt	Ablauf	Dauer [Minuten]
1	100 % Aceton	5
2	Entfettung mit 100 % Aceton	5
3	0,02 %-ige Ammoniumpersulfat-Aceton-Lösung	5
4	Spülung mit ddH ₂ O	
5	Lufttrocknung	

ddH₂O: doppelt destilliertes Wasser

Vor histochemischer oder immunhistochemischer Färbung wurden die Präparatschnitte auf den Objektträgern entparaffinisiert und rehydriert (Tab. 13).

Tabelle 13: Entparaffinisierung und Rehydrierung

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

ddH₂O: doppelt destilliertes Wasser

Paraformaldehyd-Fixierung und Kryokonservierung

Zur Anfertigung immunhistochemischer Färbungen wurden entsprechende Gewebeschnitte wie folgt konserviert: die Präparate wurden nach Entfaltung im Wasserbad schwimmend auf Superfrost ultra plus Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 50°C getrocknet. Die Entparaffinisierung und Rehydrierung erfolgte gemäß Tabelle 14.

Tabelle 14: Entparaffinisierung und Rehydrierung für immunhistochemische Färbungen

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

Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

Mittels PAS-Färbung können kohlenhydrathaltige Komponenten durch Reaktion von Periodsäure und Schiff-Reagenz dargestellt werden. Die freien Hydroxylgruppen der Saccharide werden durch das PAS-Reagenz zu Aldehydgruppen oxidiert und mit schwefelsaurem Fuchsin komplexiert. Die Färbung erfolgte gemäß Tabelle 15.

Tabelle 15: PAS-Färbung

Schritt	Substanz	Dauer [Minuten]	Wiederholungen	Temperatur [°C]
1	Xylol	10	1	RT
2	100 % Ethanol	2	3	RT
3	96 % Ethanol	2	2	RT
4	Aqua dest.	5	2	RT
5	Periodic acid solution	5	1	RT
6	Aqua dest.	5	1	RT
7	Schiff-Reagenz (lichtgeschützt)	5	1	RT
8	Wasserbad	2	2	37
9	Mayer´s Hämatoxylin	4	1	RT
10	Bläuen in Leitungswasser	7	1	RT

RT: Raumtemperatur

Picro-Sirius-Red (SR)

Die SR-Färbung wurde zur Darstellung von Kollagen I und III gewählt. Siriusrot ist hierzu in einer gesättigten, wässrigen Lösung von Pikrinsäure gelöst. Die Färbung erfolgte gemäß Tabelle 16.

Tabelle 16: SR-Färbung

Schritt	Substanz	Dauer [Minuten]	Wiederholungen
1	Xylol	10	1
2	100 % Ethanol	2	3
3	96 % Ethanol	2	2
4	70 % Ethanol	2	1
5	Aqua dest.		2
6	Picro-Sirius-Red-Lösung	60	1
7	acidifiziertes Wasser		2
8	100 % Ethanol		3

Immunhistochemie: Wilms-Tumor 1 (WT-1), NLRP3 und Insulin

Die WT-1 und NLRP3 Färbungen wurden für die murinen Nieren verwendet. Zur Anfärbung der β -Zellen des Pankreas wurde mit Insulin-Immunhistochemie gearbeitet.

Nach Rehydrierung wurden die Gewebeschnitte mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) zwei Mal für je sieben Minuten gewaschen. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit 2%igem Wasserstoffperoxid / Methanol (9:1) für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inhibiert. Anschließend wurde mit PBS oder ddH₂O zwei Mal für je sieben Minuten gewaschen. Für die Demaskierung des Antigens wurden Aqua dest. mit Antigen Demasking Solution (10:1) in einer Mikrowelle aufgeköcht, dann bei 1 bar für 20 Minuten autoklaviert und nach Abkühlung in PBS gewaschen. Für den Antigennachweis wurde die endogene

Biotinproduktion des Präparats zunächst mit Avidin für 15 Minuten blockiert und mit PBS gewaschen. Dieser Schritt wurde wiederholt und dann zwei Mal für je sieben Minuten mit PBS gewaschen. Der Schnitt wurde mit dem jeweils primären Antikörper (Tab. 17) inkubiert. Nachdem erneut mit PBS zwei Mal für je sieben Minuten gewaschen wurde, wurde das Präparat mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (Tab. 17) inkubiert. Nach Waschen (zwei Mal, sieben Minuten) mit PBS wurde der Schnitt gemäß Herstellerangaben des VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kits (Reagenz A:Reagenz B 1:1, in PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Das überschüssige Reagenz wurde durch Waschen (je fünf Minuten) mit PBS und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) entfernt. Für die immunhistochemische Sichtbarkeit im Durchlichtmikroskop wurde das Präparat mit einer TRIS Lösung und Aqua dest. gewaschen. TRIS (37°C) wurde mit 3,3'-Diaminobenzidin und Nickelchlorid (8%) im Verhältnis 200:4:1 gemischt und mit 500 µl Wasserstoffperoxid (3%) versetzt. Die Gegenfärbung mit Methylgrün für vier bis fünf Minuten erfolgte anschließend. Das Präparat wurde dann in aufsteigenden Alkoholreihen, beginnend mit 96% Ethanol, entfärbt und in Xylol geklärt.

Tabelle 17: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Färbung	Antikörper	Mischverhältnis (in PBS)	Inkubationszeit	Temperatur
CD31	Primär: anti-CD31	1:200 in PBS	über Nacht	4°C
	Sekundär: Rabbit anti-Rat IgG	1:300 in PBS	30 Minuten	RT
NLRP3	Primär: Anti-NLRP3 Rabbit Polyclonal	1:1000 in 10 % Magermilchpulver in PBS	über Nacht	4°C
	Sekundär: Goat Anti-Rabbit IgG	1:300 in 10 % Magermilchpulver in PBS	30 Minuten	RT
WT-1	Primär: Anti-WT-1	1:400 in PBS	über Nacht	4°C
	Sekundär: Anti-Rabbit	1:1000 in PBS	30 Minuten	RT
Insulin	Primär: Anti-Insulin	1:5000	60 Minuten	RT
	Sekundär: Anti-Guinea-Pig B	1:300	30 Minuten	RT

RT: Raumtemperatur, PBS: phosphatgepufferte Salzlösung

Für die Objektträger aller beschriebenen Färbungen wurden VectaMount™ Eindeckgläser verwendet.

3.2.4 Histopathologische Befundung

PAS

Die histopathologische Beurteilung des Ausmaßes der Hypertrophie in der Frühphase der diabetischen Nephropathie wurde anhand von PAS-Färbungen vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden von jedem Nierenschnitt je zehn lichtmikroskopische Aufnahmen von kortikalen und juxtaglomerulären Gomeruli in 40-facher Vergrößerung gemacht. Mithilfe der Software ImageJ wurden die Glomeruli vermessen (Abb. 7). Durch Berechnung des Mittelwerts aus den Einzelwerten konnte die durchschnittliche Glomerulusgröße je Niere bestimmt werden.



Abbildung 7: Histopathologische Befundung der glomerulären Hypertrophie

Mittels PAS-Färbung wurde der Grad der Hypertrophie bestimmt. Hierzu wurde die Größe der Glomeruli durch Vermessung mit der Software ImageJ bestimmt.

SR

Die SR Färbung wurde zur Darstellung des fibrotischen Areals in Nierenschnitten gewählt [177]. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ nach lichtmikroskopischer Aufnahme von je zehn kortikalen und juxtaglomerulären Glomeruli in 40-facher Vergrößerung. Für die weitere Bildverarbeitung wurde die Software GIMP (GNU Image Manipulation Program) verwendet. Zunächst wurde das Bild auf Posterisierungsstufe 3 posterisiert (Abb. 8B). Da das Nierenparenchym aus Kollagen besteht, wurde die Farbe des Parenchyms dann als Vorlage gewählt (rote Pixel) und alle anderen Farben des Bildes entfernt, nachdem frei Hand der Glomerulus nachgezeichnet wurde (Abb. 8C-D). Für die anteilige Berechnung der Bildpixel am Gesamtbild wurde die Software ImageJ verwendet. Mit diesem Programm wurde das Bild in ein binäres Bild umgewandelt, sodass die roten Pixel nun schwarz waren. Anschließend wurde von der Software der Anteil der Pixel innerhalb des Glomerulus, gemessen an der Gesamtfläche des Glomerulus,

berechnet. Dieser Wert in Prozent entsprach der Fläche des fibrotischen Areals der Glomeruli. Zur Berechnung des fibrotischen Areals in den Glomeruli eines Nierenschnitts wurde jeweils der Mittelwert der Einzelmessungen bestimmt.

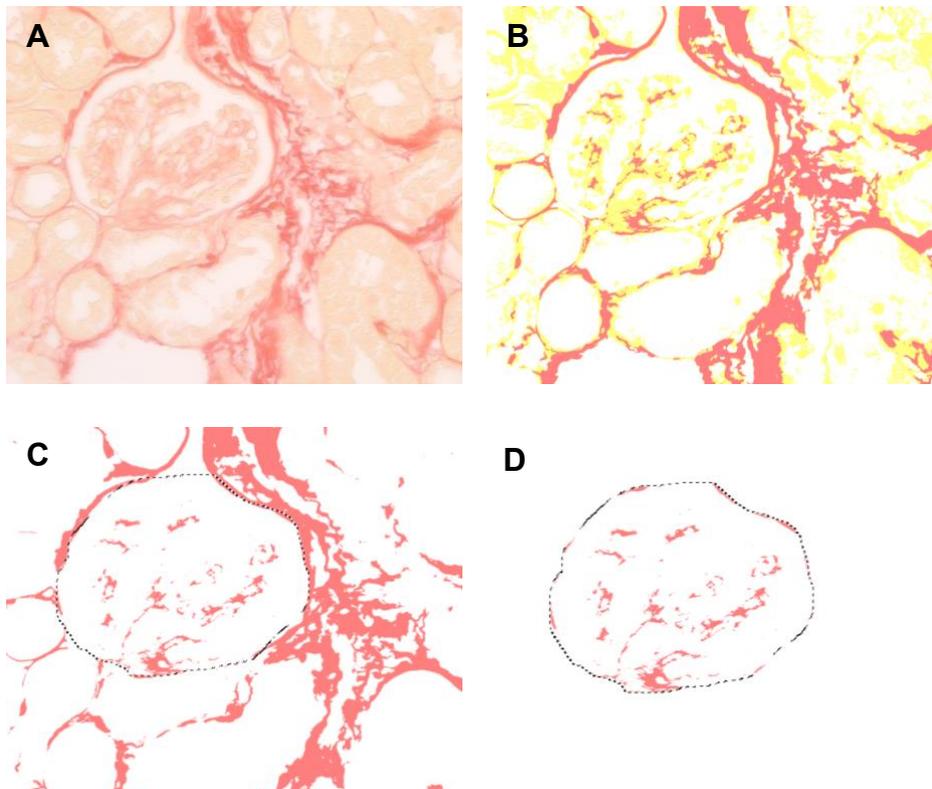


Abbildung 8: Histopathologische Befundung der glomerulären Fibrose

Mittels SR-Färbung wurde der Grad der glomerulären Fibrose bestimmt. Hierzu wurde das Bild mit den Softwares GIMP und ImageJ analysiert. (A) Originalbild, (B) Posterisieren des Originalbilds, (C und D) Darstellung des Kollagenanteils des Originalbildes und Glomerulus zur Quantifizierung der Fibrose.

WT-1

Das WT-1 Gen codiert für ein Zinkfinger Protein, das als Transkriptionsfaktor und RNA bindendes Protein wirkt [178]. Dieser Marker kann spezifisch für den Nachweis von Podozyten [179] und im Rahmen der diabetischen Nephropathie zur Quantifizierung der Podozyten im Glomerulus verwendet werden. Zu diesem Zweck wurden je zehn lichtmikroskopische Aufnahmen von Glomeruli pro Niere in 40-facher Vergrößerung angefertigt. Zur weiteren Bildbearbeitung wurde mit GIMP gearbeitet. Die Bildfarbe wurde auf Graustufen reduziert (Abb. 9B). Da die in der immunhistochemischen Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Peroxidasen Protonen entstehen, die von DAB zu schwarzen Antigen-Antikörper-Komplexen reduziert werden, entsprechen die schwarzen Bildanteile dem DAB-Umsatz, der die Podozyten darstellt. Der Glomerulus wurde frei Hand, in Korrelation mit dem Originalbild eingezeichnet und der Grauanteil entfernt (Abb. 9C). Mithilfe der Software ImageJ konnte der Anteil schwarz gefärbter Pixel, Podozyten

entsprechend, am Gesamtglomerulus berechnet werden. Der Anteil in Prozent konnte dann mit den Werten der Kontrollgruppe korreliert werden. Die Zahl der Podozyten wurde durch Auszählen der schwarzen Bildanteile bestimmt.

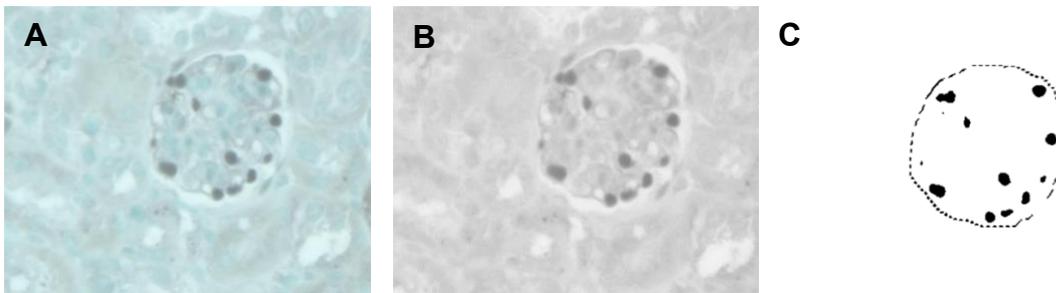


Abbildung 9: Histopathologische Befundung der Podozyten

Mithilfe der WT-1 Färbung konnte die Anzahl an Podozyten pro Glomerulus sowie die Podozytenfläche pro Glomerulus bestimmt werden. Hierzu wurde das Bild mit den Softwares GIMP und ImageJ analysiert. (A) Originalbild, (B) Darstellung des Originalbilds in Graustufen, (C) Darstellung der Podozyten.

NLRP3

NLRP3 als wesentlicher Bestandteil des NLRP3 Inflammasomkomplexes kann ebenfalls mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht werden. Zur Auswertung wurden pro Niere zehn lichtmikroskopische Aufnahmen von Glomeruli in 40-facher Vergrößerung angefertigt. Die Auswertung erfolgte im Vergleich mit einer Positiv- und Negativkontrolle. Als Positivkontrolle dienten Schnitte von Mäusen mit chronischer Oxalatnephropathie (Abb. 10B). Als Negativkontrolle wurden Schnitt von NLRP3 Inflammasom defizienten Mäusen verwendet (Abb. 10C). In einem ersten Schritt wurde beurteilt, ob überhaupt Cryopyrin nachweisbar ist. Falls ja, wurde eine Auswertung mit Auszählung der Pixelzahl mithilfe von GIMP und ImageJ, analog zur Auswertung von WT-1 Schnitten, durchgeführt und als prozentualer Wert an der Gesamtfläche der Glomerulus notiert.

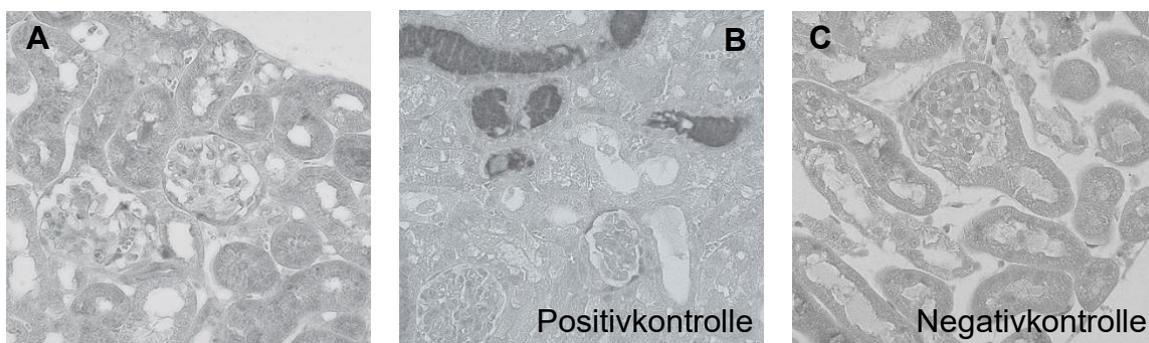


Abbildung 10: Histopathologische Befundung des NLRP3 Inflammasoms

Das Vorhandensein des NLRP3 Inflammasoms in histologischen Schnitten erfolgte mithilfe einer NLRP3-Färbung. Die Schnitte (A) wurden dann mit einer Positivkontrolle (B) von Mäusen mit chronischer Oxalatnephropathie und mit einer Negativkontrolle (C) von NLRP3 defizienten Mäusen verglichen. Im Falle eines Positivbefundes erfolgte die Analyse der Pixel mit den Softwares GIMP und ImageJ analog zu WT-1.

Insulin-Immunhistochemie

Mithilfe der Insulin-Immunhistochemie konnte der Effekt des Streptozotocins überprüft werden. Streptozotocin als toxische Substanz für die β -Zellen des Pankreas führt nach Injektion zu Nekrose und Elimination der β -Zellen durch Makrophagen. Dies führt zu einer Reduktion der β -Zellmasse. Zur Analyse der lichtmikroskopischen Pankreas Aufnahmen in 4-facher Vergrößerung wurde das Bildbearbeitungsprogramm GIMP verwendet. Die Bildfarbe wurde auf Graustufen reduziert (Abb. 11B). Da die in der immunhistochemischen Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Peroxidasen Protonen entstehen, die von DAB zu schwarzen Antigen-Antikörper-Komplexen reduziert werden, entsprechen die schwarzen Bildanteile dem DAB-Umsatz, der die β -Zellen darstellt. Das Pankreas wurde frei Hand, in Korrelation mit dem Originalbild, eingezeichnet und der Grauanteil entfernt (Abb. 11C-D). Nachdem der Grauanteil entfernt wurde, konnte mithilfe der Software ImageJ der Anteil schwarz gefärbter Pixel am Gesamtorgan berechnet werden. Der Anteil in Prozent konnte dann mit einem Pankreasschnitt einer gesunden Maus korreliert werden.

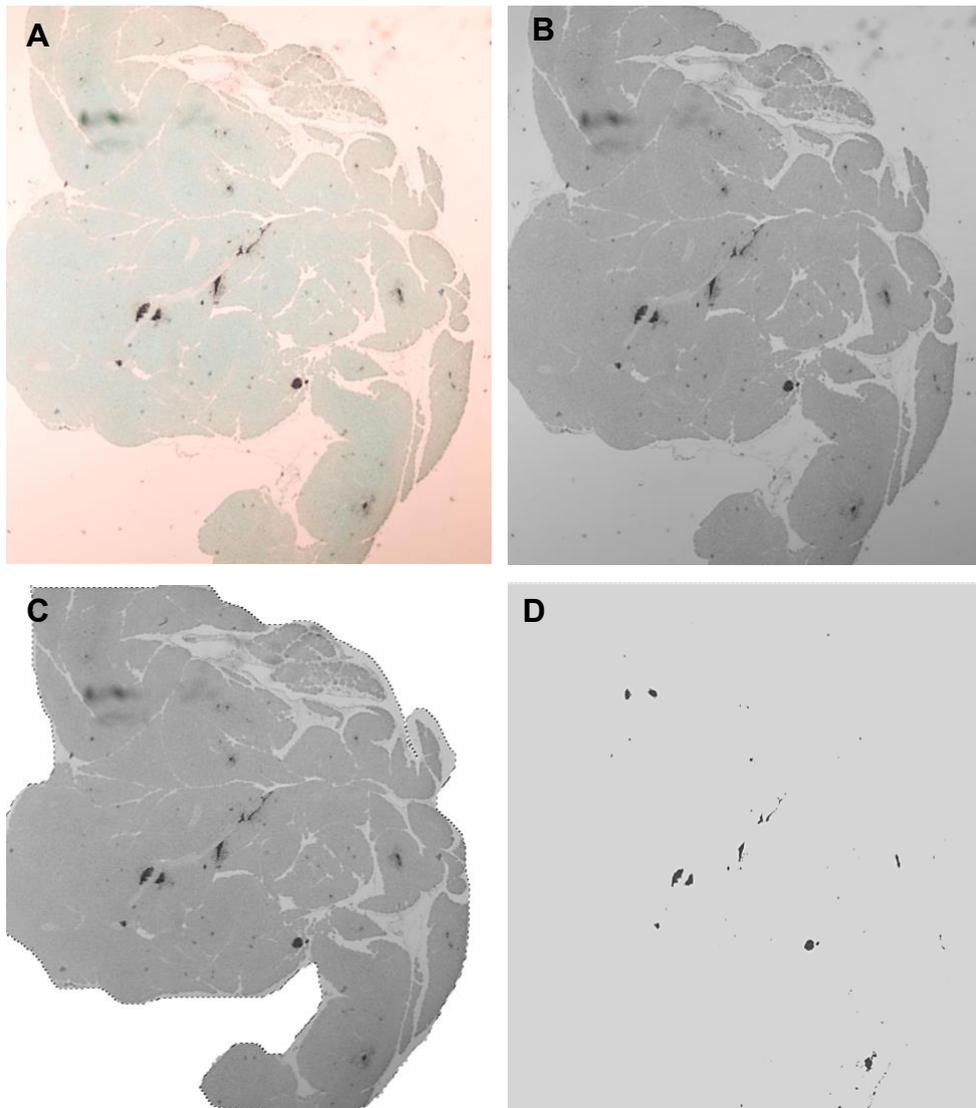


Abbildung 11: Histopathologische Befundung der pankreatischen β -Zellmasse

Die β -Zellmasse des Pankreas wurde mittels Insulin-Immunochemie-Färbung analysiert. Hierzu wurde das Originalbild (A) in Graustufen (B) umgewandelt und die β -Zellmasse am Gesamtpankreas mit den Softwares GIMP und ImageJ bestimmt (C und D).

