

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

Die Rolle der Makrophagen bei der chronischen Adeninkristall-induzierten Nephropathie

Dissertation

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

vorgelegt von

Nils Jonas Krüger

aus Heidelberg

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Stefanie Steiger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heiko Adler
Prof. Dr. Alexander Buchner

Mitbetreuung durch die
Promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Hans-Joachim Anders
PD Dr. Volker Vielhauer

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2024

Eidesstattliche Versicherung

Von Nils Krüger

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

Die Rolle der Makrophagen bei der chronischen Adeninkristall-induzierten

Nephropathie

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

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

Folgende Personen haben an der Durchführung dieser Arbeit mitgewirkt:

- Dr. Birgit Rathkolb, Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg
Sie hat die klinischen und hämatologischen Parameter im Blut und Serum der Versuchstiere gemessen.
- Janina Mandelbaum und Anna Anfimiadou, Abteilung für Nephrologie/Klinische Biochemie, LMU Klinikum München
Sie fertigten die histologischen Schnitte an und führten die Genotypisierung der Versuchstiere durch.

München, 11.05.2024

Ort, Datum

Nils Krüger

Nils Krüger

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2018 bis Juni 2019 in der Abteilung für Nephrologie/Klinische Biochemie der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Ludwig-Maximilians-Universitäts Klinikums durchgeführt. Die Arbeit wurde von Frau Priv.-Doz. Dr. Stefanie Steiger betreut.

Förderung des Projekts:

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

Mitbeteiligung an Veröffentlichungen:

Sellmayr M, Hernandez Petzsche MR, Ma Q, **Krüger N**, Liapis H, Brink A, Lenz B, Angelotti ML, Gnemmi V, Kuppe C, Kim H, Bindels EMJ, Tajti F, Saez-Rodriguez J, Lech M, Kramann R, Romagnani P, Anders HJ, Steiger S. Only hyperuricemia with crystalluria but not asymptomatic hyperuricemia drives progression of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2020 Dec; 31(12):2773-2792.

Vorträge oder Poster:

„Inhibition of p53 improves renal outcome in adenine crystal-induced nephropathy“, **Krüger N**, Anders HJ, Steiger S, *European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Congress*. Poster Präsentation in Budapest, Ungarn 06/2019

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung		VIII
Abstract	XI	
Abkürzungsverzeichnis		XIII
1 Einleitung		1
1.1 Die chronische Niereninsuffizienz		1
1.2 Kristall-induzierte Nierenerkrankungen		3
1.2.1 Die Nephrokalzinose	4	
1.2.2 Die Chronische Uratnephropathie		6
1.2.3 APRT-Defizienz und die chronisch kristalline Nephropathie	7	
1.3 Pathomechanismen der chronischen Kristall-induzierten Nephropathien		9
1.3.1 Kompartimente der intrarenalen Schäden		9
1.3.2 Nierenverletzung und persistierende Entzündungsreaktion	10	
1.3.3 Molekulare Mechanismen der Fibrose	11	
1.4 Die Rolle der Makrophagen bei chronischer Niereninsuffizienz		13
1.4.1 Makrophagen Phänotypen		13
1.4.2 Die Rolle der Makrophagen bei Kristall-induzierten Nephropathien	15	
1.4.3 Die Rolle von p53 bei Niereninsuffizienz und in Makrophagen		18
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit		21
2 Material		23
2.1 Tierhaltung		23
2.2 Geräte und Materialien	27	
2.3 Chemikalien		30
2.4 Zytokine und Inhibitoren		33
2.5 Murine Antikörper für Durchflusszytometrie		33
2.6 Primer für die qRT-PCR	34	
2.7 Sonstige Materialien		35
2.8 Software		36
3 Methoden		37
3.1 Tierexperimentelle Methoden		37
3.1.1 Tierversuchsvorhaben	37	
3.1.2 Versuchstiere		37

3.1.3 Genotypisierung	37
3.1.4 Tierhaltung	39
3.1.5 Mausmodell einer 2-8-DHA-Nephropathie und CKD	41
3.1.6 Intravenöse Injektion	41
3.1.7 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate	42
3.1.8 Urinabnahme	44
3.1.9 Blutabnahme	44
3.1.10 Entnahme und Probenvorbereitung der Nieren	45
3.2 Molekularbiologische Methoden	46
3.2.1 Isolierung der Gesamt RNA	46
3.2.2 Reverse Transkriptase PCR	47
3.2.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-qPCR)	49
3.3 Histologische Nachweismethoden	51
3.3.1 Formalin-Fixierung und Paraffineinbettung	51
3.3.2 Histochemische und immunhistochemische Färbungen	52
3.3.3 Histopathologische Befundung	55
3.4 Biochemische Methoden	56
3.4.1 Kreatinin Bestimmung	56
3.4.2 BUN Bestimmung	57
3.4.3 Zelltodbestimmung mittels Laktatdehydrogenase-Reaktion	57
3.5 Immunologische Methoden	58
3.5.1 Durchflusszytometrie	58
3.5.2 Enzymimmunoassay (ELISA)	63
3.6 Zellkultur Methoden	64
3.6.1 Isolation von Knochenmarkszellen	65
3.6.2 <i>In vitro</i> Differenzierung von Makrophagen	65
3.6.3 Stimulation von Makrophagen	65
3.7 <i>In chemico</i> Herstellung von Adeninkristallen	66
3.8 Statistische Auswertung	67
4 Ergebnisse	68
4.1 Effekt von Adeninkristallen auf die Funktionen von Makrophagen <i>in vitro</i>	68
4.1.1 Exposition von <i>in vitro</i> kultivierten Makrophagen mit Adeninkristallen verändert das kontrollierte Zellzyklusverhalten der Zellen	72

4.2 Mausmodelletablierung zur Adeninkristall-induzierten Nephropathie	75
4.2.1 Serum- & Differentialblutbildanalysen im Mausmodell der Adenin-Diät	80
4.2.2 Adenin-Diät verursacht eine CKD-charakteristische Nierenschädigung	85
4.2.3 Renale Inflammation infolge der Adeninkristall-induzierten Nephropathie	88
4.2.4 Adenin-induzierte Infiltration von Makrophagen in das geschädigte Nierengewebe	89
4.2.5 Fibrotischer Umbau infolge der Adeninkristall-induzierten Nephropathie	93
4.3 Auswirkungen der Adenin-Diät in einem Mausmodell mit Leukozyten-spezifischem p53-Knock-Out	95
5 Diskussion	105
5.1 Überblick	105
5.1.1 Adeninkristalle induzieren eine Entzündungsreaktion und die Differenzierung von proinflammatorischen M1-ähnlichen als auch alternativ aktivierten M2-ähnlichen Makrophagen <i>in vitro</i>	108
5.1.2 Renale Adeninkristalle induzierten eine chronische Niereninsuffizienz	111
5.1.3 Leukozyten-spezifische Defizienz von p53 verschlechtert die Folgen der Adeninkristall-induzierten Nephropathie	113
5.2 Limitationen der Studie	116
5.3 Zusammenfassung und Ausblick	117
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	120
Literaturverzeichnis	123
Lebenslauf	130
Danksagung	132

Zusammenfassung

Die 2,8-Dihydroxyadenin (2,8-DHA)-Nephropathie ist eine seltene Erkrankung, die ausschließlich die Nieren betrifft und zum chronischen Verlust der Nierenfunktion führt. Sie tritt bei Patienten mit Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT)-Gendefekten auf, einer seltenen Erkrankung, bei der die Diagnose oft nicht oder erst sehr spät gestellt wird. Im Fall des resultierenden APRT-Enzymdefektes wird Adenin durch die Xanthinoxidase zu 2,8-Dihydroxyadenin (2,8-DHA) oxidiert. Da es sich hierbei um eine äußerst schlecht lösliche Verbindung handelt, kommt es zur Auskristallisation im Urin und folglich zu Urolithiasis und einer chronischen kristallinen Nephropathie. Allerdings sind die Pathomechanismen der Adeninkristall-induzierten Nephropathie erst wenig verstanden, insbesondere in Bezug auf mögliche Gemeinsamkeiten mit anderen chronischen Kristall-induzierten Nephropathien und die Rolle der beteiligten Makrophagen.

Da gemeinsame pathologische Mechanismen wie die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und Nekroptose für die meisten Kristallopathien verantwortlich sind, wurde in dieser Arbeit zuerst der Effekt von Adeninkristallen auf *in vitro* differenzierte Makrophagen bezüglich Immunaktivierung, Phänotyp-Differenzierung, Zytotoxizität und Auswirkung auf den Zellzyklus untersucht. Nach Priming der differenzierten Makrophagen und Inkubation mit Adeninkristallen konnte eine signifikant erhöhte transkriptionelle Expression der proinflammatorischen Zytokine *Tnf- α* und *Il-6* detektiert werden, im Fall von IL-6 auch auf Proteinebene nach Sekretion ins Kulturmedium. Außerdem wurde die Differenzierung in proinflammatorische M₁-ähnliche und alternativ aktivierte M₂-ähnliche Makrophagen begünstigt. Längere Inkubationen mit Adeninkristallen (acht bzw. 18 Stunden) verstärkten die Expression von *Il-6* und *Arginase1*. Eine zytotoxische Wirkung von Adeninkristallen auf Makrophagen konnte ebenso nachgewiesen werden. Zudem zeigen die Ergebnisse vermehrt Kristall-aktivierte Makrophagen in der G₂/M Zellzyklusphase. Nach erfolgreicher Inhibierung von p53 durch Pifithrin- α reduzierte sich dagegen der Anteil der Makrophagen in dieser Zellzyklusphase.