3.2.5 Zellkultur Methoden

***In vitro* Kultivierung von renalen Progenitorzellen (RPCs)**

Renale Progenitorzellen wurden aus einer Kooperation mit den Laboren in Florenz und Foggia, Italien (Department of Medical and Surgical Critical Care, and Department of Physiological Science, University of Florence, Florence, Italy) bezogen.

Nierengewebe aus soliden Nierentumoren wurde von 20 Patienten nach Nephrektomie gewonnen. Glomeruli wurden isoliert und mithilfe von immunomagnetischer Zell-Separation so sortiert, dass sich Fraktionen an $CD24^+133^+$ und $CD24^-133^-$. CD24 und CD133 sind Marker für embryologische RPCs. Zellen, die positiv für CD24 und CD133 sind, befinden sich vorwiegend

am Übergang zwischen Glomerulus und proximalem Tubulus am Harnpol in der Bowman'schen Kapsel. Von dort wandern die Vorläuferzellen zum Mesangium und differenzieren sich zu spezialisierten Zellen [180]. Diese RPC's wurden in einem Stickstofftank gelagert, bis sie in Kultur genommen wurden. Es wurde mit Zellen der Spender Klexx und Cresciano gearbeitet.

Auftauen von Zellen

Ein Tube mit 1 bis 1,5 Millionen gefrorenen Zellen wurde mit 1 mL Endothelium Cell Growth Medium (ECGM, enthält 20 % fetales Kälberserum (FCS)) suspendiert und nach Zentrifugation (5 Minuten, 4 g) konnte der Überstand abgenommen werden. Die Zellen wurden in ECGM resuspendiert und in einer 10 cm² Zellkulturplatte ausgesät. Nach etwa 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Generell wurde das Medium alle drei Tage gewechselt und die Platte zuvor jeweils mit PBS gespült.

Ernten und Zählen von Zellen

Um die Zellzahl in einer Zellkulturplatte für weitere Experimente möglichst genau zu bestimmen, wurde das Medium der RPCs abgenommen, die Platte mit sterilem PBS gespült und mit 4 mL Trypsin/EDTA für 4 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit etwa 6 mL ECGM abgelöscht und die Suspension in einen 50 mL Falcon überführt. Nach Zentrifugation wurden Medium und Trypsin/EDTA abgenommen und die Zellen in 6 mL ECGM resuspendiert. 10 µl der Suspension wurde in eine Zählkammer pipettiert und 4 Quadranten ausgezählt. Die Zellzahl wurde mithilfe folgender Formeln berechnet:

$$\text{gezählte Zellzahl} : 4 = X$$

$$X * 10.000 * 6 = \text{Gesamt - Zellzahl}$$

Für weitere Experimente wurde die Zellsuspension entsprechend der benötigten Zell-Volumen-Ratio verdünnt.

Differenzierung von renalen Progenitorzellen in Podozyten

Für die Differenzierung von RPCs in Podozyten diente das Protokoll des Kooperationslabors in Florenz, Italien (Department of Medical and Surgical Critical Care, and Department of Physiological Science, University of Florence,

Florence, Italy). Da jedoch starkes Zellsterben beobachtet wurde, wurde das Protokoll entsprechend adaptiert und weiter etabliert.

RPCs waren durch Kultivierung nach etwa 3-4 Tagen zu 80% konfluent und konnten geerntet werden. Entsprechend der Fragestellung wurden die Zellen dann im 6-Well oder 96-Well Format ausgesät und so lange in ECGM kultiviert, bis wieder eine Konfluenz von etwa 80-100% erreicht wurde. Anschließend wurde der Zellzyklus durch eine Inkubation für 24 Stunden in ECGM ohne FCS beendet. Das Medium wurde dann in ein Differenzierungsmedium (100 mL ddH₂O oder Aqua ad injectabilia mit 1,56 g Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM-F12) und 0,12 g Natrium-Bicarbonat gefiltert) ausgetauscht. Zur Differenzierung wurde dann Panobinostat (0,1 µM) oder Tretinoin (1 mM) zugefügt. Nach 48 Stunden war der Differenzierungsprozess abgeschlossen.

Für den Nachweis der podozytenspezifischen Expression von Podocin (NPSH2) und Nephrin (NPSH1) wurde eine mRNA Isolation mit anschließender Reverser-Transkriptase-PCR und qPCR (Kap. 3.2.2) durchgeführt.

***In vitro* Kultivierung und Differenzierung von THP-1**

Humane THP-1 Zellen wurden aufgetaut und in Kultur genommen. Zur Differenzierung in reife Makrophagen wurden die Zellen in RPMI Medium mit 20% FCS, 100 µM PS und 50 ng/mL Phorbolmyristataacetat (PMA) für drei Tage kultiviert.

Metabolische Stimulation von Podozyten

Podozyten, RPCs und THP-1 als Kontrolle wurden mit verschiedenen NLRP3-Inflammasom Stimuli im 96-well Format inkubiert. Es wurde ein entsprechendes Protokoll etabliert: die Zellen wurden für drei Stunden mit einem LPS-haltigen Medium (100 ng/mL) vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für sechs Stunden mit ATP (5 mM) oder Glucose (25 mmol/l) oder beiden Substanzen inkubiert. Als Negativkontrolle fungierten unbehandelte Zellen, die für den gleichen Zeitraum kultiviert wurden.

Zur Quantifizierung der Interleukin Sekretion wurden 180 µl des zentrifugierten Überstands abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.6 Datenaufbereitung, Statistik und Darstellung

Die Datenaufbereitung erfolgte mit Microsoft Excel, die statistische Auswertung der Daten und die grafische Darstellung mit GraphPad Prism.

Zur Auswahl des geeigneten statistischen Tests wurde zunächst mit dem Anderson-Darling und Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung getestet.

Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurden die Datensätze mittels einfaktorieller oder zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) auf Signifikanz untersucht. Zur Testung auf Varianzhomogenität wurden entsprechend ein Brown-Forsythe Test mitgeführt.

Für den Vergleich zweier normalverteilter Datensätze wurde mit dem Zweistichproben t-Test gearbeitet. Bei Nicht-Vorliegen einer Varianzhomogenität wurde der Welch´s t-Test angewendet.

Im Falle nicht-normalverteilter Daten wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Das Signifikanzniveau wurde mit einem p-Wert $<0,05$ festgelegt. Für Werte unterhalb dieses p-Werts wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen. Der Unterschied eines Wertes gegenüber seines Referenzwerts ist in Abbildungen und Tabellen mit einem Stern (*) dargestellt. Der Referenzwert ist abhängig von der Fragestellung als Zeitpunkt 0 oder Kontrolle definiert. Das Verhältnis von Signifikanzniveau und errechnetem p-Wert sind wie folgt zu interpretieren:

$p < 0,05$:	*
$p < 0,01$	**
$p < 0,001$	***
$p < 0,0001$	****

4. Ergebnisse

Mit den Versuchen der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, inwiefern das NLRP3 Inflammasom in renalen Parenchymzellen an der Pathogenese der DN beteiligt ist. Hierbei wurde das Frühstadium der DN im Sinne einer funktionellen und strukturellen Adaptation an anhaltende glomeruläre Hyperfiltration untersucht. Durch die so gewonnenen Erkenntnisse sollte die Möglichkeit der Tertiärprävention durch gezielte Hemmung der immunvermittelten Inflammation abgewogen werden. Im Fokus der Arbeit standen Podozyten, da diese in der Pathogenese der DN wesentlich beteiligt sind. Hyperglykämie-bedingt kommt es im Verlauf zu einem Defekt der Filtrationsbarriere, welche durch Podozyten gebildet wird. Das NLRP3 Inflammasom wurde als Vermittler der immunvermittelten Inflammation untersucht. Nach Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms kommt es zu einer Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β . IL-1 Rezeptoren werden ubiquitär exprimiert, sodass die NLRP3 vermittelte Inflammation eine systemische Inflammation verursachen kann.

4.1 Kanonische Funktion von podozytärem NLRP3 *in vitro*

Zunächst sollte *in vitro* die kanonische, proinflammatorische Funktion des NLRP3 Inflammasoms in Podozyten untersucht werden. Durch Kultivierung und Stimulation von humanen Podozyten wurde getestet, ob NLRP3 in Podozyten eine kanonische, proinflammatorische Funktion erfüllt. Im Gegensatz zu anderen Publikationen, wurden hier postmitotische, humane Podozyten verwendet. Nur auf diese Weise können die physiologischen Bedingungen in der humanen Niere simuliert werden.

Zu diesem Zweck wurden renale Progenitorzellen (RPCs) zu Podozyten differenziert. Das ursprüngliche Protokoll des Kooperationslabors in Florenz sah eine Differenzierung mit Retinolsäure vor. Da jedoch ein starkes Podozyten-Sterben beobachtet wurde, musste das Protokoll modifiziert und optimiert werden: es wurden verschiedene Inkubationszeiten, Konzentrationen an Retinolsäure und ebenfalls eine Differenzierung mit Panobinostat getestet. Zellveränderungen wurden täglich mit dem Lichtmikroskop beobachtet. Schlussendlich zeigte das in Kapitel 3.2.5 beschriebene Protokoll mit Panobinostat als Differenzierungssubstanz und einer Inkubationszeit von 48 Stunden die besten Resultate. Nach Differenzierung wurde überprüft, ob es sich bei den Zellen tatsächlich um Podozyten handelte. Hierzu erfolgte eine RNA-

Isolation mit anschließender qPCR (Kap. 3.2.2). Die Ergebnisse der qPCR zeigten eine signifikant erhöhte mRNA-Expression des Podozytenmarkers NPHS1 bei Kultivierung mit der Differenzierungssubstanz Panobinostat (Abb. 10). Die mRNA-Expression von NPHS2 war nur geringfügig erhöht. Entsprechend handelte es sich bei den vorliegenden Zellen um Podozyten und die Differenzierung war erfolgreich. Bei Kultivierung der RPCs allein mit Medium konnte keine gesteigerte mRNA-Expression von Podozytenmarkern nachgewiesen werden (Abb. 12).

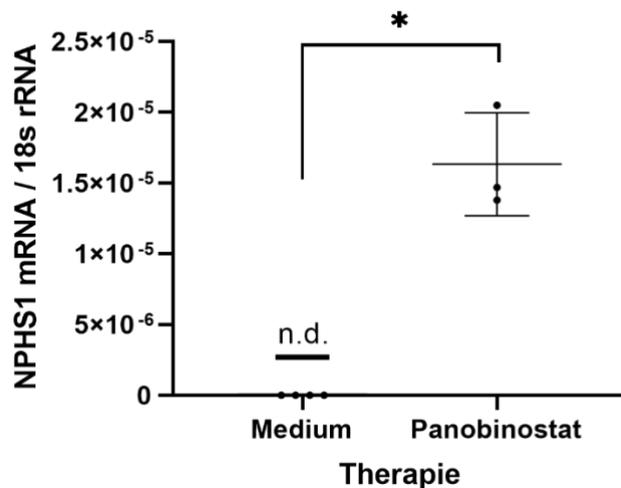


Abbildung 12: mRNA-Expressionsprofil der Podozytenmarker in differenzierten Podozyten

Die Differenzierung von RPCs in Podozyten wurde durch Analyse der mRNA-Expression der Podozytenmarker NPHS1 überprüft. Hierzu wurden RPCs, die mit der Differenzierungssubstanz Panobinostat inkubiert wurden, mit RPCs, die mit Medium inkubiert wurden, verglichen.

Zur Analyse der kanonischen, proinflammatorischen Funktion des NLRP3 Inflammasoms in Podozyten wurden die differenzierten Podozyten mit Stimulatoren des NLRP3 Inflammasoms inkubiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit LPS aktiviert und anschließend ATP als Stimulanz in das Zellmedium hinzugefügt. Zur Darstellung einer Hyperglykämie wurde zusätzlich Glucose dem Medium beigefügt (Kap. 3.2.5). Anschließend wurde der Gehalt von IL-1 β und IL-18 mittels ELISA in den Überständen analysiert (Kap. 3.2.2). Diese Stimulation wurde für Podozyten, Makrophagen (THP-1 + PMA; Kap. 3.2.5), die als Positivkontrolle dienten, und RPCs vorgenommen. Die Stimulation bewirkte keine IL-1 β oder IL-18 Sekretion in RPCs oder Podozyten (Tab. 18). Diese Ergebnisse legen keine kanonische, proinflammatorische Rolle des NLRP3 Inflammasoms in humanen Podozyten nahe. Entsprechend ist der metabolische Stress in Podozyten bei Hyperglykämie nicht mit dem kanonischen NLRP3 Inflammasom zu erklären.

Tabelle 18: Stimulation von Podozyten

Kondition	Zellen	IL-1 β [pg/mL]			IL-18 [pg/mL]		
		THP-1 + PMA	RPC	Podozyt	THP-1 + PMA	RPC	Podozyt
Medium		0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
LPS (100 ng/mL)		0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
ATP (5 μ M)		0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
LPS + ATP + Glucose (25 mmol/l)		5.41 \pm 1.39	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

ATP: Adenosinriphosphat, LPS: Lipopolysaccharid, PMA: Phorbolmyristatacetat, RPC: renale Pogenitorzelle

Diese Daten widersprechen den Daten einer durchgeführten Literaturrecherche auf Pubmed. Gemäß Literaturdaten wurde IL-1 β von Podozyten nach kanonischer NLRP3 Inflammasom Aktivierung sezerniert. Allerdings gilt zu beachten, dass in 46 von 46 Publikationen, in denen IL-1 β nachgewiesen wurde, immortalisierte humane oder murine Podozyten verwendet wurden (Abb. 13A). Aus physiologischer Sicht ist der Einsatz immortalisierter Zellen in diesem Fall problematisch, da diese Zellen noch mitotisch aktiv sind. Podozyten im menschlichen Körper sind jedoch postmitotisch und somit nicht mehr teilungsfähig. Weiterhin wurden in allen Publikationen Assays verwendet, bei denen in den technischen Informationen nicht spezifiziert wurde, ob pro- IL-1 β oder reifes IL-1 β detektiert wurde. Möglich ist somit eine falsch positive Detektion von IL-1 β in einem Großteil der Publikationen auf Basis unspezifischer Analysemethoden (Abb. 13B).

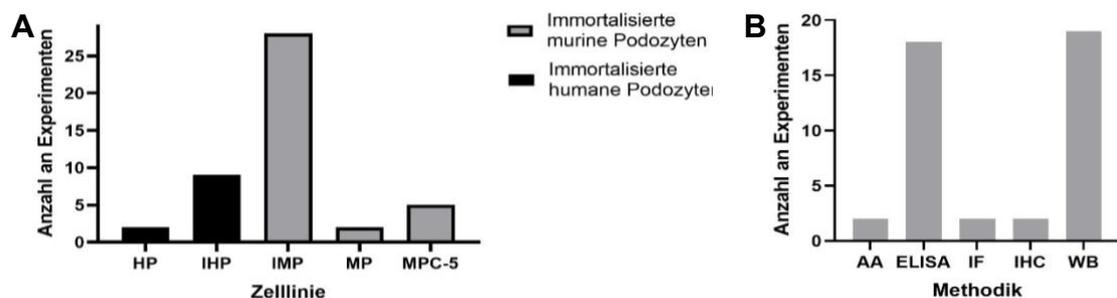


Abbildung 13: Verwendete Zelllinien und Methodik zur IL-1 β Detektion aus Literaturrecherche

Es wurde eine Literaturrecherche auf Pubmed zu verwendeten Zelllinien und der Methodik zur Detektion von kanonisch sezerniertem IL-1 β vorgenommen. (A) In n=46 Publikationen wurden immortalisierte humane (n=11) oder murine (n=38) Zelllinien verwendet. (B) Die Detektion von IL-1 β erfolgte mit Aktivitätsassays (AA), ELISA, Immunfluoreszenz (IF), Immunhistochemie (IHC) oder Western Blot (WB). HP: humane Podozyten, IHP: immortalisierte humane Podozyten, IMP: immortalisierte murine Podozyten, MP: murine Podozyten, MPC-5: muriner Podozytenklon 5.

Zusammengefasst sind die Literaturdaten zur kanonisch induzierten IL-1 β -Sekretion in Podozyten fragwürdig anzusehen.

4.2 Bedeutung des podozytären NLRP3 Inflammasoms bei DN *in vivo*

Da die Ergebnisse der *in vitro* Analysen wesentlich den Literaturdaten widersprachen, wurde die Aktivierung des podozytären NLRP3-Inflammasoms im Kontext des Gesamtorganismus im Frühstadium der DN untersucht. Hierfür muss zunächst eine Hyperfiltrations-induzierte CKD im Tiermodell erzeugt werden.

4.2.1 Induktion der anhaltenden glomerulären Hyperfiltration *in vivo*

Modelletablierung zur Induktion eines DM1

Da sich die vorliegende Arbeit der Frage widmete, inwiefern das NLRP3 Inflammasom eine Rolle in der Diabetes-induzierten glomerulären Hyperfiltration einnimmt, musste *in vivo* ein Diabetes induziert werden. Die Induktion eines DM1 in der Maus kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Dabei kann methodisch entweder ein Spontanphänotyp oder ein induzierter Phänotyp genutzt werden [181, 182]. Durch die Verwendung eines Spontanphänotyps können die Mäuse kommerziell erworben werden, sodass es keiner aufwendigen Induktion des DM1 bedarf und die Pathogenese des DM1 insbesondere bei NOD-Mäusen der Pathogenese des humanen DM1 entspricht. Allerdings ist dieses Modell aufgrund der Unvorhersehbarkeit des Manifestationszeitpunkts des DM1 nur schwer bei einer Studie einsetzbar, deren Ziel es ist, Frühstadien von DM1-assoziierten Erkrankungen zu untersuchen. Induzierbare Modelle eignen sich aufgrund des festgelegten Manifestationszeitpunkts sehr gut. Weiterhin gibt es Wildtyp-Mäuse, die im Vergleich zu anderen Mäusen anfälliger gegenüber einer DN sind, sodass diese dann bevorzugt zur Induktion eines Spontanphänotyps verwendet werden. Nachteile bei induziertem DM1 sind in potenziell unspezifischer Toxizität zu sehen, sowie der Anwendung von Mauslinien-abhängigen Dosierungsschemata, um die Toxizität auf andere Organe gering zu halten (Tab. 19).

Tabelle 19: Mausmodelle des Diabetes mellitus Typ 1

Modell	Maus-stamm	Vorteile	Nachteile	Referenz
Induziert durch Streptozotocin	C57BL/6J, C57BLKS, BALB/c, ICR, DBA2, ROP	- gut etabliert - reproduzierbarer Zeitraum - anwendbar auf Stämme, die resistent / sensibel auf DN reagieren	- potenziell unspezifische Toxizität - Mauslinien abhängige Dosierung notwendig - potenziell mutagen	[183-189]
Induziert durch Encephalomyo-carditis-Virus Variante D	DBA, Balb-C	- Reproduktion der virale Ursachen von DM1 - DBA ist anfällig für DN	- potenziell unspezifische Wirkung auf die Nieren - Mauslinien abhängige Dosierung notwendig - Effekte auf die Niere unbekannt - derzeit nur C57BL/6 erhältlich - C57BL/6 widerstandsfähig gegen DN	[190-192]
Ins2 Akita	C57BL/6, C3H	- kommerziell erhältlich - autosomal dominante Mutation	- milde Hyperglykämie bei Weibchen - Manifestationszeitpunkt für DM unvorhersehbar - Manifestationszeitpunkt für DM unvorhersehbar	[193-195]
NOD	Inzuchtstamm abgeleitet von ICR (Auszuchtstamm)	- Nachahmen des DM1 beim Menschen durch spontanes β -Zellversagen - kommerziell verfügbar	- kein geeigneter Kontrollstamm - Insulintherapie für langfristiges Überleben notwendig - Multigene Ursache verhindert leichte Kreuzungen	[196-199]

Aufgrund etablierter, publizierter Modelle wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem β -Zellgift Streptozotocin (STZ), 2-Deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosureido)-D-glucopyranose) gearbeitet, das von *Streptomyces achromogenes* synthetisiert wird [200]. STZ wird aufgrund der niedrigen Glucose-Affinität des Glucosetransporters 2 spezifisch von diesem in pankreatische β -Zellen aufgenommen [201]. Die Toxizität des STZs beruht auf DNA-alkylierenden Eigenschaften [202]. Durch induzierte DNA-Doppelstrangbrüche werden nukleäre Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen aktiviert, die NAD⁺ und ATP

verbrauchen. Durch den Energiemangel in der Zelle kommt es zum Zelltod [203]. Die maximal erreichbaren Blutzuckerwerte durch DM1 Induktion mit Streptozotocin variieren zwischen den Mausstämmen. DBA/2 und C57BL/6 erreichen 340-460 mg/dl, MRL/MP, 129/SvEv und BALB/c Mäuse lediglich 150-220 mg/dl [204]. Da in der vorliegenden Arbeit ein transgenes Mausmodell erforderlich war, wurden C57BL/6J Mäuse verwendet. Diese werden am häufigsten für transgene Mausmodelle verwendet [205]. Eine ergänzende Uninephrektomie (UnX) bewirkt eine rasche Progression der DN [206]. Da in der Literatur verschiedene STZ-Dosierungen sowie Therapieregime publiziert sind und STZ potenziell toxische Wirkungen haben kann, wurde eine Etablierungsstudie zur Optimierung der Diabetesinduktion und der Hyperfiltrations-induzierten CKD durchgeführt [189]. Ziel der Etablierungsstudie war die Induktion eines phänotypisch starken DM1 durch STZ bei gleichzeitig guter Verträglichkeit für die Mäuse.

Acht Wochen alte C57BL/6J Wildtyp Mäuse in drei Gruppen zu je fünf Weibchen und fünf Männchen wurden mit drei verschiedenen STZ-Dosierungen therapiert: 50 mg/kg Körpergewicht (KG) für 5 aufeinanderfolgende Tage, 60 mg/kg KG an jedem zweiten Tag (q.a.d.) für 12 Tage (sechs Injektionen) und 120 mg/kg KG für drei Tage (Tab. 20) Die Injektionen wurden nach einer Fastenperiode von sechs Stunden intraperitoneal (i.p.) verabreicht (Kap. 3.2.1).

Tabelle 20: Behandlungsregime zur Etablierung eines DM1 Modells

Dosisregime	Weibchen	Männchen
50 mg/kg Körpergewicht für 5 Tage	5	5
60 mg/kg Körpergewicht für 12 Tage q.a.d.	5	5
120 mg/kg Körpergewicht für 3 Tage	5	5

q.a.d.: quaque alternis die

Durch linksseitige Uninephrektomie eine Woche nach der letzten STZ-Injektion wurde das Eintreten der Hyperfiltrations-induzierten CKD beschleunigt (Kap. 3.2.1). Im Anschluss wurden wöchentlich Urin und Blut gesammelt, sowie zweimal pro Woche der Blutzucker gemessen (Kap. 3.2.1). Sechs Wochen nach Versuchsbeginn wurde das Experiment durch Euthanasie der Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation unter wirksamer Schmerzausschaltung beendet (Abb. 14).

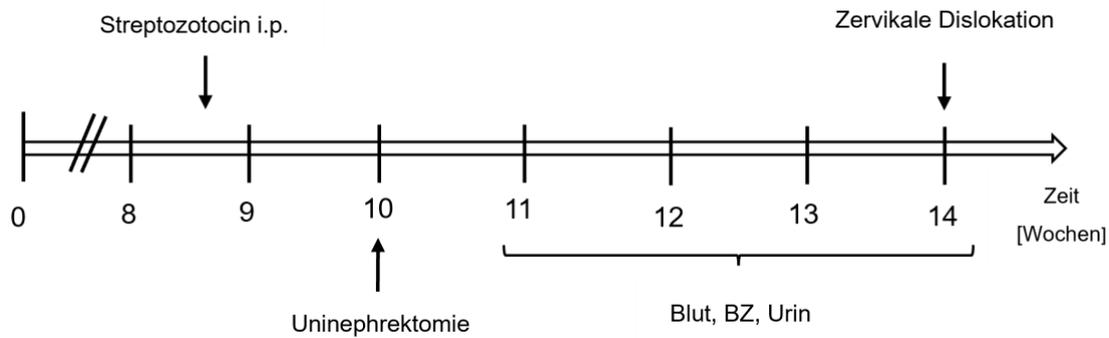


Abbildung 14: Studiendesign zur Etablierung eines Modells für DM1

Acht Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden nach Schema mit STZ zur Induktion des DM1 therapiert. Eine Woche nach erfolgter Induktion wurde eine Uninephrektomie durchgeführt. In den folgenden sechs Wochen wurde wöchentlich Blut und Urin gesammelt sowie zweimal pro Woche der Blutzucker bestimmt. Nach einer Laufzeit von sechs Wochen wurde die Studie durch Euthanasie der Versuchstiere beendet. BZ: Blutzucker, i.p. intraperitoneal.

Das Vorliegen eines DM1 wurde als langanhaltend, erhöhter Blutzucker ≥ 300 mg/dl definiert. Die 50 mg/kg KG Gruppe erreichte keine Blutzuckerwerte ≥ 300 mg/dl und erfüllte somit nicht die Kriterien eines DM1. Bei Mäusen der 60 mg/kg KG und 120 mg/kg KG Gruppe konnte nach etwa 14 bzw. sieben Tagen ein DM1 diagnostiziert werden (Abb. 15). Im Vergleich zu 50 mg/kg KG Gruppe zeigten die 60 mg/kg KG und 120 mg/kg KG Gruppe signifikant höhere Blutzuckerwerte ($p < 0,001$) (Abb. 15). Die spezifische Wirkung des STZs wurde nachgewiesen, indem Insulin-Immunhistochemisch eingefärbte Schnitte des Pankreas ausgewertet wurden (Kap. 3.2.3). Die Fläche der gefärbten β -Zellen wurde mit der Fläche des Gesamtorgans korreliert (Kap. 3.2.4). Die STZ-Gabe hat eine geschlechtsunabhängige Abnahme der β -Zellen bewirkt. Mäuse weiblichen Geschlechts zeigten alle eine signifikante Abnahme der β -Zell-Masse (50 mg/kg KG $p < 0,05$, 60 mg/kg KG $p < 0,01$, 120 mg/kg KG $p < 0,01$), wohingegen nicht alle STZ-Dosierungen zu einer signifikanten Abnahme bei Mäusen männlichen Geschlechts führten (50 mg/kg KG $p = 0,20$, 60 mg/kg KG $p < 0,05$, 120 mg/kg KG $p < 0,001$) (Abb. 15).

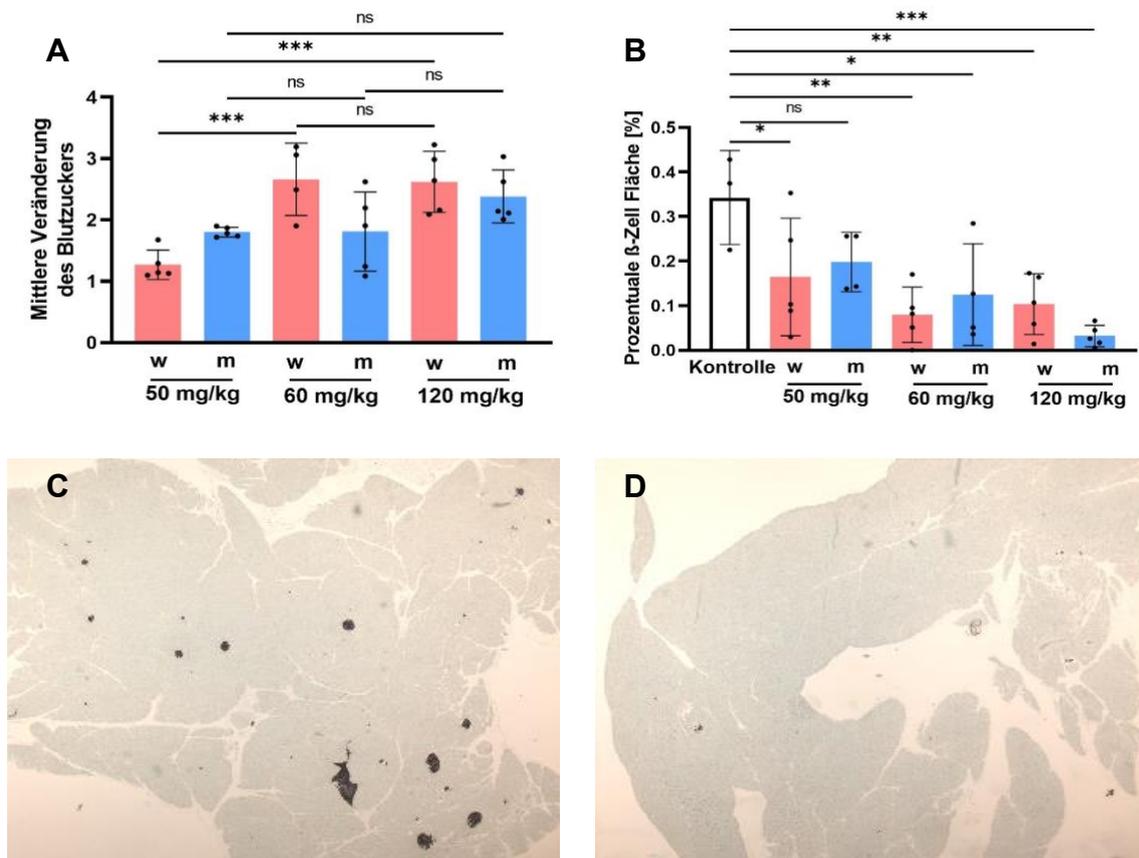


Abbildung 15: C57BL/6J Mäuse zeigen nach STZ-Behandlung Dosis-abhängig klinisch einen DM1

(A) STZ-Dosis-abhängige mittlere Veränderung des Blutzuckers mit signifikant höheren Blutzuckerwerten bei einer Dosierung von 60 mg/kg KG und 120 mg/kg KG im Vergleich zu 50 mg/kg KG in weiblichen Mäusen, (B) Prozentuale Fläche der β -Zellen an der Gesamtfläche des Pankreas, Insulin-Immunhistochemie vor (C) und nach (D) STZ-Therapie.

m: Männchen, w: Weibchen, ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

In allen Gruppen zeigte sich nach Induktion des DM1 eine initiale Abnahme des Körpergewichts. Aufgrund einer deutlichen Gewichtsabnahme und rapiden Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Mäuse nach Injektion von 120 mg/kg KG, musste das Experiment bereits 14 Tage nach Versuchsbeginn beendet werden. In den anderen Gruppen konnte nach der initialen Gewichtsabnahme eine entwicklungsgerechte Gewichtszunahme beobachtet werden. Hier bestand keine Indikation zum Abbruch des Experiments (Abb. 16).

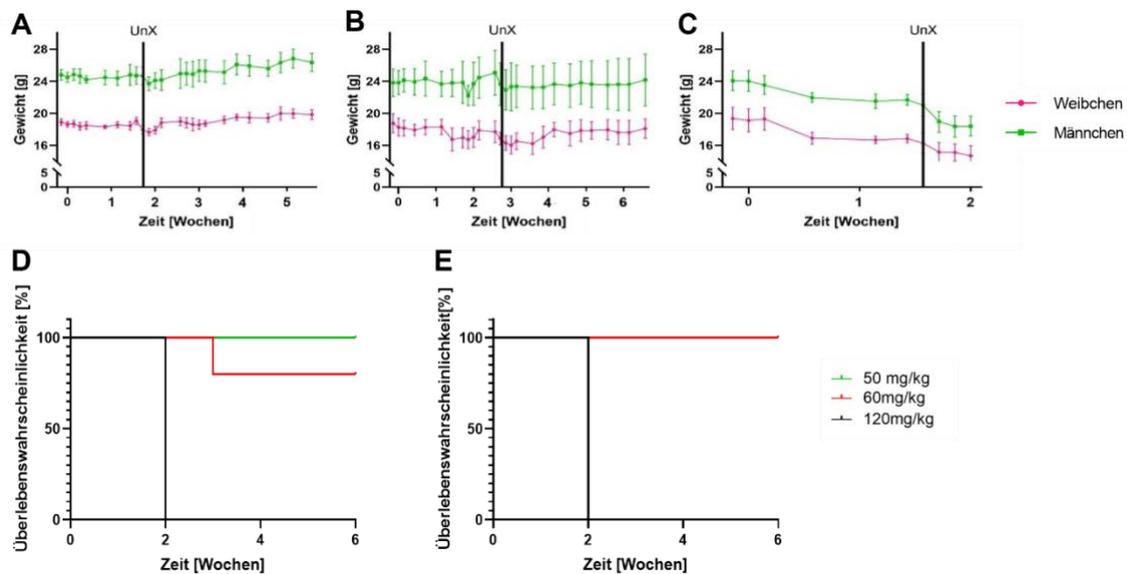


Abbildung 16: STZ-Behandlung bewirkt in C57BL/6J Mäusen eine Gewichtsabnahme

C57BL/6J Mäuse zeigen in Abhängigkeit von der STZ-Dosierung eine initiale Gewichtsabnahme bei (A) 50 mg/kg KG, (B) 60 mg/kg KG, (C) 120 mg/kg KG. Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenswahrscheinlichkeit für Weibchen (A) und Männchen (B). Frühzeitige Euthanasie der Mäuse mit 120 mg/kg KG STZ, bei rapider Verschlechterung des Allgemeinzustands und deutlicher, anhaltender Reduktion des Körpergewichts.

Als primärer Endpunkt der Studie wurde eine Erhöhung der Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR) im Urin definiert. Die Mikroalbuminurie gilt beim Menschen als frühes Anzeichen einer DN, da hier bereits eine gestörte Filtrationsbarriere zugrunde liegt. Durch die Filterstörung kommt es zu einer reduzierten Ausscheidung des Nierenretentionsparameters Kreatinin, welcher dann im Blut akkumuliert. Entsprechend führt ein Defekt der renalen Filtrationsbarriere zu einer erhöhten ACR bei erhöhtem Kreatininwert im Blutplasma. Um den frühen, initialen Nierenschaden zu beurteilen, wurde die ACR als primärer Endpunkt dieser Studie gewählt. Die ACR wurde vor Beginn der Intervention und bei Euthanasie bestimmt. Im Vergleich zu den anderen Gruppen konnte eine signifikante Zunahme der ACR nur für Mäuse der 120 mg/kg KG Gruppe beobachtet werden. Im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen wurde die ACR der 120 mg/kg KG Gruppe bereits nach zwei Wochen, aufgrund des vorzeitigen Versuchsendes, bestimmt (Abb. 17A). Die absoluten ACR nach Injektion von 60 mg/kg KG STZ erhöhte sich nicht signifikant (Abb. 17B).

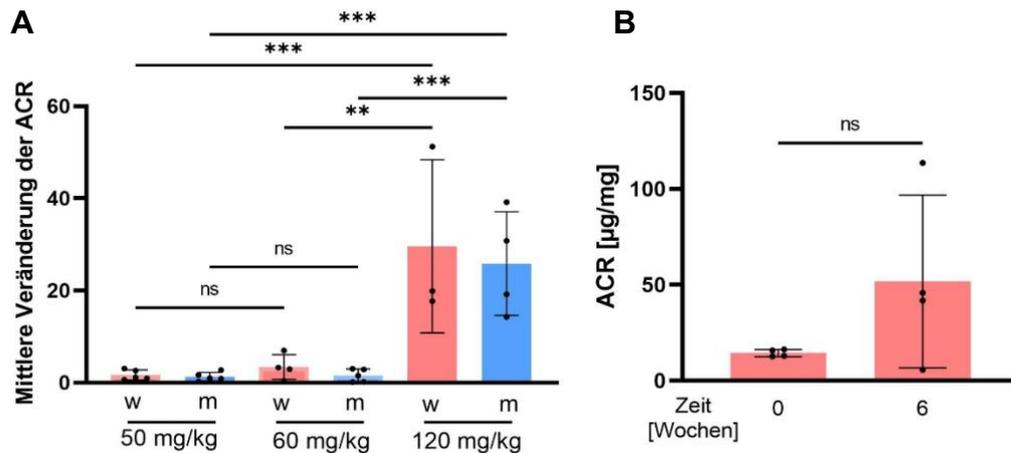


Abbildung 17: Nur 120 mg/kg KG STZ bewirkt eine signifikante ACR-Erhöhung

(A) Mittlere Veränderung der ACR. Eine signifikant stärkere Zunahme der ACR konnte nach Injektion von 120 mg/kg KG im Vergleich zu anderen Dosierungen beobachtet werden. Die Änderung der ACR bestimmte sich aus ACR vor Intervention und ACR bei Euthanasie. Entsprechend wurde die mittlere Veränderung bei 50 mg/kg KG und 60 mg/kg KG über einen Zeitraum von sechs Wochen, bei 120 mg/kg KG über einen Zeitraum von zwei Wochen ermittelt. (B) Absolute ACR-Werte vor Intervention und bei Euthanasie der weiblichen Mäuse nach Injektion von 60 mg/kg KG.

ACR: Albumin-Kreatinin-Ratio, m: Männchen, w: Weibchen, ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Zusammengefasst konnte bei Dosierungen mit 60 mg/kg KG und 120 mg/kg KG ein DM1 anhand der Blutzuckerwerte diagnostiziert werden. STZ in einer Dosierung von 120 mg/kg KG wurde jedoch von den Mäusen sehr schlecht vertragen, weshalb der Versuch frühzeitig beendet werden musste. Die prozentuale β -Zell-Masse reduzierte sich durch 60 mg/kg KG STZ Behandlung bei den weiblichen Mäusen mehr als bei den männlichen, was auf einen im Verlauf fulminant verlaufenden Diabetes hinweist. Auf Basis dieser Erkenntnisse erschien eine DM1 Induktion mit STZ in einer Dosierung von 60 mg/kg KG sowie die Verwendung von weiblichen Mäusen für weitere Experimente am sinnvollsten. Da sich innerhalb von sechs Wochen Beobachtungszeit die ACR nicht signifikant erhöhte, wurden sekundäre Endpunkte bei weiblichen Mäusen mit einer Dosierung von 60 mg/kg KG analysiert, um einen neuen Beobachtungszeitraum zu definieren. Hierzu wurden der Harnstoff im Plasma (BUN; Nierenretentionsparameter) sowie histopathologische Veränderungen untersucht (Kap. 3.2.2-3.2.4).

Der BUN erhöhte sich signifikant ($p < 0,05$) und verdoppelte sich in etwa im Mittel über die Experimentdauer von sechs Wochen (Abb. 18).

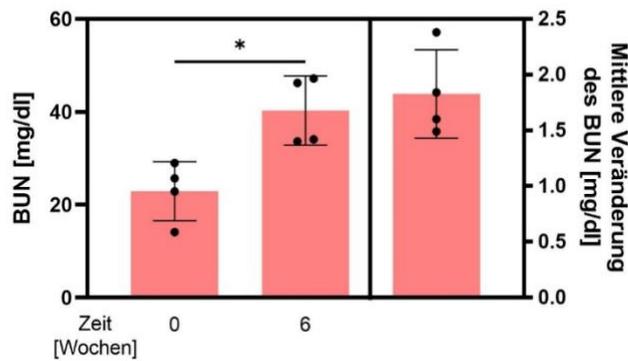


Abbildung 18: 60 mg/kg KG führt zu einer Erhöhung des BUN bei C57BL/6J Mäusen

Über eine Experimentdauer von sechs Wochen erhöhte sich der BUN signifikant ($p < 0,05$) und verdoppelte sich in etwa im Mittel.

BUN: Blut Harnstoff, ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Zur Beurteilung einer Hypertrophie des Nierengewebes wurde die Nieren-Körpergewicht-Ratio sowie die Größe der Glomeruli mithilfe von PAS-Schnitten bestimmt (Kap. 3.2.4). Das Gewicht der Niere wurde zum Zeitpunkt der Uninephrektomie und am Ende des Experiments auf das Körpergewicht der Maus normiert. Bei einer Dosierung von 60 mg/kg KG konnte nach sechs Wochen Experimentdauer keine signifikante Zunahme der Nieren-Körpergewicht-Ratio beobachtet werden (Abb. 19A). Über die Dauer des Experiments zeigte sich keine Hypertrophie der Glomeruli (Abb. 19B-C). Insgesamt zeigt sich weder eine Hypertrophie des gesamten Nierengewebes, noch der Glomeruli.

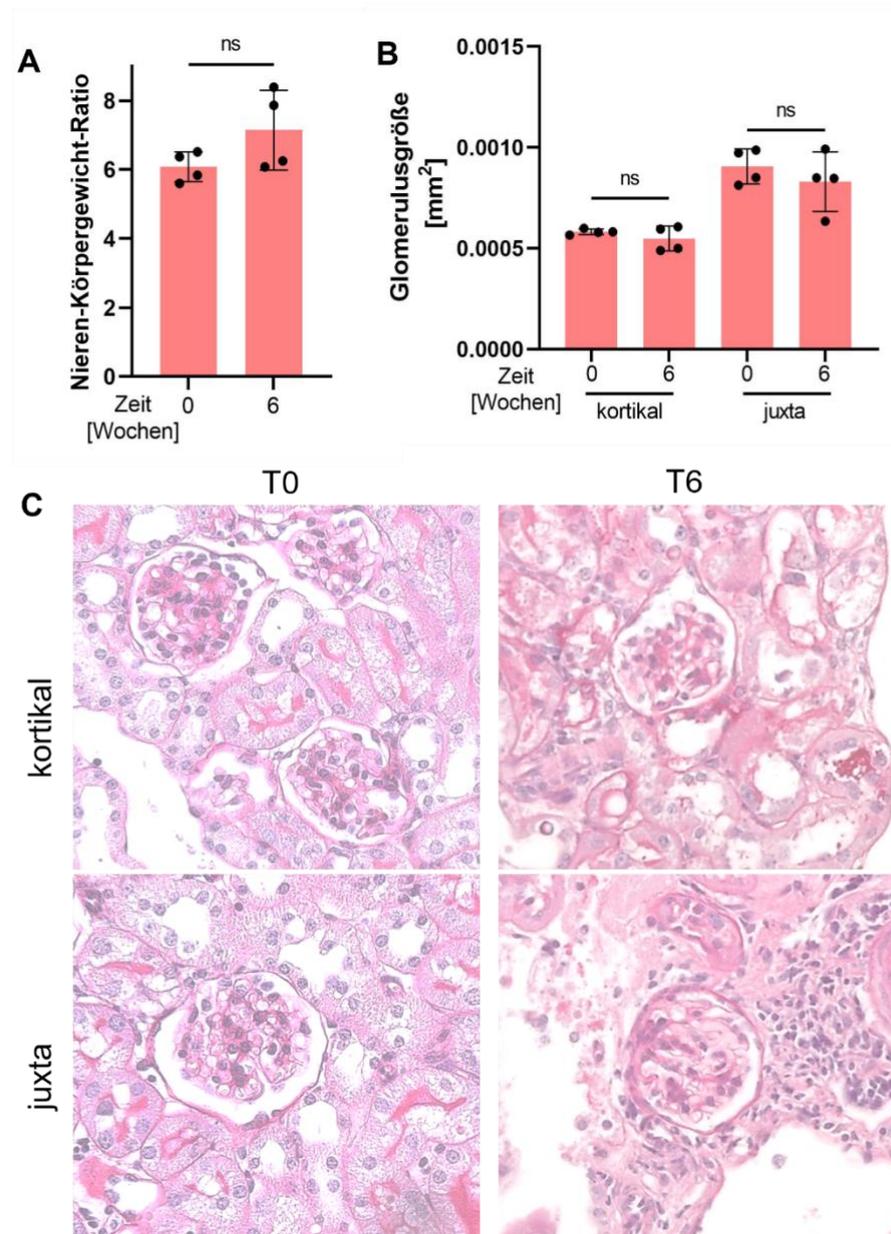


Abbildung 19: 60 mg/kg KG STZ zeigt nach 6 Wochen keine Hypertrophie der Niere oder Glomeruli

(A) Zur Bestimmung der Hypertrophie der gesamten Niere wurde das Nierengewicht bei Uninephrektomie (T0) und Euthanasie (T6) auf das Körpergewicht der Maus normiert. Nach 6 Wochen Experimentdauer zeigt sich keine Hypertrophie nach Injektion von 60 mg/kg KG STZ. (B-C) Die Größe der mit PAS angefärbten histologischen Schnitte der Niere wurden analysiert. Hierzu wurden kortikale und juxtamedulläre Glomeruli vermessen. Es zeigte sich keine signifikante Hypertrophie der Glomeruli nach 6 Wochen Experimentdauer. ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Durch Analyse von WT-1-immunhistochemisch gefärbten Schnitten wurden Veränderungen in Podozytengröße sowie Podozytenzahl analysiert (Abb. 20D-E; Kap. 3.2.4). Sowohl die Podozytenzahl ($p < 0,05$; Abb. 20A), als auch die Podozytendichte ($p < 0,01$; Abb. 20B) pro Glomerulus zeigten eine signifikante Zunahme nach sechs Wochen Experimentdauer, die im Sinne einer Anpassungsreaktion der Frühphase der DN interpretiert werden können. Das Vorhandensein des NLRP3-Inflammasoms wurde mit einer

immunhistochemischen NLRP3-Färbung analysiert (Abb. 20F-G; Kap. 3.2.4), konnte jedoch an beiden Zeitpunkten im Glomerulus nicht nachgewiesen werden (Abb. 20C). Die SiriusRed Färbung wurde zur Darstellung von fibrotischen Areale verwendet (Abb. 20I-J; Kap. 3.2.4). Jedoch konnte nach sechs Wochen Experimentdauer keine Glomerulosklerose nachgewiesen werden (Abb. 20H).