Im zweiten Hauptprojekt dieser Arbeit wurde ein innovatives Mausmodell für eine Adeninkristall-induzierte Nephropathie etabliert, das durch Fütterung mit abwechselnd 0,2% bzw. 0,15% Adenin in 14-tägigen Zeitblöcken eine chronische Nephropathie innerhalb von 49

Tagen induzierte. Diese war durch einen moderaten, aber kontinuierlichen Verlust der Nierenfunktion, insbesondere dem der glomerulären Filtrationsrate (GFR), massive Kristall-Ablagerungen im Nierenkortex und der Medulla und tubuläre Verletzungen gekennzeichnet. Außerdem zeigten sich deutliche Anzeichen einer renalen Entzündungsreaktion und Fibrose. Es wurde überwiegend die Aktivierung von proinflammatorischen M₁-ähnlichen Makrophagen im geschädigten Nierengewebe detektiert, während die Zunahme von M₂-ähnlichen Makrophagen deutlich weniger ausgeprägt war. Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die hier entwickelte Adenin-Diät im Mausmodell die Ausbildung einer chronischen Kristallopathie induziert, die vergleichbare Merkmale mit der funktionellen und strukturellen Progression der 2,8-DHA-Nephropathie bei genetisch-bedingter menschlicher APRT-Defizienz aufweist und die Relevanz dieses Tiermodells somit bestätigt.

Da bekannt ist, dass p53 eine Rolle bei der Pathogenese von Nierenerkrankungen spielt und insbesondere die Funktionen und Differenzierung von Makrophagen beeinflusst, wurde schließlich anhand des etablierten Mausmodells die Rolle dieses zentralen Transkriptionsfaktors in myeloischen Zellen bei der Adeninkristall-induzierten chronischen Nephropathie untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten Tiere mit Leukozyten-spezifischer p53-Defizienz eine signifikant reduzierte Nierenfunktion, manifestiert durch erhöhte IL-6 Expression und verstärkte renale Infiltration von ERHR₃-positiven Makrophagen. Außerdem war in p53 k/o Mäusen im Vergleich zum Wildtyp die *iNos* Expression signifikant reduziert, während die von *Arginase1* signifikant erhöht war. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass durch p53 die Differenzierung der Makrophagen in pro- bzw. anti-inflammatorische Phänotypen verändert wird. Am Ende der Versuchsreihe (Tag 49) wurde im Vergleich zu Tiergruppen mit Normaldiät bei beiden Mausgruppen mit Adenin-Diät erneut eine Nierenschädigung mit fibrotischem Umbau des Gewebes festgestellt. Die Leukozyten-spezifische p53-Defizienz wirkte sich jedoch nicht gravierend auf die terminale morphologische Nierenschädigung aus und führte sogar zu einer signifikant reduzierten Fibronectin-Expression. Diese Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass p53 in Leukozyten möglicherweise eine renoprotektive Rolle bei einer Adeninkristall-induzierten Nephropathie spielt, indem es das Migrationsverhalten von Immunzellen und die Funktionen der Tubulus-Epithelzellen beeinflusst.

Abstract

2,8-Dihydroxyadenine (2,8-DHA) nephropathy is a rare disease that exclusively affects the kidneys and leads to chronic loss of kidney function. It occurs in patients with adenine phosphoribosyltransferase (APRT) gene defects, a rare condition that is often undiagnosed or diagnosed very late. In the case of the resulting APRT enzyme defect, adenine is oxidized by xanthine oxidase to 2,8-dihydroxyadenine (2,8-DHA). As this is an extremely poorly soluble compound, crystallization occurs in the urine, leading to urolithiasis and chronic crystalline nephropathy. However, the pathomechanisms of adenine crystal-induced nephropathy are poorly understood, especially with regard to possible similarities with other chronic crystal-induced nephropathies and the role of the macrophages involved.

Since common pathological mechanisms such as activation of the NLRP3 inflammasome and necroptosis are responsible for most crystallopathies, the effect of adenine crystals on *in vitro* differentiated macrophages in terms of immune activation, phenotype differentiation, cytotoxicity and impact on the cell cycle was first investigated in this work. After priming of differentiated macrophages and incubation with adenine crystals, a significantly increased transcriptional expression of the proinflammatory cytokines *Tnf- α* and *Il-6* was detected, in the case of IL-6 also at protein level after secretion into the culture medium. In addition, differentiation into proinflammatory M1-like and alternatively activated M2-like macrophages was favored. Longer incubations with adenine crystals (eight or 18 hours) increased the expression of *Il-6* and *Arginase1*. A cytotoxic effect of adenine crystals on macrophages was also demonstrated. In addition, the results show increased crystal-activated macrophages in the G2/M cell cycle phase. After successful inhibition of p53 by pifithrin- α , however, the proportion of macrophages in this cell cycle phase was reduced.

In the second main project of this thesis, an innovative mouse model for adenine crystal-induced nephropathy was established, which induced chronic nephropathy within 49 days by feeding alternating 0.2% and 0.15% adenine in 14-day blocks. This was characterized by a moderate but continuous loss of renal function, especially glomerular filtration rate (GFR), massive crystal deposition in the renal cortex and medulla and tubular injury. There were also clear signs of a renal inflammatory reaction and fibrosis. The activation of proinflammatory M1-like macrophages was predominantly detected in the damaged renal tissue, whereas the increase of M2-like macrophages was much less pronounced. In summary, it can be

concluded that the adenine diet induces the development of chronic crystallopathy in mice, which has comparable features to the functional and structural progression of 2,8-DHA nephropathy in genetically determined human APRT deficiency, thus confirming the relevance of this animal model.

Since it is known that p53 plays a role in the pathogenesis of renal diseases and in particular influences the functions and differentiation of macrophages, the role of this central transcription factor in myeloid cells in adenine crystal-induced chronic nephropathy was finally investigated using the established mouse model. Compared to wild type mice, animals with leukocyte-specific p53 deficiency showed significantly reduced kidney function, manifested by increased IL-6 expression and increased renal infiltration of ERHR3-positive macrophages. In addition, *iNos* expression was significantly reduced in p53 k/o mice compared to wild type, while *Arginase1* expression was significantly increased. In summary, these results indicate that p53 alters the differentiation of macrophages into pro- and anti-inflammatory phenotypes. At the end of the test series (day 49), kidney damage with fibrotic remodeling of the tissue was again observed in both mouse groups on the adenine diet compared to animal groups on the normal diet. However, the leukocyte-specific p53 deficiency did not have a serious effect on the terminal morphological kidney damage and even led to a significantly reduced fibronectin expression. Taken together, these results suggest that p53 in leukocytes may play a renoprotective role in adenine crystal-induced nephropathy by influencing immune cell migration behavior and tubule epithelial cell functions.

Abkürzungsverzeichnis

ADA	Adenosindesaminase
AK	Antikörper
AKI	akutes Nierenversagen (<i>Acute Kidney Injury</i>)
APRT	Adenin-Phosphoribosyltransferase
AMP	5-Adenosinmonophosphat
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
Arg1	Arginase 1
ASC	Proteinkomponente des Inflammasoms
ATP	5-Adenosintriphosphat
BMMs	<i>Bone Marrow-derived Macrophages</i>
BUN	<i>Blood Urea Nitrogen</i>
c-Adeninkommerzielle	(<i>commercial</i>) Adeninkristalle
CAMs	<i>Crystal Adhesion Molecules</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CKD	chronische Niereninsuffizienz (<i>Chronic Kidney Disease</i>)
CSF-1	<i>Colony Stimulating Factor 1</i>
CT-Wert	<i>Cycle Threshold</i> -Wert
DAB	Diaminobenzidin
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DC	<i>Dendritic Cells</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonukleinsäure-spezifische Nuclease
dNTP	desoxy-Ribonukleosidtriphosphate
DHA	Dihydroxyadenin
DPBS	Phosphatpuffer (<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ESKD	<i>End-Stage Kidney Disease</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)

FBS	Fetales Bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Maß für Zentrifugalkraft
G ₀ -Phase	Zellzyklusphase der Quieszenz
G ₁ -Phase	Gap ₁ -Phase
G ₂ -Phase	Gap ₂ -Phase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HE	Hämatoxylin Eosin
Hedgehog	Signalprotein & lokales Morphogen eines Signaltransduktionsweg
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMP	Inosinmonophosphat
LPS	Lipopolysaccharid
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
KG	Körpergewicht
KO	Gendeletion (<i>Knock Out</i>)
KIM-1	<i>Kidney Injury Molecule-1</i>
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
i.v.	intravenös
LDH	Lactatdehydrogenase
loxP	locus of X-over of P ₁
LPS	Lipopolysaccharid
M ₁	klassisch-aktivierte Makrophagen
M ₂	alternativ-aktivierte Makrophagen
MDM ₂	<i>Mouse Double Minute 2 homolog</i>
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotid(hydrogen)phosphat
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NGAL	<i>Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin</i>
NLRP ₃	Proteinkomponente des Inflammasoms
nm	nanometer
p53	codiertes Protein des <i>TP53</i> -Tumorsuppressor-Gens

p21	Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen
PAS	Periodsäure-Schiff
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	potentia hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PNP	Purinnukleosidphosphorylase
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
PS	Penicillin/Streptomycin
qRT-PCR	Quantitative <i>Real Time PCR</i>
RIPs	Rezeptor-interagierende Proteine
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinsäure-spezifische Nuclease
RGB	<i>Red Green Blue</i>
RM	<i>Resident Macrophages</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S-Phase	Zellzyklusphase der Replikation
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
sm-Adenin	selbst hergestellte (<i>self made</i>) Adeninkristalle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit
U/min	Umdrehungen/Minute
UV	Ultraviolett
vol	Volumen
Wnt	Ligand in einem konservierten Signaltransduktionsweg
XO	Xanthinoxidase
z. A.	zur Analyse

1 Einleitung

1.1 Die chronische Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz (*chronic kidney disease*, CKD) ist durch eine fortlaufende Nierenschädigung gekennzeichnet, die sich an der dauerhaften Einschränkung der Nierenfunktion über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten widerspiegelt [1]. Da die CKD als Systemerkrankung den gesamten Körper betrifft und gravierende Folgen für verschiedenste Organsysteme besitzt [2], stellt sie langfristig ein großes gesundheitliches Problem mit hoher Morbidität und Mortalität dar. Die CKD ist zudem ein globales Gesundheitsproblem, das einen großen Teil der Weltbevölkerung, durchschnittlich 10 bis 15 % der Menschheit, betrifft und zukünftig weiter ansteigen wird [3]. Auch in Deutschland ist die CKD eine weit verbreitete Krankheit mit Prävalenz bei etwa 10 % der Bevölkerung im Alter von ≥ 40 Jahren [4]. Etablierte Indikatoren für eine CKD stellen das Absinken der glomerulären Filtrationsrate (GFR) auf Werte von unter $60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ dar sowie erhöhte Werte von Albumin im Urin (ab ca. 30 mg/g und aufsteigend) (Albuminurie) [1]. Während die GFR die exkretorische Nierenfunktion widerspiegelt, reflektiert die Albuminurie die erhöhte Permeabilität der Niere. Der Schweregrad der CKD und die entsprechende Prognosegruppe wird entsprechend der Richtlinien der KDIGO (kidney disease improving global outcomes) in vier unterschiedlichen Kategorien hinsichtlich GFR und Albuminuria definiert. Diese sind in Abbildung 1 dargestellt.