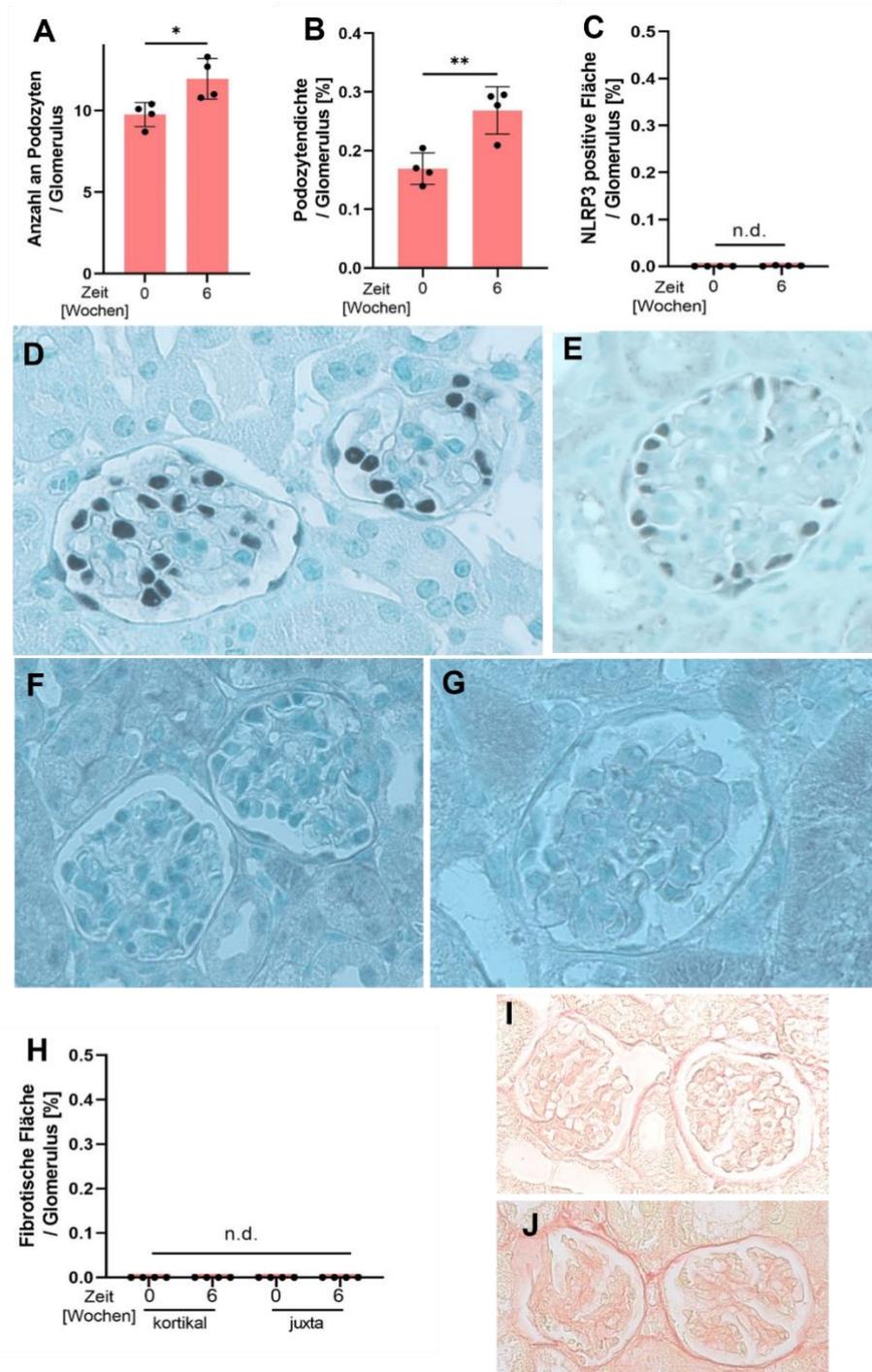


Abbildung 20: Histopathologische Befunde nach 60 mg/kg KG STZ und 6 Wochen Experimentdauer

Signifikante Zunahme der Podozytenanzahl (A) und Podozytendichte (B) pro Glomerulus in der WT-1 Färbung. Exemplarische WT-1 Schnitte bei Uninephrektomie (C) und Euthanasie (D). Kein immunhistochemischer Nachweis (n.d.) von NLRP3-positiver Fläche im Glomerulus (E), sowohl bei Uninephrektomie (F) als auch bei Euthanasie (G). Kein Nachweis (n.d.) fibrotischer Areale im Glomerulus in der SiriusRed Färbung (H) bei Uninephrektomie (I) und Euthanasie (J).

n.d.: nicht nachweisbar, ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Da sowohl bei Hyperglykämie durch die Aktivierung der metabolischen und hämodynamischen Signalwege als auch das NLRP3-Inflammasom Änderung auf Transkriptionsebene bewirken können, wurde eine mRNA-Analyse durchgeführt. Hierbei wurde in den murinen Nieren die Expression der podozytenspezifischen Gene Podocin, Nephrin und WT-1 bei Uninephrektomie und Euthanasie analysiert (Kap. 3.2.2). Es zeigten sich keine relevanten Änderungen der entsprechenden Expressionsprofile (Abb. 21). Die Frühphase der DN scheint somit nicht mit Änderungen auf Transkriptionsebene einherzugehen.

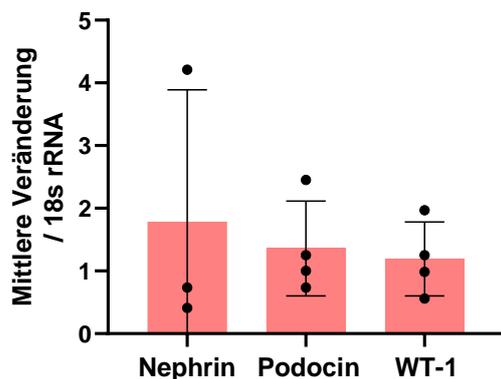


Abbildung 21: DM1 bewirkt keine Expressionsänderung podozytenspezifischer Gene

Die Bestimmung der mRNA-Expression der podozytenspezifischen Gene Nephrin, Podocin und WT-1 zeigt keine relevante Änderung im Expressionsprofil.

Zusammengefasst konnte zwar durch eine STZ-Dosierung von 60 mg/kg KG ein DM1 induziert werden, die Beobachtungszeit von sechs Wochen schien jedoch zu kurz gewählt. Es konnte zu diesem Zeitpunkt keine Hypertrophie von Niere oder Glomerulus nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte eine reaktive Zunahme der Podozytenanzahl und Podozytendichte sowie der signifikante Anstieg des Nierenretentionsparameters BUN beobachtet werden. Der Frühphase der DN entsprechend konnte keine renale Fibrose gezeigt werden. Weder das Vorhandensein des NLRP3 Inflammasoms noch Änderungen auf Transkriptionsebene waren nach sechs-wöchiger Hyperglykämie festzustellen. Da die Mechanismen der Hyperfiltrations-induzierten CKD nach sechs Wochen Experimentdauer, insbesondere unter Berücksichtigung der glomerulären Hypertrophie als wichtiger Mechanismus der Hyperfiltration, nicht zu beobachten waren, wurde die Experimentdauer für weitere Experimente verdoppelt. Das etablierte Modell sah also wie folgt aus: Induktion des DM1 mit STZ in einer Dosierung von 60 mg/kg KG q.a.d. bei weiblichen Mäusen. Die Uninephrektomie erfolgt eine Woche nach

abgeschlossener DM1-Induktion. Die Beobachtungszeit wurde auf 12 Wochen festgelegt.

4.2.2 Überaktives NLRP3 Inflammasom in PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen

Um den potenziellen Einfluss des NLRP3 Inflammasoms in der Pathogenese der frühen DN untersuchen zu können, wurde der Phänotyp des Frühstadiums der DN in genetisch modifizierte Mäuse mit überaktivem NLRP3 Inflammasom (NLRP3+) im Podozyten untersucht. Hierzu wurden PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse verpaart und genotypisiert (Kap. 3.2.1). Abbildung 22 zeigt heterozygote Nlrp3^{WT/A350V} Proben.

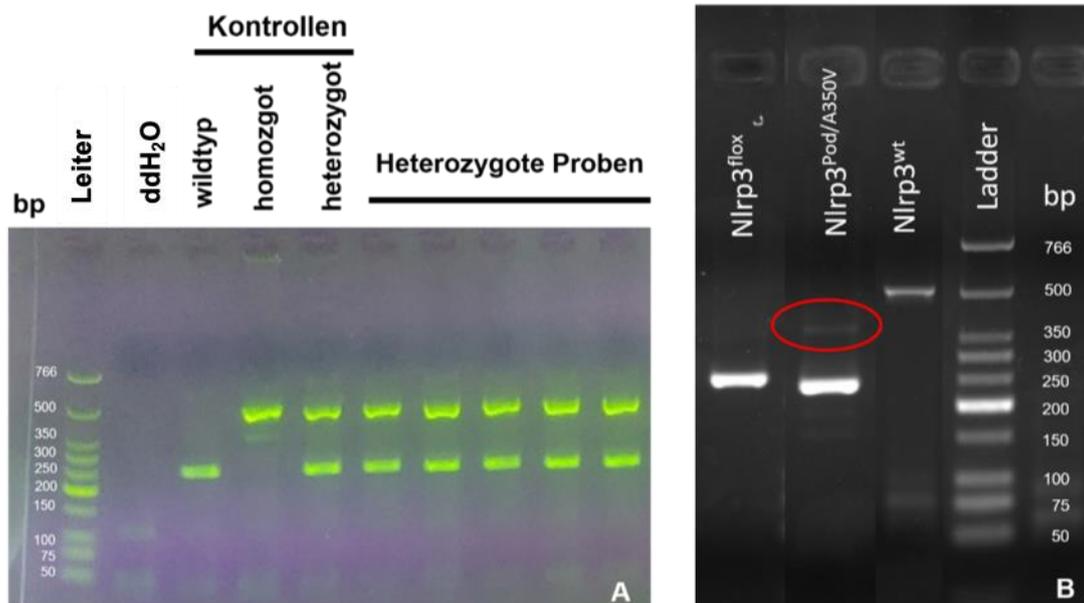


Abbildung 22: Genotypisierung von Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen

(A) Exemplarische Ergebnisse der Genotypisierung von Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen. Von links: DNA-Leiter zur Darstellung der Basenpaare, Negativkontrolle mit Wasser (ddH₂O), Wildtyp Probe (248 bp), Homozygote Probe (430 bp), Heterozygote Probe (248 bp und 430 bp), heterozygote Proben der Versuchstiere. (B) Endpunkt-PCR aus isolierten Glomeruli (gemäß der Vorgaben des Jackson Laboratories; Durchführung durch Frau Tâmis Honda) zum Nachweis der Amplifikation des kürzeren, ausgefloxten Genprodukts in Nphs2-Cre; Nlrp3^{WT/A350V}-Mäusen (roter Kreis). Linke Bande: Nlrp3^{A350V/A350V}, mittlere Bande: Nphs2-Cre; Nlrp3^{WT/A350V}, rechte Bande: Nlrp3^{WT/WT}-Mäuse (rechte Spur). Bp: Basenpaare.

Nach Induktion des DM1 und Uninephrektomie wurden die Mäuse für 12 Wochen beobachtet (Kap. 3.2.1). Nach Euthanasie wurden die Nierenretentionsparameter bestimmt und die Nieren hinsichtlich histopathologischer Veränderungen beurteilt. In die Auswertung wurden ausschließlich Mäuse eingeschlossen, die den Studienendpunkt von 12 Wochen erreicht haben.

Sowohl Nlrp3^{WT/A350V} ($p < 0,01$) als auch PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse ($p < 0,001$) zeigten einen signifikant stärkeren Anstieg des Blutzuckers über den

Beobachtungszeitraum von 12 Wochen im Vergleich zu diabetischen C57BL/6J Wildtyp Mäusen. Der Blutzuckeranstieg zwischen $Nlrp3^{WT/A350V}$ und $PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäusen unterschied sich nicht signifikant (Abb. 23A). Der primäre Endpunkt, eine Erhöhung der ACR, wurde von $PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäusen und $Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäusen erreicht. Die ACR verdoppelte sich im Mittel. Im Vergleich dazu konnte bei C57BL/6J Wildtyp Mäusen keine Veränderung der ACR festgestellt werden. Bei direktem Vergleich der Gruppen stellte sich die mittlere Änderung der ACR zwischen Wildtyp und $Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäusen nicht signifikant dar, die mittlere Änderung der ACR zwischen Wildtyp und $PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäusen war jedoch signifikant ($p < 0,05$). Die mittlere Änderung der ACR zwischen $Nlrp3^{WT/A350V}$ und $PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäusen war nicht signifikant (Abb. 23B). Bei Betrachtung der BUN als Nierenretentionsparameter zeigte sich im Mittel eine Verdopplung des BUN. Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant untereinander (Abb. 23C). Das absolute Nierengewicht nahm in allen Gruppen im Verlauf des Experiments signifikant zu. Die Nieren der $Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäuse hatten nach 12 Wochen ein signifikant höheres Gewicht als Nieren von $PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäusen ($p < 0,01$) (Abb. 23D).

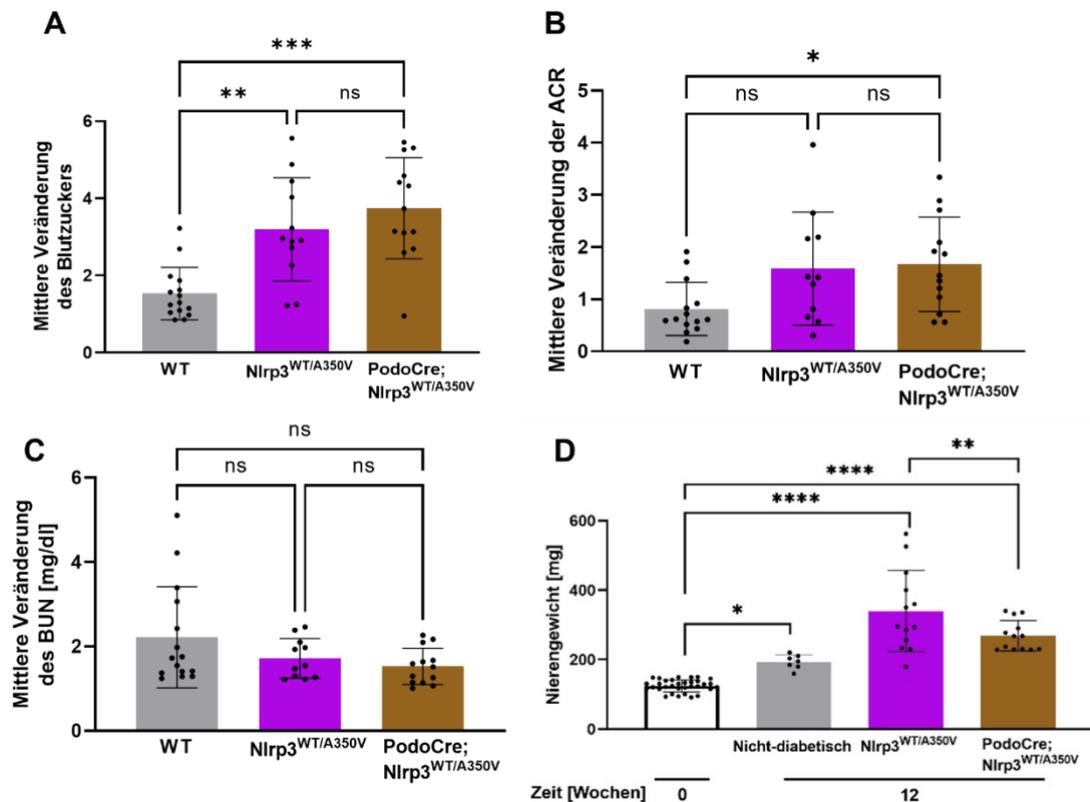


Abbildung 23: Biochemische Charakterisierung der frühen DN in PodoCre;Nlrp3WT/A350V Mäusen

(A) Mittlere Veränderung des Blutzuckers, (B) Mittlere Veränderung der ACR, (C) Mittlere Veränderung des BUN, (D) absolutes Nierengewicht über eine Experimentdauer von 12 Wochen.

BUN: Blut Harnstoff, WT: Wildtyp, ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Um zu testen, ob neben einer Hypertrophie der gesamten Niere auch eine glomeruläre Hypertrophie vorlag, wurden PAS-Schnitte analysiert (Kap. 3.2.4). Die Analyse ergab keine Hypertrophie der Glomeruli nach einer Experimentdauer von 12 Wochen (Abb. 24A-B). Sowohl Podozytenanzahl als auch Podozytendichte wurden in WT-1-immunhistochemisch gefärbten Schnitten analysiert (Kap. 3.2.4). Es konnten für beide Parameter keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (Abb. 24D-E). Sowohl die fehlende glomeruläre Hypertrophie als auch die nicht vorhandenen reaktiven Veränderungen in Podozytenzahl und Podozytendichte, die in der Etablierungsstudie beobachtet werden konnten, könnten ein Hinweis auf eine bereits weiter fortgeschrittene DN sein. Denn die Hypertrophie verändert sich im Verlauf durch die strukturellen Schäden zu einer Atrophie und es kommt zu einem Untergang der Podozyten im Sinne von Apoptose. Mithilfe der SiriusRed Färbung (Kap. 3.2.4) wurden fibrotische Areale im Glomerulus angefärbt. Es konnten jedoch nach 12 Wochen Experimentdauer keine fibrotischen Areale im Glomerulus nachgewiesen werden (Abb 24C). Das Fehlen von Fibrosen spricht gegen das Vorliegen einer weit vorgeschrittenen DN. Das Vorhandensein des

NLRP3-Inflammasoms wurde mit einer immunhistochemischen NLRP3-Färbung analysiert (Kap. 3.2.4). Die untersuchten Schnitte gaben keinerlei Hinweis auf das NLRP3 Inflammasom, denn es zeigten sich keine positiv eingefärbten Areale (Abb. 24F-G).

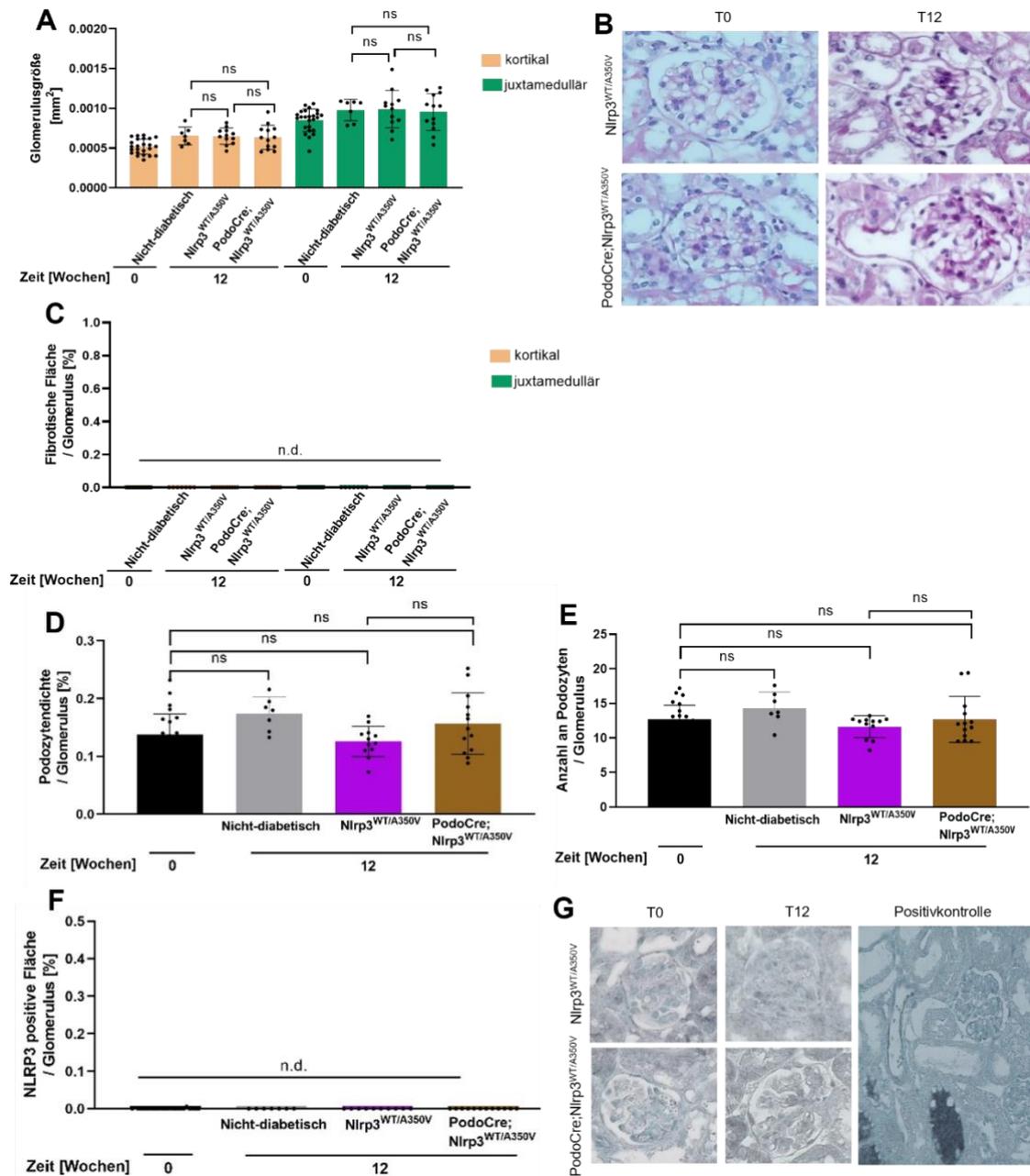


Abbildung 24: Histopathologische Befunde der Nieren nach 12-wöchiger Hyperglykämie in PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen

Nach 12-wöchiger Hyperglykämie zeigte sich in renalen PAS-Schnitten keine signifikante Hypertrophie der Glomeruli im Vergleich zu Mäusen ohne Diabetes (A). Der direkte Vergleich zwischen PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} und Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Glomerulusgröße (A-B). Mithilfe der SiriusRed Färbung konnte in keiner Gruppe eine renale Fibrose festgestellt werden (C). Die glomeruläre Podozytendichte (D) und Podozytenanzahl (E) unterschieden sich in WT-1 gefärbten Schnitten nicht. Es konnte keine NLRP3-positive Fläche in den Glomeruli nachgewiesen werden (F-G).

T0: Unineprektomie, T12: Euthanasie, ns: nicht signifikant, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

Zusammengefasst zeigten $Nlrp3^{WT/A350V}$ und $PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäuse eine fulminante Erhöhung des Blutzuckerspiegels. Obwohl das absolute Nierengewicht von $Nlrp3^{WT/A350V}$ signifikant höher als das von $PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V}$ war, hatten $PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäuse eine signifikant höhere ACR. Dies könnte ein Hinweis auf eine bereits weiter fortgeschrittene DN bei $PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäuse sein, während es sich bei $Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäusen eher um ein früheres Stadium handelte. Der Nierenretentionsparameter BUN war in beiden Gruppen erhöht, was für einen Hyperglykämie-bedingten renalen Schaden spricht. Trotz renaler Hypertrophie konnte histologisch keine glomeruläre Hypertrophie in keiner Gruppe nachgewiesen werden. Da auch keine fibrotischen Areale nachgewiesen werden konnten, kann das Vorliegens eines Spätstadiums der DN ausgeschlossen werden. Quantitative podozytäre Veränderungen konnten nicht mehr nachgewiesen werden, was die Hypothese einer tendenziell fortgeschrittenen DN unterstreicht. Jedoch konnten keine Gruppenunterschiede festgestellt werden. In keiner Gruppe gab es Hinweise auf das glomeruläre NLRP3 Inflammasom, denn die Färbung zeigte stets negative Ergebnisse. Im Vergleich zu Wildtyp Mäusen zeigten $Nlrp3^{WT/A350V}$ und $PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäuse einen stärker ausgeprägtem DM1 mit deutlich höheren Blutzuckerwerten.

4.2.3 Podozytäres NLRP3 als therapeutisches Target bei DN

Da sich $PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäuse mit einem fulminanten und im Vergleich zu Wildtyp Mäusen stärker ausgeprägtem DM1 präsentierten, wurde mithilfe von NLRP3 Inflammasom Inhibitoren eine potenzielle Amelioration sowie phänotypische Unterschiede bei C57BL/6J und $PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V}$ Mäusen untersucht. In die Auswertung wurden ausschließlich Mäuse eingeschlossen, die den Studienendpunkt von 12 Wochen erreicht haben.

C57BL/6J Mäuse

C57BL/6J Mäuse wurden nach Schema mit Oridonin Injektionen oder 1,3-Butanediol-haltigem Futter (BHB) nach Diabetesinduktion und Uninephrektomie therapiert. Kontrolltiere erhielten Vehikel-Injektionen (Kap. 3.2.1).

Die Vehikel Gruppe präsentierte sich mit einem signifikant höheren Blutzuckerspiegel nach 12 Wochen Experimentdauer im Vergleich zur BHB Gruppe ($p < 0,01$). Kein Unterschied konnte zwischen Vehikel und Oridonin

Gruppe beobachtet werden (Abb. 25A). Für beide Nierenretentionsparameter, ACR und BUN, konnte nach Therapie mit BHB keine signifikante Amelioration beobachtet werden. Die ACR der Oridonin Gruppe stieg im Vergleich zur Vehikel Gruppe signifikant an ($p < 0,05$). Für Oridonin zeigte sich keine signifikante Änderung (Abb. 25B-C). Im Vergleich zu der Vehikel Gruppe konnte weder bei Mäusen ohne Diabetes eine signifikante Hypertrophie noch nach BHB- oder Oridonintherapie eine signifikante Verbesserung einer Hypertrophie nachgewiesen werden (Abb. 25D).

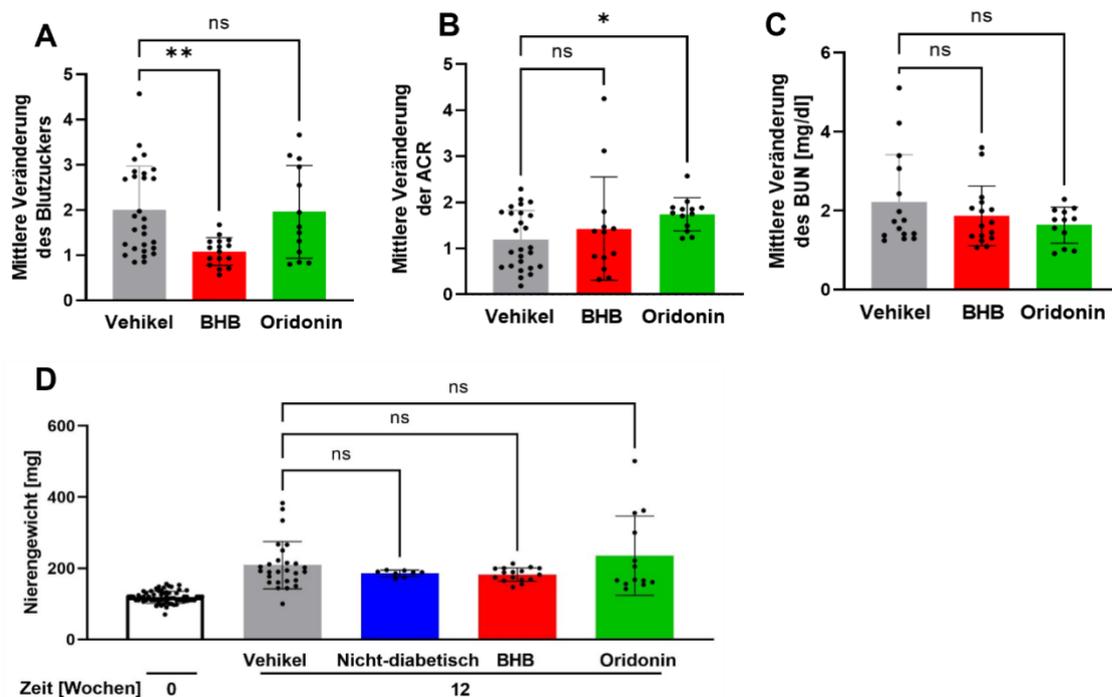


Abbildung 25: Inflammation Inhibitoren zeigt keine Amelioration biochemischer Parameter bei C57BL/6J Mäusen

BHB bewirkt eine Reduktion des Blutzuckerwertes im Vergleich zur Therapie mit Vehikel oder Oridonin (A). Die mittlere Veränderung von ACR (B) und BUN (C) zeigen keine Amelioration unter Therapie mit BHB oder Oridonin. Das Nierengewicht wird durch Therapie von BHB oder Oridonin nicht beeinflusst (D).

ACR: Albumin-Kreatinin-Ratio, BUN: Blut Harnstoff, BHB: β -Hydroxybutyrat, ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Über die Dauer des Experiments zeigte sich für keine Gruppe eine signifikante Hypertrophie der kortikalen Glomeruli im Vergleich zur Vehikel Gruppe in PAS-Schnitten (Kap. 3.2.4). Juxtamedulläre Glomeruli der nicht-diabetischen und mit Oridonin therapierten Mäuse zeigten eine Hypertrophie im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$; Abb. 26A). Die WT-1 Immunhistochemie (Kap. 3.2.4) zeigte nur für die Podozytengröße der BHB Gruppe eine signifikante Zunahme im Vergleich mit der Vehikelgruppe ($p < 0,05$). Die Daten für Podozytengröße und Podozytendichte der anderen Gruppen waren nicht signifikant unterschiedlich zur Vehikelgruppe (Abb 26B-C). Das Vorhandensein des NLRP3-Inflammasom wurde mit einer

immunhistochemischen NLRP3-Färbung analysiert (Kap. 3.2.17), konnte jedoch in keiner Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 26D). Eine Färbung fibrotischer Areale mittels SiriusRed Färbung erfolgte nicht, da bereits ohne Therapie mit NLRP3 Inhibitoren keine renalen Fibrosen nachweisbar waren.

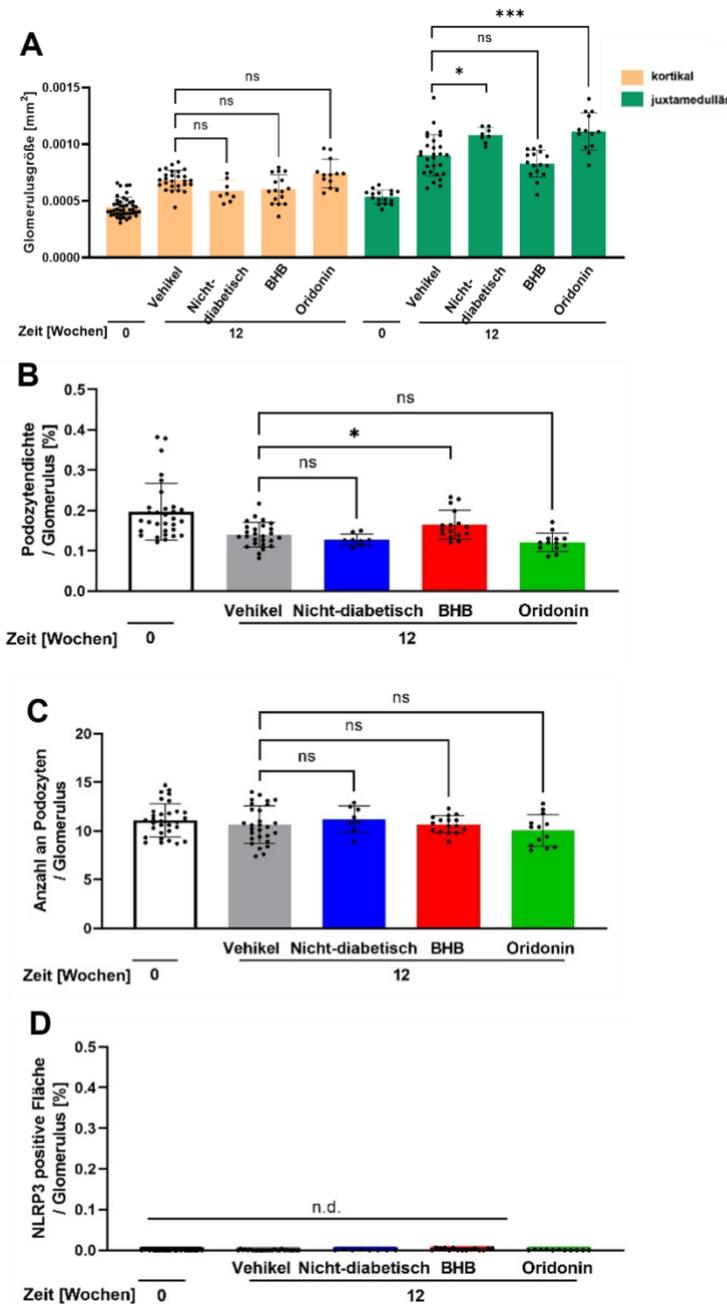


Abbildung 26: Inflammasom Inhibitoren bewirken keine histopathologische Amelioration bei C57BL/6J Mäusen

Die Analyse glomerulärer Hypertrophie in PAS-Schnitten zeigte eine Reduktion der juxtamedullären Glomerulusgröße nach Therapie mit BHB im Vergleich zur Vehikel Gruppe. Darüber hinaus zeigte die Therapie mit BHB oder Oridonin keinen Effekt auf die Glomerulusgröße (A). BHB und Oridonin zeigten keinen Einfluss auf Podozytendichte (B) und Podozytenanzahl (C) in der WT-1 Färbung. Es konnte keine NLRP3-positive Fläche im Glomerulus bei keiner Gruppe nachgewiesen werden (D). BHB: β -Hydroxybutyrat, n.d.: nicht nachweisbar, ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Insgesamt konnten keine einschlägigen Verbesserungen des diabetischen Phänotyps unter BHB oder Oridonin Therapie bei C57BL/6J Mäusen beobachtet werden. Zwar reduzierte BHB den Blutzucker und die juxtamedulläre Glomerulusgröße signifikant, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Nierenretentionsparameter ACR und BUN. Unter BHB-Therapie erhöhte sich die Podozytendichte bei konstanter Podozytenanzahl im Glomerulus. Entsprechend könnten die Ergebnisse darauf hinweisen, dass BHB die Progression der DN durch reduzierte Blutzuckerwerte verlangsamt und der Phänotyp eher einem Frühstadium entspricht. Unter Oridonintherapie kam es zu einem signifikanten Anstieg der ACR. Es konnte kein Einfluss auf Blutzucker oder BUN nachgewiesen werden. Die Größe der juxtamedullären Glomeruli war signifikant erhöht. Darüber hinaus zeigte Oridonin keine Wirkung auf die renale Histologie. Oridonin bewirkte entsprechend keine phänotypische Amelioration. Das NLRP3 Inflammasom konnte histologisch weder unter BHB noch unter Oridonin Therapie nachgewiesen werden.

PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse

PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} und Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse erhielten nach Diabetesinduktion und Uninephrektomie 1,3-Butandiol-haltiges Futter nach Schema, um eine Amelioration der frühen renalen Veränderungen durch eine 12 Wochen bestehende Hyperglykämie bei DM1 zu untersuchen (Kap. 3.2.1).

Die Therapie mit BHB führte zu keinem signifikant unterschiedlichen Effekt in Bezug auf Blutzucker, ACR, BUN oder die Hypertrophie der Gesamtniere bei PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} und Nlrp3^{WT/A350V} beziehungsweise im Vergleich zu PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen, die kein BHB erhielten (Abb.27A-D). Über die Dauer des Experiments konnten ebenfalls keine signifikant verschiedenen histologischen Veränderungen zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Es kam weder zu einer Änderung der kortikalen oder juxtamedullären Glomerulusgrößen in PAS-Schnitten (Abb. 27E), noch zu Änderungen der Podozytengröße (Abb. 27F) und Podozytendichte (Abb. 27G) in der WT-1 Immunhistochemie nach BHB-Therapie. Das NLRP3-Inflammasom konnte mithilfe einer immunhistochemischen NLRP3-Färbung in keiner Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 27H). Eine SiriusRed Färbung zur Darstellung von Fibrosen erfolgte nicht, da bereits ohne BHB-Therapie keine fibrotischen Areale nachgewiesen werden konnten.

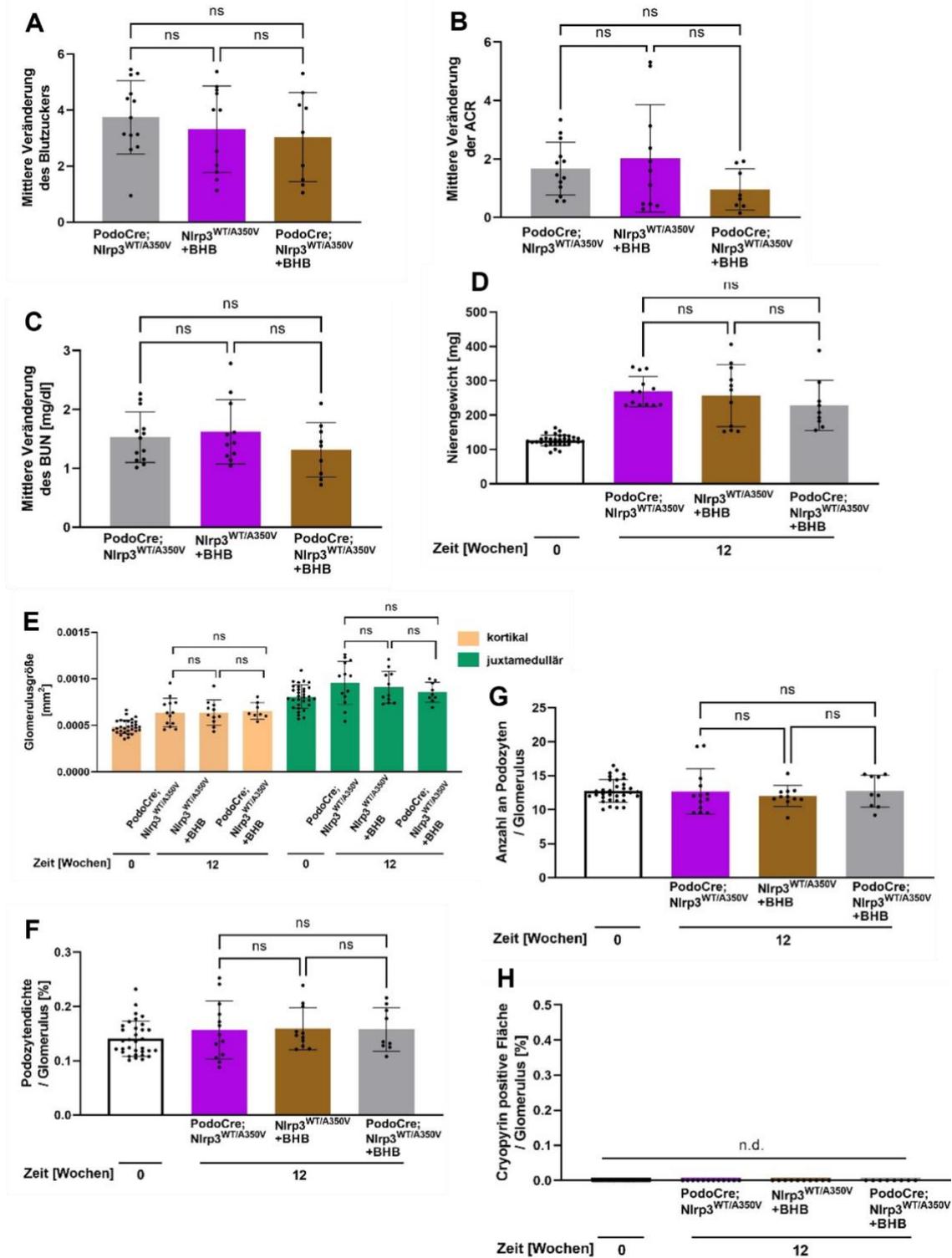


Abbildung 27: Eine BHB Therapie zeigte keinen signifikanten Effekt bei PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen

PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse, die mit dem NLRP3 Inflammasom Inhibitor BHB therapiert wurden, zeigten keine signifikanten phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu Mäusen mit BHB Therapie und PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen ohne BHB Therapie. Bei den untersuchten Parametern handelte es sich um den (A) Blutzucker, (B) die ACR, (C) den BUN und (D) das Nierengewicht als Hinweis auf eine renale Hypertrophie. Auch die histologische Auswertung zeigten keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die (E) glomeruläre Größe entsprechend einer glomerulären Hypertrophie sowie die (F) Podozytendichte und (G) Podozytenanzahl pro Glomerulus. Es konnte bei keiner Gruppe histologisch das NLRP3 Inflammasom nachgewiesen werden (H).

BHB: β -Hydroxybutyrat, n.d.: nicht nachweisbar, ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Insgesamt konnte eine Therapie mit dem NLRP3 Inflammasom Inhibitor BHB keinerlei phänotypische Veränderungen bei PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} im Vergleich zu Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen unter BHB-Therapie und PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen ohne BHB-Therapie bewirken. Im Gegensatz zu C57BL/6J Mäusen zeigte BHB bei PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen keine antidiabetische Wirkung auf den Blutzucker, denn dieser reduzierte sich nicht signifikant im Vergleich zu nicht-therapierten PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen. Zusammenfassend konnte in den Studien der vorliegenden Arbeit keine kanonische Beteiligung des NLRP3 Inflammasoms in Podozyten nachgewiesen werden. Weder aggravierte sich der renale Phänotyp bei PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen mit überaktivem Inflammasom nach 12-wöchiger fulminanter Hyperglykämie, noch zeigte sich ein relevanter Effekt bei Therapie mit Inflammasom Inhibitoren bei diesen Mäusen. C57BL/6J Mäuse zeigten bei Therapie mit BHB signifikant reduzierte Blutzuckerwerte und scheinen somit auf die antidiabetische Wirkung von BHB besser anzusprechen als PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse. Durch geringere Blutzuckerwerte kann BHB entsprechend bei C57BL/6J Mäusen nephroprotektiv wirken. Oridonin zeigte hingegen keinerlei nephroprotektive Wirkung. Der Phänotyp zwischen PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen mit überaktivem NLRP3 Inflammasom und Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen ohne spezifische Überaktivierung im Podozyten unterschied sich nicht signifikant. Eine Beteiligung des kanonischen NLRP3 Inflammasoms in der Pathogenese der frühen DN konnte nicht nachgewiesen werden. Die *in vivo* Ergebnisse korrelieren somit mit den *in vitro* Ergebnissen, die eine podozytäre Beteiligung des kanonischen NLRP3 Inflammasoms nicht zeigen konnten.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aufgrund der widersprüchlichen Aussagen zur Fähigkeit von parenchymalen, renalen Zellen das NLRP3-Inflammasom zu bilden, die Rolle des NLRP3 Inflammasoms in renalen Parenchymzellen zu klären. Als exemplarischer Podozytenstress wurde für diese Studie ein DM1 gewählt. Auf diese Weise sollte die Möglichkeit der Tertiärprävention Hyperfiltrations-bedingter, struktureller Veränderungen durch gezielte Hemmung der immunvermittelten Inflammation getestet werden. Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit waren renale, parenchymale Zellen. Die Pathogenese der DN eignete sich als zugrundeliegendes Modell gut, da hier der podozytäre Schaden eine zentrale Rolle einnimmt. Weiterhin wurde in mehreren Studien über eine gesteigerte Aktivität des NLRP3 Inflammasoms in Podozyten im Rahmen von Diabetes berichtet [207-210]. Die Hypothesen, die in der vorliegenden Arbeit getestet wurden, waren:

1. Das podozytäre NLRP3 Inflammasom erfüllt keine kanonischen und proinflammatorischen Funktionen.
2. Die Progression der Hyperfiltrations-induzierten CKD als Frühstadium der DN wird nicht durch das podozytäre NLRP3 vermittelt.
3. Für eine Tertiärprävention eignet sich das podozytäre NLRP3 als therapeutisches Target bei Hyperfiltrations-induzierter CKD nicht. Die Progression der DN kann also nicht durch Inhibition des NLRP3 Inflammasoms als Vermittler von Inflammation verhindert werden.