				Anhaltende Albuminurie-Kategorien		
				Beschreibung und Bereich		
				A1	A2	A3
Prognose von CKD nach GFR- und Albuminurie-Kategorien: KDIGO 2012				Normal bis leicht erhöht	Mäßig erhöht	Stark erhöht
				<30 mg/g <3mg/mmol	30–300 mg/g 3–30mg/mmol	>300 mg/g >30mg/mmol
GFR-Kategorien (ml/min pro 1,73 m ²) Beschreibung und Bereich	G1	Normal oder hoch	≥90			
	G2	Leicht vermindert	60–89			
	G3a	Leicht bis mäßig vermindert	45–59			
	G3b	Mäßig bis stark vermindert	30–44			
	G4	Stark vermindert	15–29			
	G5	Nierenversagen	<15			

Abbildung 1: Richtlinien der KDIGO in Abhängigkeit von GFR und Albuminurie. Gelb, geringes Risiko (wenn keine anderen Marker für Nierenerkrankungen, keine CKD); grün, mäßig erhöhtes Risiko; blau, hohes Risiko; lila, sehr hohes Risiko. Adaptiert nach J. H. de Boer [5]

Der moderne, westliche Lebensstil, der sich vor allem in ungesunder Ernährung, Bewegungsmangel, Rauchen und Alkoholkonsum ausdrückt, wird als direkte Ursache für erhöhten Blutdruck, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Adipositas, akutes Nierenversagen (*acute kidney injury*, AKI) und Diabetes mellitus Typ 2 angesehen [6, 7]. Diese Erkrankungen wiederum sind Hauptrisikofaktoren und Ursachen für eine sich entwickelnde CKD. Hypertension ist eng verknüpft mit verschiedenen Ursachen der CKD. Im Verlauf der schwindenden Funktion der Niere steigt der Blutdruck, was wiederum die Nierenfunktion weiter verschlimmert [8]. Im Jahr 2000 wurden mehr als 25% der erwachsenen Population mit einem erhöhten Blutdruck diagnostiziert, für 2025 erwartet man eine Zunahme auf 60% [9]. Der Schweregrad der Hypertension korreliert direkt mit dem Endstadium der Nierenerkrankung (*end-stage kidney disease*, ESKD), das durch eine Nierenleistung von 15% oder weniger der Norm gekennzeichnet ist und eine Nierenersatztherapie in Form der Dialyse oder eine Nierentransplantation unerlässlich macht [10]. In einer Studie mit CKD Patienten zeigte sich eine 86%-ige Häufigkeit der Hypertension im Gegensatz zu lediglich 29% in der Gesamtpopulation [11]. Auch Adipositas stellt ein deutlich erhöhtes Risiko dar, an CKD zu

erkranken [12], und begünstigt die chronischen Erkrankungen wie Diabetes, Hypertension und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Man weiß insbesondere, dass Adipositas häufig Ursache von Diabetes Typ 2 und der diabetischen Nephropathie darstellt [13], die im Gefolge der diabetischen Stoffwechsellage in den Nieren entstehen kann. Adipöse Menschen, die einen hohen Salz- und Proteinkonsum aufweisen, zeigen erhöhte oxidative Stresslevel, Nierenschädigungen und abnehmende glomeruläre Auto-Regulation [14].

Heute weiß man, dass AKI und CKD eng miteinander verbunden sind [15, 16]. Beide Übergänge wurden durch klinische und experimentelle Studien intensiv untersucht [17]. Einerseits trägt das AKI zur Entwicklung und Fortschreiten der CKD bei. In einer Metaanalyse wurde z. B. nachgewiesen, dass Patienten mit AKI im Vergleich zu Patienten ohne AKI ein deutlich höheres Risiko für die Entwicklung von CKD und ESKD sowie eine höhere Sterblichkeit aufweisen [18]. Eine andere klinische Studie wies nach, dass bei 29% der Patienten mit elektiven Herzoperationen und kardiopulmonalem Bypass ein AKI auftrat; die Hälfte dieser Patienten mit AKI entwickelte anschließend eine CKD [19]. Umgekehrt ist auch die CKD ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer AKI. So wurde z. B. in einer Meta-Analyse gezeigt, dass CKD ein Risikofaktor für die Entwicklung eines AKI bei Patienten mit Diabetes oder Bluthochdruck ist [20] und dass die CKD ein unabhängiger Risikofaktor für AKI bei Patienten mit größeren Herzoperationen ist [21].

1.2 Kristall-induzierte Nierenerkrankungen

Die Bildung von kristallinen Materialien ist ein Phänomen in allen biologischen Systemen und die exakte Regulation der Erzeugung ist elementar für physikalische, chemische und biologische Prozesse. Die irreguläre, pathologische Bildung und Anhäufung von körpereigenen und exogenen Substanzen kann jedoch zu Ablagerungen von kristallinen Materialien im menschlichen Körper führen und ist ein typisches und häufiges Kennzeichen verschiedener Stoffwechsel- und Entzündungserkrankungen. Eine unkontrollierte Kristallbildung kann beispielsweise Nierenschäden hervorrufen, die in renovaskuläre Schäden, tubuläre Schäden sowie Urolithiasis eingruppiert werden [22-24]. Zu den Gefäßkristallopathien zählen die Cholesterin-Embolie und die atherosklerotische Nierenarterienstenose. Diese Erkrankungen werden durch Cholesterinkristalle hervorgerufen, die aus atherosklerotischen Plaques hervorgehen [25]. Die große Gruppe der tubulären Kristallopathien können durch Ablagerungen aus Mineralien, Proteinen oder

Arzneimitteln verursacht werden. Dazu zählen beispielsweise die Paraprotein-induzierte Kristallnephropathie (auch Monoklonale Leichtkettenguss-Nephropathie genannt) [26]. Auch viele diätische Inhaltstoffe (insbesondere Oxalat, Natrium, Fruktose, Vitamin C, Saccharose) sowie Medikamente können in Kristallform ausfallen [27]. Die Kristallbildung von pharmakologischen Wirkstoffen erfolgt häufig im distalen Tubulus der Niere, da dies der Hauptort der Protonensekretion ist. Der Proteasehemmer Atazanavir, eines der wichtigsten Medikamente, das in der antiretroviralen Kombinationstherapie gegen HIV eingesetzt wird, kann in Form von nadelförmigen Kristallen im Urin und im interstitiellen Nierengewebe ausfallen [28]. Im Folgenden werde ich näher auf die Nephrokalzinose, die chronische Uratnephropathie, und die Adeninkristall-induzierte Nephropathie eingehen.

1.2.1 Die Nephrokalzinose

Als mengenmäßig häufigstes Element ist Kalzium ein wesentlicher Bestandteil im Menschen und vielen Tieren. Die wichtigsten Kalzium-Mineralisierungsprodukte (Knochen, Zahnschmelz, Dentin) werden durch exakt kontrollierte Mineralisierungsprozesse generiert. Eine gestörte Kalziummineralisierung führt dagegen zu pathologischen Zuständen, wie arthritischen Knorpeln, Herzklappenverkalkung und Zahnstein [27]. Nierensteine sind mineralische Kalzium- und Oxalat-Ablagerungen im Urin, die sich in den Nieren und im Nierenbeckenkelchsystem ansammeln. Mit Eintritt in den Harnleiter werden sie zu Harnleitersteinen und können dort schwere Koliken auslösen [23, 24]. Nierensteine bilden sich in der Regel, wenn der Urin bezüglich der darin vorliegenden Anionen und Kationen übersättigt wird [23, 27]. Dies geschieht, wenn das Gleichgewicht von gelösten Ionen und Lösungsmitteln im Urin gestört ist, entweder durch pH- oder ernährungsbedingte Veränderungen des Mineralstoffgehalts bzw. das Fehlen von Kristallisationsinhibitoren, wie Nephrocalcin, Osteopontin, Uropontin, und Tamm-Horsfall-Protein im Urin [29, 30]. Im distalen Nephron ist die Nierentubulusflüssigkeit mit Kalziumoxalat übersättigt, so dass dieses Mineral entweder -primär- als Kalziumoxalat-Monohydrat oder als Kalziumoxalat-Dihydrat auskristallisiert. Neben dem anorganischen Hauptbestandteil Kalziumoxalat-Monohydrat (mit unterschiedlichen Anteilen an Kalziumphosphat) enthalten Nierensteine auch geringe Mengen von eingebetteten renalen peroxidierten Proteinen [31]. Man vermutet, dass diese als Haftbrücken zwischen den Kristallen dienen [32]. Nierensteine verlassen den Körper normalerweise über den Urinstrom. Häufig bilden sich viele kleinere

Kristalle (bis zu 5-10 Millimeter Durchmesser) und gehen über den Urether wieder ab, ohne Symptome zu verursachen. Wenn Nephrolithen jedoch diese Größe überschreiten und den Harnleiter oder das Nierenbecken blockieren, verursachen sie starke Nierenkoliken. Die Schmerzbekämpfung ist in der Regel die erste Maßnahme, gefolgt von entzündungshemmenden Medikamenten, was darauf hindeutet, dass auch Entzündungen eine Rolle spielen [27] (siehe 1.3.2).