Die Überprüfung dieser Hypothesen erfolgte *in vitro* und *in vivo*. Es konnte gezeigt werden, dass 1. NLRP3 in Podozyten aufgrund fehlender IL-1 β und IL-18 Sekretion keine kanonische, proinflammatorische Funktion erfüllt, 2. Es durch ein überaktives NLRP3 Inflammasom in Podozyten nicht zu einer Aggravation einer Hyperfiltrations-induzierten CKD kommt und 3. Das NLRP3 Inflammasom somit kein therapeutisches Target zur Tertiärprävention bei Hyperfiltrations-bedingter CKD darstellt. Die renale Inflammation scheint sich unabhängig von der kanonischen NLRP3 Wirkung zu entwickeln.

5.1 Kanonische, proinflammatorische Funktion von podozytärem NLRP3 *in vitro*

Mithilfe von *in vitro* Versuchen wurde auf zellulärer Ebene die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms an humanen Podozyten untersucht.

In dieser Arbeit wurden postmitotische, humane Podozyten verwendet. Im Gegensatz dazu ergab eine Literaturrecherche nach Arbeiten, die die kanonische IL-1 β oder IL-18 Sekretion untersuchten, dass weit überwiegend immortalisierte, noch mitotisch aktive Podozyten verwendet wurden [167, 171, 211-217]. Da jedoch humane Podozyten in der Niere nicht mehr teilungsfähig sind, ist die Verwendung dieser Modelle und die Interpretation der Ergebnisse kritisch zu sehen. Um die physiologische Realität in der Niere besser abzubilden, wurden für die vorliegende Studie ausschließlich postmitotische, aus renalen Stammzellen gewonnene Podozyten verwendet.

Die Podozyten wurden mit LPS und ATP unter diabetischen Bedingungen inkubiert, um die Aktivierung des kanonischen NLRP3 Signalwegs zu initiieren. Im Vergleich zu THP1+PMA konnte in Podozyten keine IL-1 β Sekretion nachgewiesen werden. Diese Beobachtung ist konträr zu den bereits publizierten Arbeiten, die eine NLRP3-abhängige, stimulierbare IL-1 β Sekretion zeigen konnten [167, 171, 211, 213, 215-217]. Die Daten dieser Arbeit konnten auch keine IL-18 Sekretion in Podozyten zeigen, wobei hier auch in den Kontrollzellen nach Stimulation kein IL-18 nachgewiesen werden konnte. Die Literaturrecherche ergab lediglich nur eine Studie, die die NLRP3-abhängige IL-18 Sekretion in humanen Podozyten untersucht hat und eine Steigerung der Sekretion nach Stimulation beobachten konnte [215].

Zugrundeliegend für diese konträren Ergebnisse könnte die Tatsache ein, dass in den analysierten Publikationen Assays verwendet wurden, deren technische Informationen nicht spezifizieren, ob ein Nachweis von pro- IL-1 β oder reifen IL-1 β erfolgte. Möglich ist somit eine falsch positive Detektion von IL-1 β in einem Großteil der Publikationen auf Basis unspezifischer Analysemethoden [167, 171, 211, 213, 215-217]. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Assays verwendet, die gemäß Herstellerinformation ausdrücklich die reife Variante der Interleukine nachweisen. Abweichungen in den Sekretionsanalysen dieser Arbeit im Vergleich zu Literaturdaten, nämlich dass es bei Inflammasom Aktivierung nicht zu einer kanonischen Sekretion von IL-1 β in Podozyten kommt, könnten

also 1) auf den physiologischen Unterschied zwischen postmitotischen und immortalisierten Podozyten und 2) auf die Detektion der IL-1 β Form zurückzuführen sein. Die fehlende IL-18 Sekretion in der Positivkontrolle dieser Arbeit konnte trotz mehrfacher Wiederholung des Experiments nicht behoben werden. Ein anderes ELISA-Kit konnte nicht verwendet werden, da nur bei dem verwendeten Kit die technischen Informationen die detektierte Form von IL-18 spezifizierten. Der fehlende Nachweis einer IL-18 Sekretion durch Podozyten ist also aufgrund der negativen Positivkontrolle mit Vorsicht zu interpretieren. Die Abweichung dieser Sekretionsanalyse im Vergleich zu der Literatur kann ebenfalls wieder mit 1), dem physiologischen Unterschied zwischen postmitotischen und immortalisierten Podozyten, und 2), der Detektion der IL-18 Form, begründet werden.

Aufgrund dieser Diskrepanz bleibt also nach wie vor ungeklärt, ob parenchymale, renale Zellen NLRP3-abhängig IL-1 β und IL-18 sezernieren können. Gemäß des humanen Protein Atlas liegt in humanen Podozyten, analog zu den Daten der *in vitro* Experimente dieser Studie, kein NLRP3 Inflammasom vor [218]. Auch unveröffentlichte Genexpressionsanalysen (Kunte *et al.*) in Podozyten einer humanen Niere mit Diabetes konnte Transkripte der NLRP3 Inflammasom relevanten Gene NLRP3, ASC, Caspase 1, IL-1 β und IL-18 nur in Immunzellen, jedoch nicht in den Podozyten selbst nachweisen.

5.2 Bedeutung des podozytären NLRP3 Inflammasoms bei glomerulärer Hyperfiltration *in vivo*

Da die Ergebnisse der *in vitro* Analysen wesentlich den publizierten Literaturdaten widersprachen, wurde die Aktivierung des podozytären NLRP3-Inflammasoms im Kontext des Gesamtorganismus bei Podozytenstress untersucht. Hierzu diente 1) ein DM1 und 2) die Uninephrektomie, um den Progress der Diabetes-induzierten glomerulären Hyperfiltration zu beschleunigen.

Zunächst musste ein DM1 im Tiermodell erzeugt werden. Methodisch kann dafür entweder ein Spontanphänotyp oder ein induzierter Phänotyp verwendet werden [181, 182]. Wesentlicher Vorteil der induzierbaren Modelle ist der festgelegte Manifestationszeitpunkt des DM1, wodurch Analysen von DM1-assoziierten Folgeerkrankungen, wie der DN, präziser durchgeführt werden können. Für die

Induktion des DM1 eignet sich das β -Zellgift Streptozotocin sehr gut, da dies einen Untergang der insulinproduzierenden β -Zellen bewirkt. Es resultiert ein absoluter Insulinmangel, der der Pathogenese des DM1 entspricht [200, 219]. STZ hat jedoch dosisabhängige, toxische Eigenschaften, die sich auch in anderen Organen manifestieren können [220]. Weiterhin unterscheidet sich die Wirkung von STZ zwischen einzelnen Mausstämmen, da manche Mäuse resistenter gegenüber STZ beziehungsweise gegenüber DM1-assoziierten Erkrankungen sind [183, 221]. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Etablierungsstudie zur Optimierung der Diabetesinduktion und glomerulären Hyperfiltration durchgeführt [189]. Ziel der Etablierungsstudie war die Induktion eines phänotypisch starken DM1 durch STZ bei gleichzeitig guter Verträglichkeit durch die Mäuse. Aus diesem Grund wurde STZ in drei verschiedenen Dosierungen verabreicht: 50 mg/kg KG für fünf Tage, 60 mg/kg KG q.a.d. und 120 mg/kg KG für drei Tage. Die resultierenden Daten zeigten lediglich bei weiblichen Versuchstieren bei einer Dosierung von 60 mg/kg KG einen diabetischen Effekt auf die β -Zell-Masse bei gleichzeitig erhöhtem Blutzuckerspiegel und tolerabler, kataboler Stoffwechsellage bei Insulinmangel. Die in der Literatur beschriebenen toxischen Eigenschaften des STZs kamen in dieser Dosierung nicht zum Tragen [220]. Obwohl das Review von Breyer *et al.* eine erfolgreiche Diabetesinduktion bei Verabreichung von 50 mg/dl STZ für fünf Tage mit Blutzuckerwerten >300 mg/dl (16,7 mmol/l) sieben Tage nach Induktion beschreibt, konnte diese Dosiswirkung in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden [181]. Grund hierfür könnte die divergente Resistenz einzelner Mausstämme gegenüber der STZ-Wirkung sein [183, 221, 222]. Wang *et al.* beschrieben eine erfolgreiche Diabetesinduktion mit einer einmaligen Gabe von 120 mg/kg KG STZ bei guter Verträglichkeit [140]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die einmalige STZ-Gabe auf drei Gaben STZ in einer Dosierung von 120 mg/dl eskaliert, woraus zwar ein fulminanter Diabetes, jedoch auch eine sehr schlechte Verträglichkeit resultierten. Die gewählte Dosierung von 60 mg/kg KG entspricht zwar in ihrer Gesamtdosis von 360 mg/kg KG der Gesamtdosis der dreimaligen Gabe von 120 mg/kg KG, scheint aber aufgrund der kleineren Einzeldosen und jeweils einem Tag Regeneration zwischen den Injektionen (gemäß des Schemas q.a.d.) besser von den Versuchstieren vertragen zu werden.

Die vorliegenden Daten geben keinen Hinweis auf eine signifikante Hyperfiltration oder initiale glomeruläre Schäden nach einer Experimentdauer von 6 Wochen. Studien konnten zeigen, dass die kumulative Inzidenz für eine DN nach einer Diabetesdauer von 25 Jahren bei 25-40% liegt [223]. Entsprechend ist es nicht verwunderlich, dass im Mausmodell eine Diabetesdauer von 6 Wochen zu kurz ist, um die renale Homöostase signifikant zu beeinflussen.

Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden die weiteren *in vivo* Versuche in weiblichen Mäusen mit 60 mg/kg KG STZ zur DM1 Induktion durchgeführt und die Experimentdauer auf 12 Wochen ausgeweitet.

5.2.1 PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse zeigen keinen aggravierten Phänotyp der anhaltenden glomerulären Hyperfiltration

Der Phänotyp der glomerulären Hyperfiltration wurde mit dem etablierten Schema zur DM1 Induktion und Uninephrektomie in genetisch modifizierten PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen mit überaktivem NLRP3 Inflammosom (NLRP3+) im Podozyten untersucht.

Das etablierte Therapieregime führte auch bei Nlrp3^{WT/A350V} und PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen zu einer Hyperglykämie und Albuminurie, im Sinne einer renalen Beteiligung.

Trotz einer signifikanten Erhöhung des Nierengewichts bei Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen, zeigte sich histologisch keine glomeruläre Hypertrophie in PAS-Schnitten. In Korrelation mit dem nicht signifikant erhöhten Nierengewicht konnte bei PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen keine glomeruläre Hypertrophie oder Glomerulosklerose nachgewiesen werden. Die geringe toxische Wirkung von STZ auf Podozyten ist insbesondere für niedrige Dosierungen an STZ vorbeschrieben [181]. Allerdings wurde für diese Experimente eine hohe STZ Dosis gewählt und auch andere Autoren konnten einen guten Effekt der Hyperglykämie auf die Niere bei gleicher Mauslinie und niedriger STZ Dosierung nachweisen [208]. Darüber hinaus zeigte die NLRP3 Immunhistochemie im Gegensatz zu Mäusen mit chronischer Oxalatnephropathie und NLRP3 Anreicherung im Tubulussystem keinen positiven Nachweis des NLRP3 Inflammosoms in Podozyten. Knauf *et al.* konnten den protektiven Effekt der Abwesenheit des NLRP3 Inflammosom in Nlrp3-defizienten Mäusen bei

chronischer Oxalatnephropathie nachweisen, sodass das NLRP3 Inflammasom in dieser Pathogenese eine relevante Rolle einzunehmen scheint [224]. Analog dazu beschreibt der humane Protein Atlas für das Tubulussystem das Vorliegen von NLRP3 [218].

Auch diese *in vivo* Daten bei Podozytenstress im Sinne einer glomerulären Hyperfiltration unterstreichen die *in vitro* Beobachtung sowie die Daten des humanen Protein Atlas und der Genexpressionsanalyse, dass das NLRP3 Inflammasom in Podozyten keinen proinflammatorischen Effekt hat. Selbst bei einer Überaktivierung des NLRP3 Inflammasoms konnte kein aggravierter Phänotyp beobachtet werden.

In Gegensatz dazu stehen die kürzlich publizierte Daten von Shahzad *et al.*, die bei diabetischen Mäusen mit homozygot überaktiver NLRP3 Variante im Podozyten eine Aggravation des renalen Phänotyps beobachten konnten. Diese Mäuse zeigten signifikant erhöhte Nierenretentionsparameter sowie histologische Veränderungen, wie Glomerulosklerose, im Vergleich zur Kontrollgruppe [208]. Eine mögliche Erklärung der Diskrepanz der Daten von Shahzad *et al.* und denen der vorliegenden Arbeit, ist der unterschiedliche Genotyp [208]. Zudem muss bei der Interpretation der Daten von Shahzad *et al.* berücksichtigt werden, dass die Mäuse in allen Zellen, außer den Podozyten *Nlrp3* defizient waren, wodurch der Vergleich zur Kontrollgruppe (Wildtyp Mäuse) schwerfällt [208]. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Gruppen durch Modifikationen, die ausschließlich die Podozyten betrafen, gewährleistet. Eine mangelnde Genotypinduktion der vorliegenden Arbeit konnte durch Genotypisierungen aus Ohrstanzen nach Geburt der Versuchstiere und Endpunkt PCRs nach Euthanasie aus den Nieren ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Daten in Mäusen mit überaktivem NLRP3 Inflammasom (*PodoCre,Nlrp3^{WT/A350V}*) keine Aggravation der glomerulären Hyperfiltration und deuten auf kein Vorliegen des NLRP3 Inflammasoms im Podozyten hin.

5.2.2 Eine Therapie mit NLRP3 Inflammasom Inhibitoren führt zu keiner Verbesserung des renalen Phänotyps in PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen

Da die Ergebnisse der *in vivo* Experimente deutliche Diskrepanzen zu den Daten von Shahzad *et al.* aufwiesen, wurde die phänotypische Ausprägung bei PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen unter Inhibition des NLRP3 Inflammasoms mittels Oridonin und BHB untersucht [208].

Insgesamt konnte keine signifikante Änderung des renalen Phänotyps unter BHB oder Oridonin Therapie beobachtet werden. BHB reduzierte lediglich den Blutzucker bei C57BL/6J Mäusen signifikant, was auf die antidiabetische Wirkung des BHBs zurückzuführen ist [225]. Interessanterweise konnte der antidiabetische Effekt bei PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäusen nicht beobachtet werden, obwohl diese signifikant höhere Blutzuckerwerte als C57BL/6J Mäuse zeigten (Kap. 4.2.2). Diese Daten sprechen dafür, dass PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse vulnerabler auf Streptozotocin reagieren und gleichzeitig nicht gut auf eine antidiabetische Therapie mit BHB ansprechen. Auch Literaturdaten unterstreichen die unterschiedlich ausgeprägte Anfälligkeit auf die Auswirkungen einer Hyperglykämie zwischen verschiedenen Mausstämmen [184].

Oridonin bewirkte hingegen keinerlei phänotypische Amelioration, im Gegenteil, unter Oridonintherapie kam es zu einem signifikanten Anstieg der ACR, was auf potenzielle toxische Effekte von Oridonin zurückzuführen ist. Studien konnten zeigen, dass Oridonin zum Beispiel zytotoxisch auf hepatisches Gewebe und Erythrozyten wirken kann [226, 227]. Eine potenzielle Nephrotoxizität wäre also denkbar.

Im Gegensatz zu den Daten der vorliegenden Arbeit zeigten Shahzad *et al.* bei Nlrp3-defizienten, diabetischen Mäusen eine Inhibierung der glomerulären Inflammation sowie einen verringerten renalen Schaden im Vergleich zu homozygoten PodoCre;Nlrp3^{A350V/A350V} Mäusen [208].

Neben der fehlenden Amelioration des renalen Phänotyps unter Inflammasom Inhibition konnte die histologische Auswertung unserer Daten erneut kein NLRP3 Inflammasom in der NLRP3 Färbung nachweisen, was eine Abwesenheit des NLRP3 Inflammasoms unterstreicht. Unter der Annahme, dass bei den Experimenten zum überaktiven Inflammasom ein geringgradiger, wenn auch kaum nachweisbarer Nierenschaden vorlag, sollte dennoch gemäß Shahzad *et*

al. eine Amelioration nach Therapie zu beobachten sein [208]. Zwar unterschieden sich auch bei diesem Experiment die Genotypen der verwendeten Mäuse, dennoch kann die Ursache der Diskrepanz nicht final erklärt werden [208]. Dieser Effekt blieb aus, sodass auf Basis der Daten dieser Arbeit eine pharmazeutische Inhibition des NLRP3 Inflammasoms keine Bedeutung in der Therapie der Hyperglykämie-bedingten glomerulären Hyperfiltration zu haben scheint.

Zusammenfassend konnte in den Studien der vorliegenden Arbeit die Präsenz und kanonische Beteiligung des NLRP3 Inflammasoms an inflammatorischen Prozessen in Podozyten nicht nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse entsprechen den Daten des humanen Protein Atlas, widersprechen jedoch der Mehrzahl an publizierten Daten zum NLRP3 Inflammasom [208, 218].

Entsprechend können die dieser Arbeit zugrundeliegenden Hypothesen

- 1. Das podozytäre NLRP3 Inflammasom erfüllt keine kanonischen und proinflammatorischen Funktionen.*
- 2. Die Progression der Hyperfiltrations-induzierten CKD als Frühstadium der DN wird nicht durch das podozytäre NLRP3 vermittelt.*
- 3. Für eine Tertiärprävention eignet sich das podozytäre NLRP3 als therapeutisches Target bei Hyperfiltrations-induzierter CKD nicht. Die Progression der DN kann also nicht durch Inhibition des NLRP3 Inflammasoms als Vermittler von Inflammation verhindert werden.*

nicht verworfen werden.

Insgesamt können nicht-kanonische, IL-1 β unabhängige Effekte des NLRP3 Inflammasoms, die zu Hyperglykämie-bedingten glomerulären Hyperfiltration beitragen, durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden [228, 229].

5.3 Limitationen der Arbeit

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf *in vitro* und *in vivo* Maus-Experimenten. Obwohl derartige Studien die Basis für translationale Forschung darstellen, existieren dennoch etwaige methodische und konzeptionelle Limitationen.

Die Maus als Tiermodell in der experimentellen Nephrologie einzusetzen, ist zwar state of the art, jedoch darf auch hier nicht außer Acht gelassen werden, dass sich Mäuse und Menschen in anatomischen und physiologischen Aspekten unterscheiden. So sind das murine und humane Genom nur zu 25% homolog [230]. Insbesondere Unterschiede im Aufbau des Immunsystems dürfen bei einer Arbeit, die sich mit Inflammation beschäftigt, nicht vernachlässigt werden. So verfügt die Maus über unterschiedliche Strukturen im angeborenen und erworbenen Immunsystem. Beispielsweise exprimieren Mäuse in Paneth Zellen des Dünndarms über 20 verschiedene Zytokine zur Immunabwehr, während der Mensch nur zwei verschiedene Defensine exprimieren kann. Die immunologische Entwicklung zwischen Maus und Mensch hat sich im Rahmen der Evolution an die Lebensumstände und Umweltfaktoren angepasst, um den entsprechenden Organismus bestmöglich vor Pathogenen zu bewahren. [231-233].

Darüber hinaus handelte es sich bei den verwendeten Mäusen um ingezüchtete Tiere. Entsprechend unterscheiden sich die Mäuse untereinander in ihrer genetischen Ausstattung nur durch kleinste Spontanmutationen voneinander. Vergleicht man nun eine Kohorte Labormäuse mit einer Kohorte Patienten, lässt sich feststellen, dass die Genetik der Patienten deutliche, interindividuelle Unterschiede aufweist. Um allgemeingültige Ergebnisse aus klinischen Studien zu generieren, ist es im Gegenteil gerade das Ziel, identische oder ähnliche Effekte auch in heterogenen Gruppen, die nicht das gleiche Alter, Geschlecht, Vorerkrankungsprofil haben, zu erzielen [234].

Neben konzeptionellen Limitationen dürfen auch methodische Limitationen dieser Arbeit nicht ungeachtet bleiben. Die Verwendung von Cre/loxP-Systemen kann zu off-target Effekten führen, wobei insbesondere neu entwickelte Cre-Systeme anfällig dafür sind. Um derartige Effekte zu erkennen, können beispielsweise Cre-Mäuse mit Mäusen, die eine Reporter-kassette besitzen, gekreuzt werden. Darüber hinaus ist auch eine unspezifische Aktivität in anderen Organen möglich [235]. In der vorliegenden Arbeit würde das bedeuten, dass die Cre-Rekombinase nicht spezifisch in Podozyten exprimiert wird, sondern auch außerhalb der Niere oder in anderen Nierenkompartimenten. Um sicherzustellen, dass die Cre-Rekombinase für diese Studien spezifisch in Podozyten exprimiert wird, wurden stets Endpunkt-PCRs durchgeführt.