Die Nephrokalzinose wird allgemein als Folge von diffusen Ablagerungen von Kalziumkristallen, bestehend aus Kalziumphosphat oder Kalziumoxalat, im Nierenparenchym angesehen [33]. Sie ist häufig die Folge einer gestörten Kalziumverarbeitung in den Nieren. Die Nephrokalzinose steht in engem Zusammenhang mit der Nephrolithiasis, da erhöhte Kalziumwerte im Urin (Hyperkalziurie) ein gemeinsames pathologisches Hauptmerkmal sind, das diesen klinischen Erscheinungen zugrunde liegt [34]. Man weiß, dass die medulläre Nephrokalzinose eine Folge der Hyperkalziurie ist. Diese entsteht entweder durch eine erhöhte Kalziumabsorption oder eine gestörte Kalziumrückresorption im Nierentubulus [33, 34]. Die Pathomechanismen sind bekannt: nach Schädigung der Tubuli durch die Kristalle kommt es zur Entzündungsreaktion, Nekrosen und schließlich einer interstitiellen Fibrose (siehe 1.3) [22, 23].

Eine Reihe von seltenen genetischen Erkrankungen in Verbindung mit Stoffwechselanomalien wurden beschrieben, die für die Entwicklung und das Fortschreiten der Nephrokalzinose prädisponieren [34]. Insbesondere Epithelzellen- und parazelluläre Störungen des Kalziumtransports, die zu einer Hyperkalziurie führen, scheinen die wichtigsten zu sein, zusammen mit einem Anstieg von Phosphat oder Oxalat und einer Abnahme der Citratausscheidung im Urin [33]. Obwohl monogenetische Ursachen selten sind [33], stellen die Erkrankungen eine erhebliche Last mit hoher assoziierter Morbidität dar, da viele Patienten eine CKD oder ein Nierenversagen im Endstadium (ESKD) entwickeln [34].

1.2.2 Die Chronische Uratnephropathie

Die Harnsäure ist das Endprodukt des menschlichen Purin-Stoffwechsels, da der Mensch im Laufe der Evolution das Enzym Urikase, welches die Harnsäure in die wasserlöslichere Verbindung Allantoin umwandelt, verloren hat. Ein Großteil der Harnsäure (ca. 70%) wird bei gesunden Personen über die Nieren ausgeschieden. Folglich kann neben Mutationen in

Harnsäuretransportproteinen eine eingeschränkte Nierenfunktion (CKD) zu einem erhöhten Harnsäurespiegel im Blut beitragen [35]. Inwiefern die asymptomatische Hyperurikämie (erhöhte Harnsäurespiegel) zur Progression einer CKD beiträgt, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert [36, 37]. Eine Reihe klinischer Studien, beispielsweise mit Harnsäure-senkender Therapie wie Allopurinol haben nun gezeigt, dass die asymptomatische Hyperurikämie nicht zur Progression der CKD beiträgt [5, 38]. Bestätigung für die klinischen Daten kommt von unserer Arbeitsgruppe. In einem innovativen Tiermodell zur asymptomatischen Hyperurikämie konnten wir in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Steiger kürzlich zeigen, dass eine asymptomatische Hyperurikämie weder einen Nierenschaden verursacht noch zur Progression einer bestehenden CKD beiträgt [39]. D.h. es besteht kein kausaler Zusammenhang zwischen asymptomatischer Hyperurikämie und der Progression einer CKD, so dass Behandlungsempfehlungen vermieden werden sollten.

Allerdings kann eine persistierende Hyperurikämie langfristig in eine symptomatische Hyperurikämie übergehen, wie z.B. bei Gichtarthritis, akuter Uratnephropathie und Urolithiasis [40]. Ursache dafür ist das Ausfallen von Harnsäurekristallen in der Niere und Gelenken. So kann neben physiochemischen Prozessen u.a. ein saurer pH-Wert des Urins, verursacht durch Diäten oder genetische Erkrankungen, nicht aber bei CKD im Allgemeinen, das Ausfallen von Harnsäurekristallen begünstigen [40]. Experimentelle Daten haben gezeigt, dass Harnsäurekristalle in der Niere einen Tubulusschaden verursachen, und letztlich zu einer chronischen Entzündung und interstitiellen Fibrose beitragen können [39]. Eine zugrundeliegende CKD begünstigt wiederum die Bildung von Harnsäurekristall-Granulomen, die folglich zur Progression der CKD beitragen, ein Krankheitsbild bekannt als chronische Uratnephropathie [41].

1.2.3 Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT)-Defizienz und die dadurch bedingte chronische kristalline Nephropathie

Die CKD ist häufig auch eine Folge von genetisch-bedingten Stoffwechselerkrankungen, bei denen es infolge der dauerhaft erhöhten Konzentration von bestimmten Mineralien oder Stoffwechselprodukten im Urin zu den oben beschriebenen Kristallablagerungen in der Niere kommt [23]. Die freien Purin- und Pyrimidinbasen entstehen beim Abbau der zellulären Nukleinsäuren, wie DNA und insbesondere RNAs mit höheren Halbwertszeiten über die Zwischenstufen ihrer entsprechenden Mononukleotide und Nukleoside, sowie nach der

enteralen Resorption der aufgenommenen pflanzlichen und tierischen Nahrungsstoffe im Interstitium. Da die *de novo* Biosynthese insbesondere von Purinbasen unter sehr hohem Energieaufwand erfolgt, gewährleisten Wiederverwertungsreaktionen durch sogenannte *Salvage Pathways*, dass die freien Purinbasen dem Organismus nicht verloren gehen [42]. Adenin, Hypoxanthin und Guanin werden hierbei durch zwei spezifische Enzyme, die Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT) und die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT), in die jeweiligen Mononukleotide umgewandelt. Somit katalysiert APRT die spezifische Umwandlung von Adenin und 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat in 5-Adenosinmonophosphat (AMP) und Pyrophosphat (Abbildung 2) [42]. Im Fall eines Defektes des Enzyms APRT wird Adenin alternativ durch die Xanthinoxidase (XO) zu 2,8-Dihydroxyadenin (2,8-DHA) über das Zwischenprodukt 8-Hydroxyadenin oxidiert (Abbildung 2). Da es sich bei 2,8-DHA allerdings um eine äußerst schlecht lösliche Verbindung handelt, kommt es hierbei zur Auskristallisation im Urin und folglich zu Urolithiasis und kristalliner Nephropathie [43, 44].

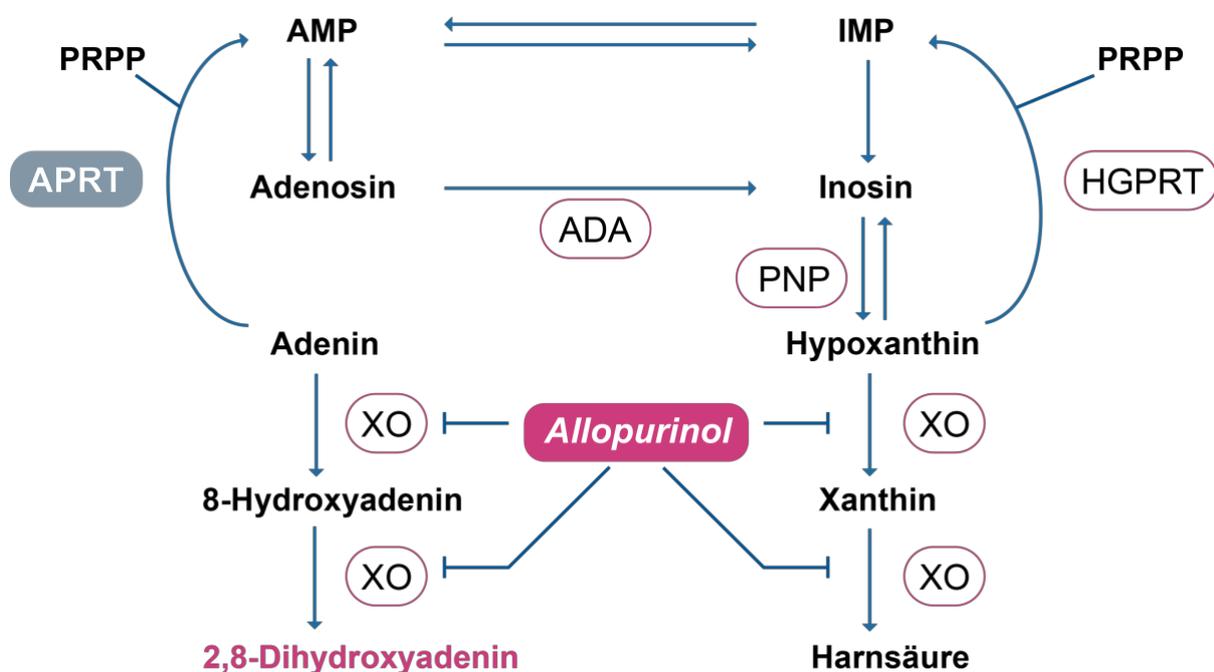


Abbildung 2: Stoffwechselweg für die Verwertung von Adenin beim Menschen bei fehlender APRT-Aktivität. Der alternative Weg der Oxidation durch Xanthinoxidase (XO) zu 2,8-DHA findet über das 8-Hydroxy-Zwischenprodukt statt, die der Herstellung von Harnsäure aus Hypoxanthin über Xanthin entspricht. Beim Menschen kann Adenin nicht durch Purinnukleosidphosphorylase (PNP) in Adenosin umgewandelt werden, wie Hypoxanthin in Inosin; der einzige alternative Weg ist die Oxidation. Der Ort der hemmenden Wirkung von Allopurinol auf die 2,8-DHA-Synthese ist ebenfalls angegeben. ADA, Adenosindesaminase; AMP,

Adenosinmonophosphat; HGPRT, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase; IMP, Inosinmonophosphat; PRPP, 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat.