Trotz STZ-induziertem DM1 und Uninephrektomie entwickelten die Versuchstiere im Gegensatz zu den Daten anderer Publikationen keine fulminante DN [181, 208]. Diese Diskrepanz kann auf unterschiedliche Laufzeiten der Experimente und unterschiedliche Vulnerabilität der Mauslinien auf die STZ-Therapie zurückgeführt werden. Dennoch erschweren diese Unterschiede die Vergleichbarkeit der Experimente. Weiterhin muss die unspezifische Wirkung der Inflammasom Inhibitoren BHB und Oridonin berücksichtigt werden. Die inhibitorische Wirkung ist nicht nur auf die Podozyten beschränkt, sondern betrifft den Gesamtorganismus. Gleiches gilt auch für potenziell toxische Wirkungen der Substanzen, die Beobachtungen potenziell verfälschen können. So führt der blutzuckersenkende Effekt von BHB NLRP3 unabhängig zu einer verbesserten Stoffwechselsituation und weniger diabetischen Schäden an den Organen des Versuchstiers. Die Abgrenzung des inhibitorischen Effekts auf das Inflammasom von der verbesserten Stoffwechseleinstellung bei Ameliorationen des renalen Phänotyps ist folglich schwer.

Weiterhin tritt nur bei wenigen Patienten mit Diabetes wenige Jahre nach Diagnosestellung eine DN auf. Bei langfristig schlechter Stoffwechseleinstellung kommt es zu progredienten Schäden an diversen Organsystemen. Entsprechend kann nach einer Experimentdauer von 12 Wochen bei dem Mausmodell in dieser Arbeit keine schwere DN erwartet werden. Diese Arbeit hat sich folglich mit einer Frühphase der DN beschäftigt – dem Stadium, in dem es durch initiale Kompensationsversuche der Niere zur Hyperfiltration kommt. Irreversible, strukturelle Schäden konnten jedoch noch nicht beobachtet werden. Folglich dürfen die Beobachtungen und Hypothesen dieser Studie nicht auf die DN im Allgemeinen angewendet werden, sondern lediglich auf ein sehr frühes Stadium der glomerulären Hyperfiltration bei persistierender Hyperglykämie. Daneben ist zu berücksichtigen, dass es nicht bei jedem Patienten mit Diabetes und schlechter Stoffwechseleinstellung zu einer DN im Krankheitsverlauf kommt. Entsprechend scheinen auch Hyperglykämie unabhängige Faktoren die Entstehung einer DN zu begünstigen. Diese Faktoren wurden in dieser Studie ebenfalls nicht berücksichtigt.

Zusammenfassend können präklinische Studien auf keinen Fall klinische Studien ersetzen. Die Implementierung validierter präklinischer Ansätze in klinische

Strukturen ist stets erforderlich, um den finalen Benefit oder den Effekt für den Menschen zu erkennen.

5.4 Ausblick

Das NLRP3 Inflammasom und seine Bedeutung für die Entstehung und Progression von Nierenerkrankungen ist über die letzten Jahre zentraler Bestandteil experimenteller, nephrologischer Forschung geworden [236]. Dabei konnte zwar die Bedeutung in Immunzellen geklärt werden, die exakte Funktion in parenchymalen Zellen, wie Podozyten bleibt jedoch nach wie vor umstritten [237, 238]. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mittels kanonischer Stimulation keine Interleukin Sekretion in Podozyten erreicht werden kann. Fraglich bleibt jedoch, ob das podozytäre NLRP3 Inflammasom nicht-kanonisch zur Pathogenese der DN beiträgt. So wurde bei einer Studie zur Wirkung des NLRP3 Inflammasoms der Effekt auf renale Ischämie-Reperusions-Verletzungen (IRI) untersucht. Nur wenn Mäuse Nlrp3 defizient waren, konnte ein Schutz vor renalen Schäden demonstriert werden. Caspase-1 defiziente oder IL-1 Rezeptor defiziente Mäuse profitierten nicht von protektiven Effekten, was eine nicht-kanonische Involvierung des NLRP3 Inflammasoms bei IRI nahelegt [239]. Weiterhin sind Studien erforderlich, die die nicht-kanonischen Effekte des NLRP3 Inflammasoms in fibrotischen oder apoptotischen Mechanismen untersuchen. Ein potenziell interessantes Molekül wäre in diesem Zusammenhang TGF- β , für das bereits in andere Geweben Untersuchungen zum Zusammenhang mit dem NLRP3 Inflammasom bestehen [240]. Neben Glucose und ATP existieren noch viele weitere NLRP3 Inflammasom Stimuli. Denkbar wäre auch eine Suszeptibilität des podozytären Inflammasoms gegenüber ausgewählten Substanzen. Weiterhin sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein, ob es nicht andere mechanistische Wirkungen auf Podozyten gibt, die durch das NLRP3 Inflammasom bedingt werden. So sollten vielleicht nicht nur Nierenretentionsparameter und Histologie, sondern auch weitere funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden. Zu nennen sind hier exemplarisch weitere Studien zur Podozytenmorphologie, wie Stimulated Emission Depletion (STED) Mikroskopie oder Fluoreszenzmikroskopie [10]. Insbesondere in Bezug auf PodoCre;Nlrp3^{WT/A350V} Mäuse könnten weiterhin Glomeruli extrahiert werden und nach Kultivierung *in vitro* mit NLRP3 Stimulanzen behandelt werden. So könnte noch genauer die Wirkung des NLRP3

Inflammasoms bei überaktivem Inflammasom untersucht werden. Denkbar wären auch ergänzende Studien mit Inflammasom defizienten Mäusen sowie die Untersuchung der Rolle des Inflammasoms bei DM1 für andere renale, parenchymale Zellen wie Tubuluszellen.

Der ursprüngliche Gedanke der Studie, mittels spezifischer NLRP3 Inflammasom Inhibition eine potenzielle Option der Tertiärprävention der DN gefunden zu haben, um auf diese Weise die IL-1 β vermittelte Progression zu verhindern, muss aufgrund der vorliegenden Ergebnisse verworfen werden. Auf Basis der vorliegenden Daten verfügen Podozyten über kein NLRP3 Inflammasom, welches für inflammatorische Prozesse bei Podozytenstress verantwortlich ist. Eine Therapiestrategie der DN upstream von IL-1 β erscheint entsprechend nicht indiziert. Allerdings könnte durch Untersuchung nicht-kanonischer Effekte des NLRP3 Inflammasoms möglicherweise eine andere Therapiestrategie entwickelt werden, um so durch Inhibition an anderer Stelle, beziehungsweise in anderen Kompartimenten der Niere den Progress der DN zu verhindern. Ergänzende Studien sind notwendig, auch um die vorliegenden Daten unabhängig zu verifizieren.

Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R, A.E., Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Thieme, 2019. 6. vollständig überarbeitete Auflage
2. Wallace, M.A., Anatomy and physiology of the kidney. *Aorn j*, 1998. 68(5): p. 800, 803-16, 819-20; quiz 821-4.
3. Reiser, J. and M.M. Altintas, Podocytes. *F1000Res*, 2016. 5.
4. Appel, D., et al., Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 2009. 20(2): p. 333-43.
5. Pape H, K.A., Silbernagl S, Physiologie. Stuttgart: Thieme, 2019. 9. vollständig überarbeitete Auflage.
6. Zehra, T., W.A. Cupples, and B. Braam, Tubuloglomerular Feedback Synchronization in Nephrovascular Networks. *J Am Soc Nephrol*, 2021. 32(6): p. 1293-1304.
7. Suttrop N, M.M., Siegmund B et al., *Harrisons Innere Medizin*. ABW Wissenschaftsverlag, 2016. 19. Auflage.
8. Vogetseder, A., et al., Tubular cell proliferation in the healthy rat kidney. *Histochem Cell Biol*, 2005. 124(2): p. 97-104.
9. Kriz, W., et al., The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. 304(4): p. F333-47.
10. Melica, M.E., et al., Differentiation of crescent-forming kidney progenitor cells into podocytes attenuates severe glomerulonephritis in mice. *Sci Transl Med*, 2022. 14(657): p. eabg3277.
11. Bayliss, G., L.A. Weinrauch, and J.A. D'Elia, Pathophysiology of obesity-related renal dysfunction contributes to diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep*, 2012. 12(4): p. 440-6.
12. Marckmann, P., et al., High-protein diets and renal health. *J Ren Nutr*, 2015. 25(1): p. 1-5.
13. Tonneijck, L., et al., Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *J Am Soc Nephrol*, 2017. 28(4): p. 1023-1039.
14. Atkinson, M.A., G.S. Eisenbarth, and A.W. Michels, Type 1 diabetes. *Lancet*, 2014. 383(9911): p. 69-82.
15. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*, 2010. 464(7293): p. 1293-300.
16. Khalil, I., et al., A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1990. 85(4): p. 1315-9.
17. Rowe, R.E., et al., High genetic risk for IDDM in the Pacific Northwest. First report from the Washington State Diabetes Prediction Study. *Diabetes*, 1994. 43(1): p. 87-94.
18. Cunningham, C.A., E. Teixeira, and M.A. Daniels, FTOC-Based Analysis of Negative Selection. *Methods Mol Biol*, 2016. 1323: p. 141-9.
19. Koivula, T.T., et al., Clonal Analysis of Regulatory T Cell Defect in Patients with Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1 Suggests Intrathymic Impairment. *Scand J Immunol*, 2017. 86(4): p. 221-228.
20. Kurd, N.S., et al., A role for phagocytosis in inducing cell death during thymocyte negative selection. *Elife*, 2019. 8.
21. Foulis, A.K. and J.A. Stewart, The pancreas in recent-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. *Diabetologia*, 1984. 26(6): p. 456-61.
22. Foulis, A.K., et al., The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia*, 1986. 29(5): p. 267-74.
23. Willcox, A., et al., Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*, 2009. 155(2): p. 173-81.
24. Conrad, B., et al., Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature*, 1994. 371(6495): p. 351-5.

25. Hänninen, A., et al., Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1992. 90(5): p. 1901-10.
26. Haskins, K. and M. McDuffie, Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. *Science*, 1990. 249(4975): p. 1433-6.
27. Surcel, H.M., et al., Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology*, 1994. 81(2): p. 171-6.
28. Pietropaolo, M., et al., Primer: immunity and autoimmunity. *Diabetes*, 2008. 57(11): p. 2872-82.
29. Hill, N.J., K. Van Gunst, and N. Sarvetnick, Th1 and Th2 pancreatic inflammation differentially affects homing of islet-reactive CD4 cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 2003. 170(4): p. 1649-58.
30. Atkinson, M.A. and G.S. Eisenbarth, Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*, 2001. 358(9277): p. 221-9.
31. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 2017. 40(Suppl 1): p. S11-s24.
32. Palmer, J.P., et al., Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*, 1983. 222(4630): p. 1337-9.
33. Bingley, P.J., E. Bonifacio, and P.W. Mueller, Diabetes Antibody Standardization Program: first assay proficiency evaluation. *Diabetes*, 2003. 52(5): p. 1128-36.
34. Schlosser, M., et al., Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for insulin autoantibodies. *Diabetologia*, 2010. 53(12): p. 2611-20.
35. Bottazzo, G.F., A. Florin-Christensen, and D. Doniach, Pillars Article: Islet-cell Antibodies in Diabetes Mellitus with Autoimmune Polyendocrine Deficiencies. *Lancet*. 1974. 304: 1279-1283. *J Immunol*, 2017. 199(9): p. 3014-3018.
36. Törn, C., et al., Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia*, 2008. 51(5): p. 846-52.
37. Wiest-Ladenburger, U., et al., Combined analysis and single-step detection of GAD65 and IA2 autoantibodies in IDDM can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes*, 1997. 46(4): p. 565-71.
38. Banting, F.G., et al., Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J*, 1922. 12(3): p. 141-6.
39. Cordell, H.J. and J.A. Todd, Multifactorial inheritance in type 1 diabetes. *Trends Genet*, 1995. 11(12): p. 499-504.
40. Cantor, A.B., et al., Age and family relationship accentuate the risk of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in relatives of patients with IDDM. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. 80(12): p. 3739-43.
41. Patterson, C.C., et al., Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989-2013: a multicentre prospective registration study. *Diabetologia*, 2019. 62(3): p. 408-417.
42. Bendas, A., et al., Trends in Incidence Rates during 1999-2008 and Prevalence in 2008 of Childhood Type 1 Diabetes Mellitus in Germany--Model-Based National Estimates. *PLoS One*, 2015. 10(7): p. e0132716.
43. Rosenbauer, J., et al., Incidence of childhood Type I diabetes mellitus is increasing at all ages in Germany. *Diabetologia*, 2002. 45(3): p. 457-8.
44. Umanath, K. and J.B. Lewis, Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis*, 2018. 71(6): p. 884-895.
45. Predictors of the development of microalbuminuria in patients with Type 1 diabetes mellitus: a seven-year prospective study. The Microalbuminuria Collaborative Study Group. *Diabet Med*, 1999. 16(11): p. 918-25.
46. Fioretto, P., et al., Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med*, 1998. 339(2): p. 69-75.
47. Molitch, M.E., et al., Diabetic kidney disease: a clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes. *Kidney Int*, 2015. 87(1): p. 20-30.

48. Thornalley, P.J., A. Langborg, and H.S. Minhas, Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J*, 1999. 344 Pt 1(Pt 1): p. 109-16.
49. Miyata, T., et al., Clearance of pentosidine, an advanced glycation end product, by different modalities of renal replacement therapy. *Kidney Int*, 1997. 51(3): p. 880-7.
50. Koschinsky, T., et al., Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(12): p. 6474-9.
51. Monnier, V.M., et al., Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N Engl J Med*, 1986. 314(7): p. 403-8.
52. Nathan, D.M., et al., The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1993. 329(14): p. 977-86.
53. Beisswenger, P.J., et al., Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes*, 1995. 44(7): p. 824-9.
54. Gugliucci, A. and M. Bendayan, Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats: an ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry. *J Histochem Cytochem*, 1995. 43(6): p. 591-600.
55. el Khoury, J., et al., Macrophages adhere to glucose-modified basement membrane collagen IV via their scavenger receptors. *J Biol Chem*, 1994. 269(14): p. 10197-200.
56. Vlassara, H., et al., Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med*, 1995. 1(6): p. 634-46.
57. Li, Y.M., et al., Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(20): p. 11047-52.
58. Ohgami, N., et al., CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *J Diabetes Complications*, 2002. 16(1): p. 56-9.
59. Sun, Z., et al., RAGE/galectin-3 yields intraplaque calcification transformation via sortilin. *Acta Diabetol*, 2019. 56(4): p. 457-472.
60. de Oliveira Silva, C., et al., Modulation of CD36 protein expression by AGEs and insulin in aortic VSMCs from diabetic and non-diabetic rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008. 18(1): p. 23-30.
61. Leclerc, E., et al., S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains. *J Biol Chem*, 2007. 282(43): p. 31317-31.
62. Liu, T., et al., NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2017. 2: p. 17023-.
63. Yamagishi, S., et al., Advanced glycation end products inhibit de novo protein synthesis and induce TGF-beta overexpression in proximal tubular cells. *Kidney Int*, 2003. 63(2): p. 464-73.
64. Fukami, K., et al., AGEs activate mesangial TGF-beta-Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction. *Kidney Int*, 2004. 66(6): p. 2137-47.
65. Rasch, R., Tubular lesions in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, 1984. 27(1): p. 32-7.
66. Wright, F.S. and J. Schnermann, Interference with feedback control of glomerular filtration rate by furosemide, triflocin, and cyanide. *J Clin Invest*, 1974. 53(6): p. 1695-708.
67. Vallon, V. and R. Komers, Pathophysiology of the diabetic kidney. *Compr Physiol*, 2011. 1(3): p. 1175-232.
68. Riede U, W.M., Schaefer H, Hrsg, Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme, 2004. 5. Auflage.(Stuttgart:).

69. Wan, L., et al., The advanced glycation end-products (AGEs)/ROS/NLRP3 inflammasome axis contributes to delayed diabetic corneal wound healing and nerve regeneration. *Int J Biol Sci*, 2022. 18(2): p. 809-825.
70. Papadopoulou-Marketou, N., G.P. Chrousos, and C. Kanaka-Gantenbein, Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes Metab Res Rev*, 2017. 33(2).
71. Takahashi, N., et al., Chronic hypoxia exacerbates diabetic glomerulosclerosis through mesangiolysis and podocyte injury in db/db mice. *Nephrol Dial Transplant*, 2020. 35(10): p. 1678-1688.
72. Goldfarb, S., et al., Effects of polyol-pathway inhibition and dietary myo-inositol on glomerular hemodynamic function in experimental diabetes mellitus in rats. *Diabetes*, 1991. 40(4): p. 465-71.
73. Hashimoto, Y., et al., Polyol pathway and diabetic nephropathy revisited: Early tubular cell changes and glomerulopathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase. *J Diabetes Investig*, 2011. 2(2): p. 111-22.
74. Lee, Y.J., Y.J. Lee, and H.J. Han, Regulatory mechanisms of Na(+)/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells. *Kidney Int Suppl*, 2007(106): p. S27-35.
75. Mhatre, K.N., et al., Crosstalk between FGF23- and angiotensin II-mediated Ca(2+) signaling in pathological cardiac hypertrophy. *Cell Mol Life Sci*, 2018. 75(23): p. 4403-4416.
76. Xiao, L., et al., Wnt/ β -catenin regulates blood pressure and kidney injury in rats. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019. 1865(6): p. 1313-1322.
77. de Lima, R.S., et al., Proinflammatory Role of Angiotensin II in the Aorta of Normotensive Mice. *Biomed Res Int*, 2019. 2019: p. 9326896.
78. Nathan, D.M., The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care*, 2014. 37(1): p. 9-16.
79. Zhang, Y., et al., Podocyte apoptosis in diabetic nephropathy by BASP1 activation of the p53 pathway via WT1. *Acta Physiol (Oxf)*, 2021: p. e13634.
80. Hojs, R., et al., Biomarkers of Renal Disease and Progression in Patients with Diabetes. *J Clin Med*, 2015. 4(5): p. 1010-24.
81. Tang, D., et al., PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*, 2012. 249(1): p. 158-75.
82. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 2011. 30(1): p. 16-34.
83. Relja, B. and W.G. Land, Damage-associated molecular patterns in trauma. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2020. 46(4): p. 751-775.
84. Gluba, A., et al., The role of Toll-like receptors in renal diseases. *Nat Rev Nephrol*, 2010. 6(4): p. 224-35.
85. Meyer, M., R. Schreck, and P.A. Baeuerle, H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *Embo j*, 1993. 12(5): p. 2005-15.
86. Navarro-González, J.F. and C. Mora-Fernández, The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2008. 19(3): p. 433-42.
87. Rivero, A., et al., Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)*, 2009. 116(6): p. 479-92.
88. Sekizuka, K., et al., Detection of serum IL-6 in patients with diabetic nephropathy. *Nephron*, 1994. 68(2): p. 284-5.
89. Shikano, M., et al., Usefulness of a highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy. *Nephron*, 2000. 85(1): p. 81-5.
90. Wong, C.K., et al., Aberrant activation profile of cytokines and mitogen-activated protein kinases in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Clin Exp Immunol*, 2007. 149(1): p. 123-31.
91. Moriwaki, Y., et al., Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor- α in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. *Metabolism*, 2003. 52(5): p. 605-8.

92. Altinova, A.E., et al., Serum IL-18 levels in patients with type 1 diabetes: relations to metabolic control and microvascular complications. *Cytokine*, 2008. 42(2): p. 217-221.
93. Sugimoto, H., et al., Advanced glycation end products-cytokine-nitric oxide sequence pathway in the development of diabetic nephropathy: aminoguanidine ameliorates the overexpression of tumour necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase in diabetic rat glomeruli. *Diabetologia*, 1999. 42(7): p. 878-86.
94. Moser, B. and P. Loetscher, Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*, 2001. 2(2): p. 123-8.
95. Xu, X., et al., High glucose induced-macrophage activation through TGF- β -activated kinase 1 signaling pathway. *Inflamm Res*, 2016. 65(8): p. 655-64.
96. Yatim, K.M. and F.G. Lakkis, A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015. 10(7): p. 1274-81.
97. Dzopalic, T., et al., The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunol Res*, 2012. 52(1-2): p. 20-33.
98. Hume, D.A. and T.C. Freeman, Transcriptomic analysis of mononuclear phagocyte differentiation and activation. *Immunol Rev*, 2014. 262(1): p. 74-84.
99. Zhang, F., et al., Mesenchymal stem cells alleviate rat diabetic nephropathy by suppressing CD103(+) DCs-mediated CD8(+) T cell responses. *J Cell Mol Med*, 2020. 24(10): p. 5817-5831.
100. Laidlaw, B.J. and J.G. Cyster, Transcriptional regulation of memory B cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 2021. 21(4): p. 209-220.
101. Yang, H., et al., Tim-3 aggravates podocyte injury in diabetic nephropathy by promoting macrophage activation via the NF- κ B/TNF- α pathway. *Mol Metab*, 2019. 23: p. 24-36.
102. Kodera, R., et al., Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates early renal injury through its anti-inflammatory action in a rat model of type 1 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. 443(3): p. 828-33.
103. Klessens, C.Q.F., et al., Macrophages in diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant*, 2017. 32(8): p. 1322-1329.
104. Luan, J., et al., miR-150-Based RNA Interference Attenuates Tubulointerstitial Fibrosis through the SOCS1/JAK/STAT Pathway In Vivo and In Vitro. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020. 22: p. 871-884.
105. Courties, G., et al., In vivo silencing of the transcription factor IRF5 reprograms the macrophage phenotype and improves infarct healing. *J Am Coll Cardiol*, 2014. 63(15): p. 1556-66.
106. Zhang, J., et al., Effects of neutrophil-lymphocyte ratio on renal function and histologic lesions in patients with diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 2019. 24(11): p. 1115-1121.
107. Liu, J., et al., The association of neutrophil to lymphocyte ratio, mean platelet volume, and platelet distribution width with diabetic retinopathy and nephropathy: a meta-analysis. *Biosci Rep*, 2018. 38(3).
108. Kawamoto, R., et al., Association of neutrophil-to-lymphocyte ratio with early renal dysfunction and albuminuria among diabetic patients. *Int Urol Nephrol*, 2019. 51(3): p. 483-490.
109. Deets, K.A. and R.E. Vance, Inflammasomes and adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 2021. 22(4): p. 412-422.
110. Duncan, J.A., et al., Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(19): p. 8041-6.
111. Schroder, K. and J. Tschopp, The Inflammasomes. *Cell*, 2010. 140(6): p. 821-832.
112. Broz, P. and V.M. Dixit, Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*, 2016. 16(7): p. 407-20.