Ein Defekt der APRT ist beim Menschen eine seltene, autosomal-rezessive Störung, die 1976 erstmals beschrieben wurde [45], mit einer geschätzten Prävalenz von 1 zu 50.000 bis 100.000 Personen [46, 47]. Das menschliche *arpt* Gen ist auf Chromosom 16q24 lokalisiert und besitzt eine Länge von ca. 2,6 Kilo-Basen mit fünf Exons [48]. Die der Krankheit zugrundeliegenden mutierten Allele sind heterogen mit mehr als 40 bekannten Mutationen und werden zwei Typen von ARPT-Defizienz zugeordnet, die sich in klinischer Präsentation und dem kompletten Enzymdefekt *in vivo* ähneln [43, 46, 49]. Analysiert man allerdings die ARPT-Enzymaktivität anhand von Zellextrakten der Patienten *in vitro*, ist der Typ I gekennzeichnet durch einen kompletten Aktivitätsverlust, während Typ II *in vitro* noch Restaktivität zeigt [50-52].

Nierensteine aus unlöslichem 2,8-DHA, die häufigste klinische Manifestation des APRT-Mangels, können in jedem Alter auftreten. Bei mindestens 50% der betroffenen Personen treten die Symptome erst im Erwachsenenalter auf und die Diagnose eines APRT-Mangels wird häufig erst spät infolge von tubulo-interstitiellen Schädigungen und deutlich eingeschränkter Nierenfunktion gestellt [46]. Ein Instrument der Diagnose ist die Identifizierung der typischen 2,8-DHA-Kristalle im Urin oder in der Nierenbiopsie [53]. In der Polarisationsmikroskopie erscheinen die Kristalle rund und rötlich-braun gefärbt mit dem charakteristischen Malteserkreuzmuster im Zentrum. Weiterhin zählt zur Diagnose der fehlende Nachweis einer APRT-Aktivität in den Erythrozyten sowie die genaue Charakterisierung des Gendefektes durch Genom-Sequenzierung. Aufgrund der enorm hohen Gefahr, dass Patienten mit APRT-Mangel akute Nierenschäden entwickeln und es zur fortschreitenden CKD oder Nierenversagen (Nierenerkrankung im Endstadium (ESKD) [54, 55] kommt, ist die frühzeitige Diagnose eines APRT-Mangels von wesentlicher Bedeutung. Der Gen- und Enzymdefekt kann durch die medikamentöse Therapie mit Allopurinol, einem Hemmer der Xanthinoxidase (Abbildung 2), wirksam verhindert werden [56]. Wenn keine angemessene Behandlung erfolgt, entwickeln etwa 20% bis 25% der betroffenen Patienten mit APRT-Defekt eine ESKD, in der Regel im Erwachsenenalter [49, 53].

1.3 Pathomechanismen der chronischen Kristall-induzierten Nephropathien

1.3.1 Kompartimente der intrarenalen Schäden

Bei Erkrankungen, die dazu führen, dass die Konzentration der oben beschriebenen Mineralien, Stoffwechselprodukte oder Proteine im Urin dauerhaft erhöht sind, können die sich anhäufenden Kristalle in vier verschiedenen intrarenalen Kompartimenten vorliegen und potentiell eine CKD verursachen [22-24]. Erstens, im proximalen Tubulus, wo es beispielsweise zur Anhäufung von 2,8-DHA oder kleinen Proteinen, wie die leichten Ketten der Immunglobuline, im glomerulären Filtrat kommt, die anschließend durch Phagozytose in den Endosomen der proximalen Tubuluszellen auskristallisieren können und dort zelluläre Schäden verursachen [23]. Zweitens, im distalen Tubulus, wo es zur Ansäuerung des Urins kommt, was insbesondere die Präzipitation der Harnsäure fördert. Außerdem kommt es dort durch die Sekretion von Kalzium zu verschiedenen Formen der Nephrokalzinose (siehe 1.2.1) [57]. Drittens, in den Sammelkanälen der Medulla, wo es durch die weitere Konzentrierung des Urins wiederum zu Ablagerungen kommen kann [58]. Eine für die Pathogenese erforderliche Ablagerung von Kristallen bzw. Präzipitaten benötigt allerdings deren spezifischer Adhäsion an die luminalen tubulären Zellmembranen [59], was durch Oberflächenmoleküle der Tubuluszellen vermittelt wird (z.B. CD44, Annexin II, Phosphatidylserin). Schließlich, viertens, im interstitiellen Kompartiment, wohin die Kristalle vom intra-tubulären Kompartiment durch den Prozess der Extratubulation umverlagert werden (siehe auch 1.4.2) [60, 61]. Dies erfolgt durch neu gebildete Tubulus-Epithelzellen, die Kristallaggregate im Tubulus-Lumen umhüllen, indem sie neue Basalmembranen an deren Kontaktoberflächen ausbilden. Anschließend lösen sich die tubulären Basalmembranen an den Kontakten auf, so dass die massiven Kristallablagerungen das interstitielle Kompartiment erreichen [60] (siehe 1.4.2).

1.3.2 Nierenverletzung und persistierende Entzündungsreaktion

In gesunden Nieren haben die Tubulusepithelzellen durch die Nieren-spezifische Expression von Uromodulin (Tamm-Horsfall-Protein) eine kristallabweisende Oberfläche, und die im Urin vorhanden Anionen, welche die Kristalloberflächen umhüllen, verhindern somit eine Zelladhäsion [62]. In Folge einer Kalziumkristall-induzierten Nierenerkrankung wurde allerdings beobachtet, dass ein früher und wesentlicher Schritt der Organschädigung darauf beruht, dass sich die Tubulus-Epithelzellen in Richtung eines "kristallbindenden" Phänotyps verändern, der durch Neuexpression verschiedener Zelloberflächenproteine, insbesondere von CD44 und TNF-Rezeptoren (TNFR), gekennzeichnet ist [63, 64].

Nach erfolgreicher Adhäsion induzieren Kristalle bzw. andere Molekül-Aggregate eine Verletzung und einen pro-inflammatorischen Phänotyp der Tubuluszellen. Dieser wird durch die Phagozytose der Kristalle ausgelöst, die kleiner als 10 µm sind. Die Phagosomen fusionieren mit Lysosomen, wo potentiell ein „Abbau“ der Kristalle stattfinden soll [65]. Durch den niedrigen lysosomalen pH-Wert werden beispielsweise Kalziumionen aus amorphem Kalziumphosphat freigesetzt, die dann ins Zytosol gelangen und den Prozess der Zellnekrose auslösen [66]. Die unverdaulichen lysosomalen Kristalle und Aggregate wirken destabilisierend auf die lysosomale Lipiddoppelschicht und bewirken die Freisetzung von lysosomalen Proteasen wie Cathepsin B ins Zytosol. Dieser Prozess aktiviert die regulierte Form der Nekrose (Nekroptose) der Tubuluszellen und führt zu erheblichem Zellstress, erkenntlich an der Depolymerisation des Aktin-Cytoskeletts, der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und einer verstärkten Autophagozytose [67]. Die durch Kalziumoxalat-, Kalziumphosphat-, oder Harnsäure-Kristalle getriggerte Form der Nekroptose ist ein gut definiertes Programm des Zelltods [68, 69]. Ausgelöst durch extrinsische Stimuli wie Kristalle, wird der Signalweg eingeleitet durch Bindung von TNF-alpha an TNFR₁, Rekrutierung des TNFR-bindenden Proteins TRADD und TRAF₂, die wiederum über die Rezeptor-interagierenden Proteine (RIP)-Kinase-1 und (RIP)-Kinase-3 zu weiteren Phosphorylierungen, wie beispielsweise der Pseudokinase MLKL führen und schließlich die regulierte Nekrose einleiten. Die nekrotischen Röhrenzellen setzen dann sogenannte schadensassoziierte molekulare Muster (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*) (bestehend u.a. aus Histonen, DNA, RNA, Harnsäure und dem Nukleoprotein HMGB₁) frei, die über die Vermittlung von Zellen des angeborenen Immunsystems die renale Entzündung auslösen [70, 71].

Die Entzündungsreaktion entsteht im Zusammenspiel mit dendritischen Zellen und Makrophagen (siehe 1.4.2), welche die im interstitiellen Kompartiment vorhandenen Kristalle ebenfalls phagozytieren. Durch lysosomale Destabilisierung werden auch in diesen Zellen Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt, die über Vermittlung und Aktivierung des NLRP₃-Inflammasoms die Reifung und Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Lipidmediatoren und somit die Entzündungsreaktion in der Niere induzieren. Inflammasome sind zytosolische Multiproteinkomplexe des angeborenen Immunsystems, die nach Assemblierung für die Aktivierung der Entzündungsreaktion verantwortlich sind [72]. Das NLRP₃-Inflammasom besteht aus den Proteinen NLRP₃, ASC

und der entzündungsfördernden Caspase-1, die die Vorläuferformen der pro-entzündlichen Interleukine IL-1beta und IL-18 in ihre jeweiligen reifen Versionen steuert. Ein weiteres Substrat stellt Gasdermin-D dar, das nach proteolytischer Reifung unter anderem für die Sekretion der maturierten Zytokine, vermutlich durch Porenbildung innerhalb der Plasmamembran, verantwortlich ist [73]. Neuere Studien zeigen, dass Inflammasom-Komponenten auch in verschiedenen epithelialen Geweben exprimiert werden, wo sie eine wichtige Rolle in der ersten Verteidigungsfront spielen [72].

1.3.3 Molekulare Mechanismen der Fibrose

Nach Schädigung der tubulären Epithel- und Endothelzellen und der darauffolgenden Entzündungsreaktion ist schließlich der Prozess der interstitiellen Fibrose die pathologische Fortsetzung des Wundheilungsprozesses in der Niere, welcher durch Aktivierung und Migration von Myofibroblasten eingeleitet wird und durch Matrixablagerungen und Gewebeumbau gekennzeichnet ist (Abbildung 3) [74].

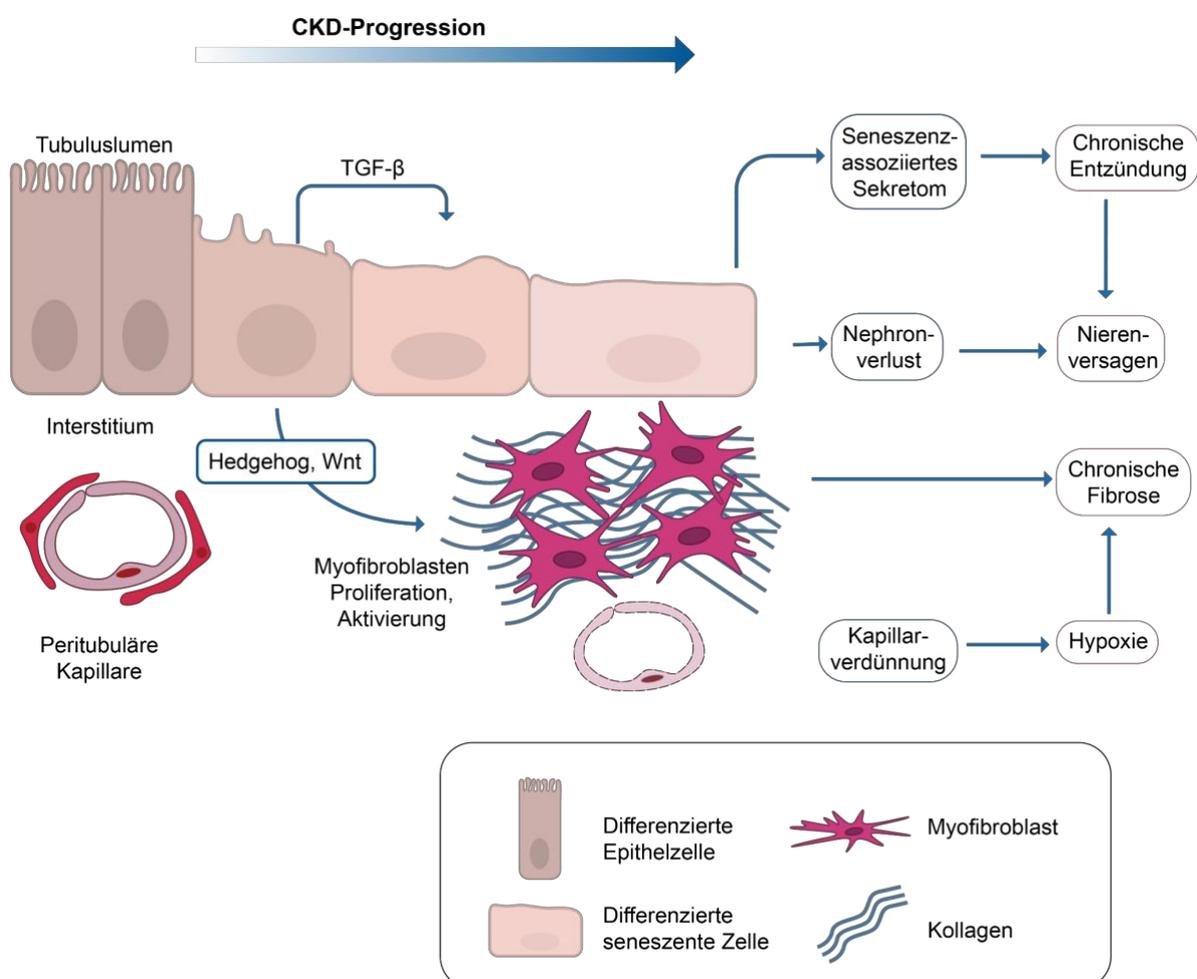


Abbildung 3: Kritische Zellen und Signalwege, die bei fortschreitender chronischer Nierenerkrankung (CKD) aktiviert werden. Kritische Zellen und Signalwege, die bei fortschreitender chronischer Nierenerkrankung (CKD) durch zelluläre Schädigung des Epithel- bzw. Endothelkompartiments aktiviert werden und zum Stillstand des epithelialen Zellzyklus, zur Seneszenz und einer verstärkten Entzündung führen. Die miteinander verknüpften Prozesse bewirken letztlich den Verlust von Nephronen, eine interstitielle Fibrose und Nierenversagen. Adaptiert nach Humphreys et al. [74]

Die tubulointerstitielle Fibrose ist durch eine Ansammlung von Narben innerhalb des Nierenparenchyms gekennzeichnet und stellt den Endprozess fast aller chronischen und progressiven Nephropathien dar. Tatsächlich ist die Ausdehnung des kortikalen interstitiellen Gewebes der beste histologische Indikator für die Verschlechterung der Nierenfunktion bei einer CKD [75]. Nach einer leichten Verletzung kann die Ablagerung von fibrotischen Matrixproteinen den Prozess der Gewebereparatur zunächst unterstützen und die Matrix wird während der Gewebereparatur wieder resorbiert. Bei chronischen Verletzungen des Epithels und anhaltender Entzündung, wie im Verlauf der CKD, dauert die Sekretion von fibrotischen Matrixproteinen unkontrolliert an. Dies erfolgt durch die Hochregulierung verschiedener Signalwege in epithelialen Zellen. Die Epithelzellen sezernieren Signalmoleküle wie Hedgehog- und Wnt-Liganden, die auf interstitielle Perizyten und mesenchymale stammzellähnliche Zellen einwirken, was zu einer Differenzierung und Proliferation von Myofibroblasten führt [76]. Durch Aktivierung und Migration der Myofibroblasten lässt sich somit die erhöhte Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen und die damit einhergehende Ausdehnung des Raums zwischen der tubulären Basalmembran und den peritubulären Kapillaren erklären. Bei der Nierenfibrose ist das am häufigsten vorkommende Matrixprotein Kollagen 1; es können sich aber auch andere Kollagene sowie das adhäsive Glykoprotein Fibronectin ablagern [77]. Der fibrotische Umbau wiederum führt zu einer peritubulären Ausdünnung der Kapillaren und einer anhaltenden Hypoxie [78]. Die chronische tubuläre Schädigung verursacht die Blockierung des epithelialen Zellzyklus und führt zur Zellseneszenz, was mit der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen einhergeht, die die Entzündung weiter verstärken [79]. Diese stark miteinander zusammenhängenden Prozesse führen letztlich zum Verlust von Nephronen, zu einer anhaltenden interstitiellen Fibrose und zum Nierenversagen (Abbildung 3).

1.4 Die Rolle der Makrophagen bei chronischer Niereninsuffizienz

1.4.1 Makrophagen Phänotypen

Makrophagen gehören zu den mononukleären phagozytischen Zellen und stellen eine heterogene Zellpopulation des angeborenen Immunsystems dar mit einer Vielzahl von wichtigen Aufgaben in allen Geweben, wie auch der Niere [80]. In der gesunden als auch kranken Niere spielen sie eine zentrale Funktion im Verlauf der Homöostase, der Immunreaktion, der Überwachung sowie der Verletzung und Reparatur des Gewebes (Abbildung 4) [81, 82]. Unter dem Einfluss von CSF-1 (colony-stimulating factor 1) entstehen sie aus myeloischen Vorläuferzellen des Knochenmarks, wo sie als Monozyten ins Blut abgegeben werden [83, 84]. Von dort wandern sie in geschädigte Organe – beispielsweise die Niere – ein (bzw. differenzieren hier aus Monozyten), um die bereits im Gewebe vorhandenen residenten Makrophagen zu ersetzen, speziell während einer Entzündungsreaktion. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, den interstitiellen Raum durch Phagozytose von überflüssigem bzw. fremden Zellmaterial zu bereinigen [84].

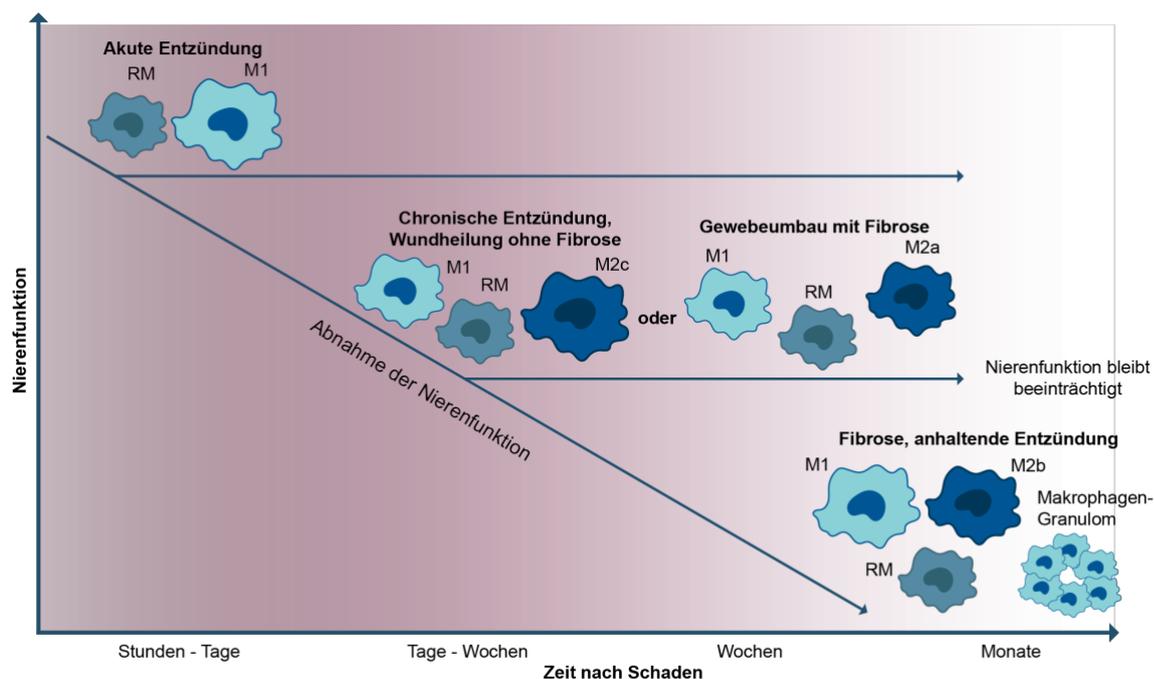


Abbildung 4: M1/M2-Makrophagen-Gleichgewicht in Abhängigkeit vom Fortschreiten der chronischen Nierenerkrankung (CKD). Entwicklung von Makrophagen-Populationen und des M1/M2-Makrophagen-Gleichgewichts in Abhängigkeit des Verlaufs der chronischen Nierenerkrankung. Die Nierenfunktion nimmt im Laufe der Zeit ab, abhängig von Art der Verletzung, der Persistenz und Schwere der Schädigung und der Reparatursfähigkeit der Niere. Adaptiert nach Steiger et al. und Guiteras et al. [82, 85]