113. Bae, J.Y. and H.H. Park, Crystal structure of NALP3 protein pyrin domain (PYD) and its implications in inflammasome assembly. *J Biol Chem*, 2011. 286(45): p. 39528-36.
114. Bae, J.Y. and H.H. Park, Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the PYD domain of human NALP3. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2011. 67(Pt 11): p. 1421-4.
115. Sharif, H., et al., Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. *Nature*, 2019. 570(7761): p. 338-343.
116. Vajjhala, P.R., R.E. Mirams, and J.M. Hill, Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. *J Biol Chem*, 2012. 287(50): p. 41732-43.
117. Oroz, J., et al., ASC Pyrin Domain Self-associates and Binds NLRP3 Protein Using Equivalent Binding Interfaces. *J Biol Chem*, 2016. 291(37): p. 19487-501.
118. Nadiri, A., M.K. Wolinski, and M. Saleh, The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. *J Immunol*, 2006. 177(7): p. 4239-45.
119. Tschopp, J., F. Martinon, and K. Burns, NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(2): p. 95-104.
120. Di, A., et al., The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation. *Immunity*, 2018. 49(1): p. 56-65.e4.
121. Murakami, T., et al., Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(28): p. 11282-7.
122. Domingo-Fernández, R., et al., The intracellular chloride channel proteins CLIC1 and CLIC4 induce IL-1 β transcription and activate the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem*, 2017. 292(29): p. 12077-12087.
123. Hornung, V., et al., Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, 2008. 9(8): p. 847-56.
124. Zhou, R., et al., A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 2011. 469(7329): p. 221-5.
125. Sanman, L.E., et al., Disruption of glycolytic flux is a signal for inflammasome signaling and pyroptotic cell death. *Elife*, 2016. 5: p. e13663.
126. Bauernfeind, F.G., et al., Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*, 2009. 183(2): p. 787-91.
127. Lu, A., et al., Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell*, 2014. 156(6): p. 1193-1206.
128. Schmidt, F.I., et al., A single domain antibody fragment that recognizes the adaptor ASC defines the role of ASC domains in inflammasome assembly. *J Exp Med*, 2016. 213(5): p. 771-90.
129. He, Y., et al., NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*, 2016. 530(7590): p. 354-7.
130. Shi, H., et al., NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat Immunol*, 2016. 17(3): p. 250-8.
131. Netea, M.G., et al., Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annu Rev Immunol*, 2015. 33: p. 49-77.
132. Komada, T. and D.A. Muruve, The role of inflammasomes in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 2019. 15(8): p. 501-520.
133. Boucher, D., et al., Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med*, 2018. 215(3): p. 827-840.
134. Shi, J., et al., Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 2015. 526(7575): p. 660-5.
135. Kayagaki, N., et al., Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*, 2013. 341(6151): p. 1246-9.

136. Shi, J., et al., Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*, 2014. 514(7521): p. 187-92.
137. Napier, B.A., et al., Complement pathway amplifies caspase-11-dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity. *J Exp Med*, 2016. 213(11): p. 2365-2382.
138. Kayagaki, N., et al., Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 2015. 526(7575): p. 666-71.
139. Zanoni, I., et al., An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science*, 2016. 352(6290): p. 1232-6.
140. Wang, W., et al., Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF-beta signaling in kidney epithelium. *J Immunol*, 2013. 190(3): p. 1239-49.
141. Liu, Y., Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*, 2004. 15(1): p. 1-12.
142. Quaggin, S.E. and A. Kapus, Scar wars: mapping the fate of epithelial-mesenchymal-myofibroblast transition. *Kidney Int*, 2011. 80(1): p. 41-50.
143. Hoffman, H.M., et al., Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet*, 2001. 29(3): p. 301-5.
144. Hoffman, H.M., et al., Identification of a locus on chromosome 1q44 for familial cold urticaria. *Am J Hum Genet*, 2000. 66(5): p. 1693-8.
145. Verbsky, J.W. and J.R. Routes, 41 - Recurrent Fever, Infections, Immune Disorders, and Autoinflammatory Diseases, in *Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis*, R.M. Kliegman, et al., Editors. 2018, Elsevier. p. 746-773.e1.
146. El-Osta, H., F. Janku, and R. Kurzrock, Successful treatment of Castleman's disease with interleukin-1 receptor antagonist (Anakinra). *Mol Cancer Ther*, 2010. 9(6): p. 1485-8.
147. He, H., et al., Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity. *Nat Commun*, 2018. 9(1): p. 2550.
148. Youm, Y.H., et al., The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med*, 2015. 21(3): p. 263-9.
149. Muñoz-Planillo, R., et al., K^+ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*, 2013. 38(6): p. 1142-53.
150. Kimmelstiel, P. and C. Wilson, Intercapillary Lesions in the Glomeruli of the Kidney. *Am J Pathol*, 1936. 12(1): p. 83-98.7.
151. Drummond, K. and M. Mauer, The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2002. 51(5): p. 1580-7.
152. Yamakawa, T., et al., Glomerular basement membrane duplication is a predictor of the prognosis of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Clin Exp Nephrol*, 2019. 23(4): p. 521-529.
153. M Shlomo, K.P., PR Larsen, and HM Kronenberg. , *Williams Textbook of Endocrinology*,. Philadelphia: Saunders, 2011. 12th edition.
154. Vallon, V. and S.C. Thomson, Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annu Rev Physiol*, 2012. 74: p. 351-75.
155. Heyman, S.N., M. Khamaisi, and Z. Abassi, Interacting hypoxia and endothelin in the diabetic kidney: therapeutic options. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018. 314(5): p. F699-f701.
156. Sinkeler, S.J., et al., Creatinine excretion rate and mortality in type 2 diabetes and nephropathy. *Diabetes Care*, 2013. 36(6): p. 1489-94.
157. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis*, 2007. 49(2 Suppl 2): p. S12-154.
158. Hostetter, T.H., J.L. Troy, and B.M. Brenner, Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int*, 1981. 19(3): p. 410-5.

159. Mogensen, C.E., C.K. Christensen, and E. Vittinghus, The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*, 1983. 32 Suppl 2: p. 64-78.
160. Jerums, G., et al., Integrating albuminuria and GFR in the assessment of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*, 2009. 5(7): p. 397-406.
161. Cooper, M.E., Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *The Lancet*, 1998. 352(9123): p. 213-219.
162. Schlosser, M., et al., Nephropathie bei Diabetes mellitus. *Diabetologie* 2017. 12 Suppl 2: p. 115-120.
163. Thipsawat, S., Early detection of diabetic nephropathy in patient with type 2 diabetes mellitus: A review of the literature. *Diab Vasc Dis Res*, 2021. 18(6): p. 14791641211058856.
164. Mulay, S.R., et al., Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1 β secretion. *J Clin Invest*, 2013. 123(1): p. 236-46.
165. Komada, T., et al., Role of NLRP3 Inflammasomes for Rhabdomyolysis-induced Acute Kidney Injury. *Sci Rep*, 2015. 5: p. 10901.
166. Shahzad, K., et al., Caspase-1, but Not Caspase-3, Promotes Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2016. 27(8): p. 2270-2275.
167. Shahzad, K., et al., Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 2015. 87(1): p. 74-84.
168. Vilaysane, A., et al., The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol*, 2010. 21(10): p. 1732-44.
169. Lichtnekert, J., et al., Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1. *PLoS One*, 2011. 6(10): p. e26778.
170. Ma, C.H., et al., Simiao pill ameliorates renal glomerular injury via increasing Sirt1 expression and suppressing NF- κ B/NLRP3 inflammasome activation in high fructose-fed rats. *J Ethnopharmacol*, 2015. 172: p. 108-17.
171. Shahzad, K., et al., Stabilization of endogenous Nrf2 by minocycline protects against Nlrp3-inflammasome induced diabetic nephropathy. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 34228.
172. Anders, H.J., K. Andersen, and B. Stecher, The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int*, 2013. 83(6): p. 1010-6.
173. Detailed strain description PodoCre. <https://www.jax.org/strain/008205> (Internet: 29.06.2022).
174. Detailed Strain description Nlrp3^{WT/A350V}. <https://www.jax.org/strain/017969> (Internet: 29.06.2022).
175. Brydges, S.D., et al., Inflammasome-mediated disease animal models reveal roles for innate but not adaptive immunity. *Immunity*, 2009. 30(6): p. 875-87.
176. Zhang, T., et al., Oridonin alleviates d-GalN/LPS-induced acute liver injury by inhibiting NLRP3 inflammasome. *Drug Dev Res*, 2021. 82(4): p. 575-580.
177. Segnani, C., et al., Histochemical Detection of Collagen Fibers by Sirius Red/Fast Green Is More Sensitive than van Gieson or Sirius Red Alone in Normal and Inflamed Rat Colon. *PLoS One*, 2015. 10(12): p. e0144630.
178. Kreidberg, J.A., WT1 and kidney progenitor cells. *Organogenesis*, 2010. 6(2): p. 61-70.
179. Proteinatlas WT-1. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000184937-WT1/tissue/kidney#imid_132058 (Internet: 29.06.2022).
180. Sagrinati, C., et al., Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(9): p. 2443-56.
181. Breyer, M.D., et al., Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2005. 16(1): p. 27-45.
182. Brosius, F.C., 3rd, et al., Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2009. 20(12): p. 2503-12.

183. Leiter, E.H., Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. 79(2): p. 630-4.
184. Zheng, F., et al., Strain differences rather than hyperglycemia determine the severity of glomerulosclerosis in mice. *Kidney Int*, 1998. 54(6): p. 1999-2007.
185. Spencer, M.W., et al., Hyperglycemia and hyperlipidemia act synergistically to induce renal disease in LDL receptor-deficient BALB mice. *Am J Nephrol*, 2004. 24(1): p. 20-31.
186. Honjo, K., et al., Histopathology of streptozotocin-induced diabetic DBA/2N and CD-1 mice. *Lab Anim*, 1986. 20(4): p. 298-303.
187. Kimura, I., T. Matsui, and M. Kimura, Increase in basal pulse rate and blood pressure by the diabetic state in KK-CAY mice, alloxan-mice and streptozotocin-mice. *Jpn J Pharmacol*, 1988. 46(1): p. 93-6.
188. Kume, E., et al., Glomerular lesions in unilateral nephrectomized and diabetic (UN-D) mice. *J Vet Med Sci*, 1992. 54(6): p. 1085-90.
189. Wolf, J., F. Lilly, and S.I. Shin, The influence of genetic background on the susceptibility of inbred mice to streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*, 1984. 33(6): p. 567-71.
190. Doi, K., et al., Histopathology of BALB/c mice infected with the D variant of encephalomyocarditis virus. *Br J Exp Pathol*, 1988. 69(3): p. 395-401.
191. Hirasawa, K., et al., Involvement of macrophages in the development of encephalomyocarditis (EMC) virus-induced diabetes in mice. *Exp Anim*, 1996. 45(1): p. 77-80.
192. Doi, K., et al., Rapid development of renal lesions in diabetic DBA mice infected with the D-variant of encephalomyocarditis virus (EMC-D). *Br J Exp Pathol*, 1989. 70(3): p. 275-81.
193. Mathews, C.E., S.H. Langley, and E.H. Leiter, New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus. *Transplantation*, 2002. 73(8): p. 1333-6.
194. Haseyama, T., et al., Complications of IgA nephropathy in a non-insulin-dependent diabetes model, the Akita mouse. *Tohoku J Exp Med*, 2002. 198(4): p. 233-44.
195. Fujita, H., et al., Increased expression of glutathione S-transferase in renal proximal tubules in the early stages of diabetes: a study of type-2 diabetes in the Akita mouse model. *Exp Nephrol*, 2001. 9(6): p. 380-6.
196. Watanabe, Y., et al., Unique glomerular lesion with spontaneous lipid deposition in glomerular capillary lumina in the NON strain of mice. *Nephron*, 1991. 58(2): p. 210-8.
197. Doi, T., et al., Glomerular lesions in nonobese diabetic mouse: before and after the onset of hyperglycemia. *Lab Invest*, 1990. 63(2): p. 204-12.
198. Maeda, M., et al., Renal lesions in spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus in the nonobese diabetic mouse: acute phase of diabetes. *Vet Pathol*, 2003. 40(2): p. 187-95.
199. Wilson, K.H., et al., Microarray analysis of gene expression in the kidneys of new- and post-onset diabetic NOD mice. *Diabetes*, 2003. 52(8): p. 2151-9.
200. Szkudelski, T., The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 2001. 50(6): p. 537-46.
201. Schnedl, W.J., et al., STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*, 1994. 43(11): p. 1326-33.
202. Bennett, R.A. and A.E. Pegg, Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res*, 1981. 41(7): p. 2786-90.
203. Pieper, A.A., et al., Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(6): p. 3059-64.
204. Chow, B.S.M. and T.J. Allen, Mouse Models for Studying Diabetic Nephropathy. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2015. 5(2): p. 85-94.

205. Kang, S.K., N.A. Hawkins, and J.A. Kearney, C57BL/6J and C57BL/6N substrains differentially influence phenotype severity in the Scn1a (+/-) mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsia Open*, 2019. 4(1): p. 164-169.
206. Zheng, S., et al., Uninephrectomy of diabetic OVE26 mice greatly accelerates albuminuria, fibrosis, inflammatory cell infiltration and changes in gene expression. *Nephron Exp Nephrol*, 2011. 119(1): p. e21-32.
207. Sharma, B.R. and T.D. Kanneganti, NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nat Immunol*, 2021. 22(5): p. 550-559.
208. Shahzad, K., et al., Podocyte-specific Nlrp3 inflammasome activation promotes diabetic kidney disease. *Kidney Int*, 2022. 102(4): p. 766-779.
209. Tang, S.C.W. and W.H. Yiu, Innate immunity in diabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 2020. 16(4): p. 206-222.
210. Yu, Z.W., et al., A new research hot spot: The role of NLRP3 inflammasome activation, a key step in pyroptosis, in diabetes and diabetic complications. *Life Sci*, 2020. 240: p. 117138.
211. Fu, R., et al., Pim-1 as a Therapeutic Target in Lupus Nephritis. *Arthritis Rheumatol*, 2019. 71(8): p. 1308-1318.
212. Chun, J., et al., NLRP3 Localizes to the Tubular Epithelium in Human Kidney and Correlates With Outcome in IgA Nephropathy. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 24667.
213. Gao, Z., et al., Targeting HO-1 by Epigallocatechin-3-Gallate Reduces Contrast-Induced Renal Injury via Anti-Oxidative Stress and Anti-Inflammation Pathways. *PLoS One*, 2016. 11(2): p. e0149032.
214. Nagata, M., Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int*, 2016. 89(6): p. 1221-30.
215. Jha, A., et al., Alterations in plasma membrane ion channel structures stimulate NLRP3 inflammasome activation in APOL1 risk milieu. *Febs j*, 2020. 287(10): p. 2000-2022.
216. Haque, S., et al., HIV Promotes NLRP3 Inflammasome Complex Activation in Murine HIV-Associated Nephropathy. *Am J Pathol*, 2016. 186(2): p. 347-58.
217. Gao, P., et al., NADPH oxidase-induced NALP3 inflammasome activation is driven by thioredoxin-interacting protein which contributes to podocyte injury in hyperglycemia. *J Diabetes Res*, 2015. 2015: p. 504761.
218. The human protein atlas NLRP3. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000162711-NLRP3/single+cell+type/kidney> (Internet: 29.06.2023).
219. Brenna, O., et al., Cytotoxicity of streptozotocin on neuroendocrine cells of the pancreas and the gut. *Dig Dis Sci*, 2003. 48(5): p. 906-10.
220. Goyal, S.N., et al., Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem Biol Interact*, 2016. 244: p. 49-63.
221. Tesch, G.H. and T.J. Allen, Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 2007. 12(3): p. 261-6.
222. Rossini, A.A., et al., Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes*, 1977. 26(10): p. 916-20.
223. Parving, H.H., et al., Evolving strategies for renoprotection: diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001. 10(4): p. 515-22.
224. Knauf, F., et al., NALP3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy. *Kidney Int*, 2013. 84(5): p. 895-901.
225. Green, A., D.P. Bustillos, and R.I. Misbin, beta-Hydroxybutyrate increases the insulin sensitivity of adipocyte glucose transport at a postreceptor level. *Diabetes*, 1984. 33(11): p. 1045-50.
226. Tian, L., et al., Preliminary safety assessment of oridonin in zebrafish. *Pharm Biol*, 2019. 57(1): p. 632-640.
227. Xu, W., et al., Pharmacokinetic behaviors and oral bioavailability of oridonin in rat plasma. *Acta Pharmacol Sin*, 2006. 27(12): p. 1642-6.

228. Wang, W., et al., Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF- β signaling in kidney epithelium. *J Immunol*, 2013. 190(3): p. 1239-49.
229. Chung, H., et al., NLRP3 regulates a non-canonical platform for caspase-8 activation during epithelial cell apoptosis. *Cell Death Differ*, 2016. 23(8): p. 1331-46.
230. Smith, C.L., et al., Mouse Genome Database (MGD)-2018: knowledgebase for the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res*, 2018. 46(D1): p. D836-d842.
231. Becker, G.J. and T.D. Hewitson, Animal models of chronic kidney disease: useful but not perfect. *Nephrol Dial Transplant*, 2013. 28(10): p. 2432-8.
232. Mestas, J. and C.C. Hughes, Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 2004. 172(5): p. 2731-8.
233. Davis, M.M., A prescription for human immunology. *Immunity*, 2008. 29(6): p. 835-8.
234. von Herrath, M.G. and G.T. Nepom, Lost in translation: barriers to implementing clinical immunotherapeutics for autoimmunity. *J Exp Med*, 2005. 202(9): p. 1159-62.
235. McLellan, M.A., N.A. Rosenthal, and A.R. Pinto, Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2017. 7(1): p. 1-12.
236. Kim, Y.G., et al., The Role of Inflammasome-Dependent and Inflammasome-Independent NLRP3 in the Kidney. *Cells*, 2019. 8(11).
237. Krishnan, S.M., et al., Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Cardiovasc Res*, 2019. 115(4): p. 776-787.
238. Anders, H.J., Of Inflammasomes and Alarmins: IL-1 β and IL-1 α in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*, 2016. 27(9): p. 2564-75.
239. Shigeoka, A.A., et al., An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol*, 2010. 185(10): p. 6277-85.
240. Che, H., et al., Melatonin alleviates cardiac fibrosis via inhibiting lncRNA MALAT1/miR-141-mediated NLRP3 inflammasome and TGF- β 1/Smads signaling in diabetic cardiomyopathy. *Faseb j*, 2020. 34(4): p. 5282-5298.

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Hans-Joachim Anders und Herrn Professor Peter J. Nelson für die stetige und unermüdliche Betreuung der Doktorarbeit bedanken. Durch die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe durfte ich lernen, was es bedeutet, wissenschaftlich, experimentell zu arbeiten – etwas, das ich mir zuvor nie vorstellen konnte. Durch die Bearbeitung dieses Themas sowie die vielfältigen und anregenden Diskussionen habe ich Freude an der Wissenschaft gefunden – dafür bin ich Ihnen sehr dankbar. Ich habe gelernt, Sachverhalte zu hinterfragen und wortwörtlich auf Herz und Nieren zu untersuchen. Vielen herzlichen Dank für die Möglichkeit, dass ich die Ergebnisse auf zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen präsentieren und so einige Auszeichnungen erhalten durfte. Danke, dass Sie mir dieses Thema, das mir persönlich so am Herzen liegt, überlassen haben.

Ein riesiger Dank gilt Herrn Dr. Julian Marschner. Du hattest immer ein offenes Ohr für alle großen und kleinen Katastrophen - durch dich habe ich gelernt, was Frustrationstoleranz wirklich bedeutet – ohne dich wäre das Projekt schlichtweg nicht realisierbar gewesen. Vielen lieben Dank auch an Frau Dr. Manga Motrapu, die mich an die Thematik und Methodik herangeführt hat und mir immer tatkräftig zur Seite stand, Herrn Professor Christoph Walz, der stets Ansprechpartner bei Fragen zu histologischen Auswertungen war und Tâmisä Honda, für die Unterstützung bei der Isolierung der Glomeruli.

Weiterhin möchte ich mich beim gesamten Laborteam, explizit bei Frau Janina Mandelbaum, Anna Anfimiadou (Histologie) und Yvonne Minor (Tierpflege) für die stetige Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt auch der Ludwig-Maximilians-Universität für die Aufnahme und Förderung im FöFoLe-Programm.

Für die stetige Motivation und die ehrlichen Worten, wann immer ich sie eingefordert habe, möchte ich mich bei Herrn Dr. Thorsten Siegmund von ganzem Herzen bedanken.

Mein abschließender Dank gilt meinen Eltern, Frau Dr. Daniela Kunte und Herrn Professor Christian Kunte, die immer an mich geglaubt haben und den Weg zu einer Dissertation in meiner Kindheit geebnet haben.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Kunte, Sophie Carina

Name, Vorname

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

**Die Rolle des NLRP3 Inflammasoms in Podozyten bei der strukturellen
Anpassung an Diabetes-induzierte glomeruläre Hyperfiltration**

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.

München, 25.04.2024

Ort, Datum

Sophie Carina Kunte

Unterschrift Doktorandin