Nach Rekrutierung von zirkulierenden Monozyten in die geschädigte Niere differenzieren sie sich grob in zwei Subphänotypen - klassisch aktivierte (M1) und alternativ aktivierte (M2)

Makrophagen [82, 86, 87] (Abbildung 4). Erstere werden durch die Aktivierung von Interferon (IFN)- γ oder Lipopolysaccharid (LPS) gebildet und gelten aufgrund ihrer Fähigkeit, bestimmte Zytokine wie Interleukin IL-1 β , IL-6, iNOS, und Tumornekrosefaktor (TNF)- α zu sekretieren, als proinflammatorisch [88]. Die alternativ aktivierten M2-Makrophagen besitzen dagegen entzündungshemmende und wundheilende Funktionen und exprimieren entsprechend ihrer Funktion andere Proteine, wie Arginase, Mannose-Rezeptor und IL-10 [86, 88]. Alternativ aktivierte M2-Makrophagen können in weitere Untergruppen eingeteilt werden, je nach spezifischer Lokalisierung und Funktion im geschädigten Gewebe: M2a, induziert durch IL-4 und/oder IL-13, die eine wundheilende und gewebereparierende Rolle spielen; M2b, induziert durch Immunkomplexe, und M2c, mit entzündungshemmender Wirkung und induziert durch IL-10, transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)- β oder Glukokortikoide [82, 84, 89]. Das Paradigma der M1- und M2-Makrophagen ist allerdings nur eine starke Vereinfachung der Makrophagen-Phänotypen innerhalb der Niere und beschreibt keine eindeutigen, klar definierten Subpopulationen aufgrund des Mangels an zellspezifischen Markern [82]. Vielmehr geht man davon aus, dass Makrophagen eine heterogene und sehr dynamische Zellpopulation darstellen, die sich infolge von spezifischen Stimuli aus der jeweiligen Mikroumgebung des Gewebes zu unterschiedlichen Phänotypen differenzieren und damit Funktionen entwickeln, die sowohl zur Gefahrenkontrolle als auch Wundheilung beitragen (Abbildung 4). Der phänotypische Übergang der Makrophagen wird durch die jeweilige Mikroumgebung durch programmierte Expression von Regulatoren im Verlauf der Nierenerkrankung bestimmt. Obwohl umfangreiche *in vitro* Studien die Klassifizierung der Phänotypen unterstützt haben, ist die Plastizität der Funktionszustände *in vivo* aufgrund der Komplexität weniger klar definiert und verstanden [81, 82]. Zur Beschreibung der komplexen, heterogenen Makrophagen-Subpopulationen bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Krankheiten werden vermutlich neuste innovative Methoden wie "Lineage Tracing", mit denen sich das Schicksal einzelner Zellen und ihrer Nachkommen verfolgen lässt, sowie Einzelzell-RNA-Sequenzierung einen wichtigen Beitrag leisten [82].

1.4.2 Die Rolle der Makrophagen bei Kristall-induzierten Nephropathien

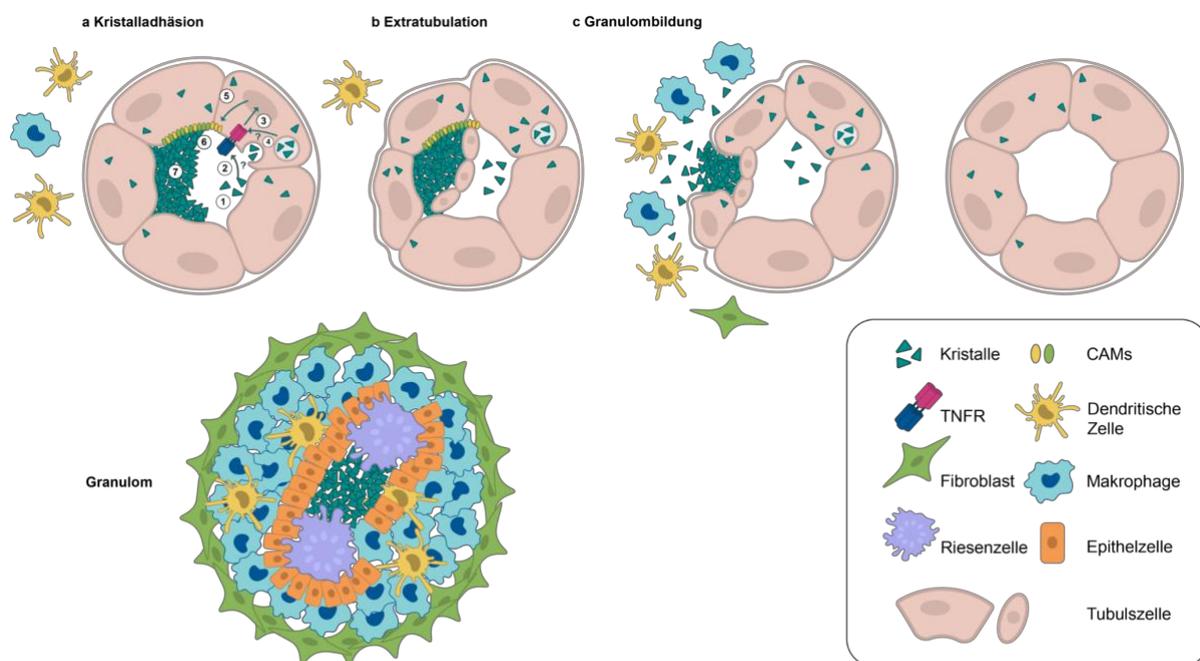
Makrophagen spielen bei akuten, chronischen und natürlich auch bei Kristall-induzierten Nephropathien eine zentrale Rolle. Bei Verletzungen des Nierengewebes infolge einer CKD werden Blutmonozyten an den Ort der Schädigung rekrutiert, wo sie sich als Reaktion auf die

Signale der Mikroumgebung ausdifferenzieren [87] (siehe auch 1.4.1). Die Makrophageninfiltration der Niere stellt zweifellos ein charakteristisches Merkmal der CKD beim Menschen dar. Die Korrelation zwischen Ausmaß der Infiltration durch Makrophagen und Schwere der Nierenschädigung unterstützt die Theorie einer zentralen Effektor-Funktion der Makrophagen [86].

Während der CKD durchlaufen residente und infiltrierende Makrophagen die zuvor beschriebenen Aktivierungsreaktionen wie Phagozytose und Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen und toxischen Stoffwechselprodukten (siehe 1.3.2 und 1.4.1). In dem von Anders und Ryu beschriebenen Modell zur Beschreibung der unterschiedlichen Makrophagen Phänotypen [89] (Abbildung 4) werden chronische Nierenverletzungen durch die Apoptose renaler Zellen und Freisetzung von entzündungshemmenden Mediatoren wie IL-10 die Polarisierung der Makrophagen in Richtung des entzündungshemmenden M2-ähnlichen Phänotyps fördern. Sobald die Entzündung abgeklungen ist, wird die Mikroumgebung dann von Wachstumsfaktoren wie TGF und EGF dominiert, die den Prozess der Wundheilung fördern, insbesondere bei unzureichender Reparatur des Epithels. Diese Umgebung steuert die Makrophagen Polarisierung in Richtung eines profibrotischen Phänotyps, der zur Sekretion von Wachstumsfaktoren beiträgt (Abbildung 3, Abbildung 4). Somit spielen Makrophagen bei der CKD nicht nur bei der Gewebeerletzung eine zentrale Rolle [80], sondern sie sind auch bei der Immunabwehr und der anschließenden Gewebereparatur von entscheidender Funktion [81, 90].

Die Kristall-induzierten Nephropathien sind außerdem durch das Vorhandensein von Kristallgranulomen im interstitiellen Kompartiment gekennzeichnet (Abbildung 5). Dorthin gelangen die Kristallablagerungen durch den Prozess der Extratubulation, bei dem neu gebildete Tubulusepithelzellen die intraluminalen Kristallaggregate umhüllen, indem sie neue Basalmembranen an der luminalen Oberfläche der Kristallablagerungen ausbilden. Die an den Kristall angrenzenden Zellen atrophieren und die tubuläre Basalmembran löst sich auf. Durch diesen Prozess werden die Kristallaggregate vom Tubuluslumen in das interstitielle Kompartiment verlagert. Dort werden sie u.a. von Makrophagen und anderen Immunzellen umgeben (Abbildung 5), wie z.B. bei der 2,8-Dihydroxyadenin Kristall-induzierten Nephropathie gezeigt [91]. Die Hauptaufgabe der Makrophagen besteht darin, den interstitiellen Raum durch Phagozytose und Abbau der Kristalle zu bereinigen [84]. Bei

hyperoxalurischen Mäusen konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Induktion von M2-Makrophagen durch CSF-1 die renale Kristallbildung unterdrückt [92]. Gelingt es nicht, große Kristallmassen zu beseitigen, lagern sich Makrophagen, andere Immunzellen sowie Epithelzellen um Kristallablagerungen herum an [60, 93], ähnlich wie bei Granulomen, die infolge von infektiösen Erregern wie Tuberkulosebakterien induziert werden [94]. Die Immunreaktion an der Peripherie des Granuloms ähnelt einer Wundheilungsreaktion, die durch Aktivierung von Myofibroblasten, welche die Gewebefibrose induzieren, gekennzeichnet ist (siehe 1.3.3) (Abbildung 5). Dieses Muster ist besonders deutlich bei der chronischen Uratnephropathie [23]. Experimentelle Daten in einem Tiermodell zur chronischen Uratnephropathie mit granulomatöser Nephritis haben gezeigt, dass eine zugrundeliegende interstitielle Fibrose mit Tubulusatrophie die Voraussetzung für die Bildung von Harnsäurekristall-Granulomen darstellt, welche von M1-ähnlichen Makrophagen gebildet werden. Die interstitiellen Makrophagen-vermittelten Harnsäurekristall-Granulome tragen wiederum zur Progression der CKD bei [39].



Mechanismen der Kristallgranulombildung

Abbildung 5: Mechanismen der kristall-induzierten Nephropathie mit Granulombildung. Mechanismen der Kristallgranulombildung. (a) Durch Übersättigung von Salzverbindungen kommt es zur Bildung (1) und Adhäsion (2) von Kristallen an die Oberfläche der Tubuluszellen. Phagozytose und Aktivierung von Signal und Synthesewegen (3-6) führen zur Bildung eines Kristallpfropfs (7) im Tubuluslumen und zur Obstruktion des Tubulus. (b) Dedifferenzierung und Verlagerung des Kristallpfropfs in das interstitielle Kompartiment der

Tubuluszellen. (c) Bildung von Riesenzellen (polyploide proinflammatorische Makrophagen) und des Granuloms im interstitiellen Kompartiment. Adaptiert nach Mulay und Anders et al. [23]

1.4.3 Die Rolle von p53 bei Niereninsuffizienz und in Makrophagen

Als äußerst intensiv erforschtes Protein verdankt p53 seinen Bekanntheitsgrad vor allem seiner Rolle als Tumorsuppressor, der durch Stresssignale wie genotoxische DNA-Schäden, Expression von Onkogenen, ROS und Nährstoffmangel aktiviert wird [95]. Als zentraler Transkriptionsfaktor steuert p53 hierbei die Expression von Genen, die an Apoptose, Zellzyklusstillstand, Stoffwechsel und DNA-Reparatur beteiligt sind. Mutationen von p53 gehen stets mit einer Dysregulation des Stoffwechsels, der Zell-Migration und Invasion einher, was letztlich zur Entwicklung von Karzinomen mit einer aggressiveren Malignität führt. Als Reaktion auf zellulären Stress werden die Proteinexpression und reversible posttranslationale Modifikationen von p53 induziert, die zusammen seine Stabilisierung und Aktivierung ermöglichen [96, 97].

p53 spielt ebenso eine entscheidende Rolle bei der kontrollierten Arretierung des Zellzyklus und der Regulation von Entzündungsreaktionen [98-101]. Beide Rollen werden zunehmend als Faktoren für die Entwicklung von Tumoren anerkannt.

Bei der Regulierung des Zellzyklus-Arrests wirkt p53 sowohl in der G₁- als auch in der G₂-Phase durch die transkriptionelle Induktion von p21, 14-3-3 δ (14-3-3 Phospho-Serin/Phospho-Threonin-Bindungsprotein) und Gadd45 (Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha): während die p53-vermittelte p21 Induktion die G₁-Cyclin-abhängigen Kinasen hemmt, die für den G₁/S-Übergang wesentlich sind [102], hemmt die Induktion von 14-3-3 δ /Gadd45 die Aktivität von CDC2/Cyclin B-Komplexen, die für den G₂/M-Übergang verantwortlich sind [103].

Der kontrollierte Zellzyklus spielt auch bei Nierenerkrankungen eine äußerst wichtige Rolle. Eine normale Nierenfunktion wird primär durch nicht-teilende, sogenannte in der G₀-Phase befindliche quieszente Zellen mit einem geringem Turnover, aufrechterhalten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sowohl ruhende Podozyten als auch tubuläre Epithelzellen hohe Mengen von MDM2, einer E3-Ubiquitin-Ligase, exprimieren [104]. Durch eine p53-Ubiquitinierung und den dadurch bedingten proteasomalen Abbau wirkt MDM2 als der zentrale negative Regulator von p53. Nach Gewebeverletzungen aktivieren Zellen den Zellzyklus, da Hypertrophie und Zellproliferation zwei wichtige

Kompensationsmechanismen darstellen, um vorhandene Funktionsstörungen des Organs zu verhindern. Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Professor Anders konnten zeigen, dass infolge einer AKI MDM2 das Absterben von Podozyten fördert, indem es durch Umgehung des G₂/M-Kontrollpunktes diese Zellen in die Mitose zurückführt und die mitotische Katastrophe und Apoptose auslöst [105]. Darüber hinaus fördert MDM2 durch eine Funktion bei der NF-κB-Signalübertragung die glomeruläre Entzündung in verletzten Glomeruli und verschlimmert dadurch den Podozytenverlust, die Endothelschädigung und die Glomerulosklerose [106]. Bei akuten tubulären Verletzungen verschlimmert MDM2 die anfängliche Schädigungsphase durch NF-κB-vermittelte Entzündung, fördert allerdings in der späteren Heilungsphase eine Regeneration des Gewebes durch die oben beschriebene Regulierung von p53 [107]. In der Homöostase der Podozyten fungiert MDM2 somit als zentraler Faktor, der die Zellen durch Überaktivierung von p53 verursachten Zelltod schützt [108]. Auch in ruhenden Tubulusepithelzellen ist die hohe Expression von MDM2 für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase von zentraler Bedeutung. Hier verhindert der Regulator ebenso den spontanen, durch p53-Überaktivierung abhängigen Zelltod durch Eintritt in den Zellzyklus [109]. Da MDM2-Antagonisten als Alternative zur Chemotherapie für die Krebsbehandlung entwickelt werden, zeigen die Ergebnisse aus dem Anders Labor, dass eine MDM2-Hemmung für normales Gewebe, insbesondere für die Niere, schädlich sein könnte, da MDM2 und der damit verbundene Verlust von p53 für das Überleben und die Homöostase des Tubulusepithels in der Niere äußerst wichtig ist [109, 110].

Im Kontext der CKD, insbesondere Kristall-induzierten Nephropathien, ist über die Rolle von p53 wenig bekannt. Dagegen wurde die Involvierung von p53 im Prozess der fehlerhaften Reparatur der Niere infolge einer AKI mehrfach untersucht, wie oben bereits beispielhaft beschrieben. Unter typischen Bedingungen durchlaufen überlebende tubuläre Epithelzellen ein Programm der Hyperproliferation, Migration und Differenzierung, um verletzte Tubuli zu ersetzen. Die Aktivierung von p53 und seine Wechselwirkung mit dem Protein SMAD3 verhindern diesen Prozess und stimulieren dagegen die Transkription von profibrotischen Genen, was schließlich eine interstitielle Fibrose und die Ausbildung einer CKD zur Folge hat [111] (Abbildung 4). Infolge der genetischen Ausschaltung bzw. pharmakologischen Hemmung von p53 durch Pifithrin-α konnte die Nierenreparatur nach AKI interessanterweise beeinflusst werden. Während manche Arbeiten zeigten, dass durch zeitlich bzw. örtlich exakt gesteuerte p53 Ausschaltung die Entwicklung der Nierenfibrose abgemildert wird [112, 113],

fürten andere Methoden der p53 Blockierung zur erhöhten Nierenfibrose [114, 115]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Rolle von p53 bei der Entwicklung und Reparatur des AKI (insbesondere während der Prozesse der Apoptose, Zellzyklusstillstand und Autophagie) äußerst vielschichtig und unvollständig verstanden ist [116].

Auch renale Entzündungsprozesse werden vermutlich durch p53 kontrolliert. Obwohl noch unklar ist, ob die Schwere einer Nierenverletzung nach einer ischämischen Episode das Fortschreiten der Erkrankung direkt beeinflusst, vermutet man, dass eine abgeschwächte Entzündung in p53-KO-Mäusen zu einer verminderten Fibrose beiträgt [113]. Weitere Studien implizieren eine Funktion von p53 bei M1- als auch M2-Makrophagen; die Polarisierung zum M1- oder M2-Subtyp führt nachweislich zu einer Induktion von p53 [117]. In einem Tiermodell zum LPS-induzierten septischen Schock wiesen p53 k/o Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine höhere Mortalitätsrate auf. Ein möglicher Grund ist, dass LPS-aktivierte Makrophagen von p53 k/o Mäusen vermehrt proinflammatorische Zytokine produzieren [118].

Die Rolle von p53 während der eng miteinander verknüpften Prozesse bei Tumorentwicklung und chronischer Entzündung wird ebenso intensiv analysiert [101, 119]. Letztere fördern beispielsweise sowohl Entstehung als auch Voranschreiten verschiedener epithelialer Tumore wie Darmkrebs. In einem Mausmodell mit p53-Deletion bzw. -Aktivierung in der myeloischen Linie setzen Tiere mit reduzierten p53 Mengen in Makrophagen vermehrt Entzündungsmediatoren frei und entwickelten verstärkt Adenome; eine leichte p53-Aktivierung mildert die Entzündungsreaktion dagegen durch Unterdrückung einer alternativen (M2) Makrophagen-Polarisierung ab und die Mäuse sind gegenüber der Entstehung und Invasion von Darmtumoren resistent [120]. In tumorassoziierten Makrophagen, die durch sezernierte Signalstoffe von Tumorzellen rekrutiert werden, spielt p53 im Zusammenspiel mit NF- κ B dagegen eine tumorfördernde Rolle infolge der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen [121]. Insgesamt zeigen diese Beispiele, dass die Folgen einer p53 Aktivierung oder Ausschaltung in Prozessen der transkriptionellen Umprogrammierung bzw. Makrophagenpolarisierung extrem unterschiedlich sein können und durch zahlreiche Faktoren und den jeweiligen Gewebekontext während der entzündungsbedingten Prozesse und der anschließenden Tumorgenese gesteuert werden [120, 121].

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Kristall-induzierte chronische Nephropathien werden typischerweise durch Kalziumphosphat, Kalziumoxalat- und Harnsäure-Kristalle ausgelöst. Das Ausfallen von 2,8-Dihydroxyadenin (2,8-DHA), zu dem es bei Patienten mit einem Mangel des Enzyms Adenin-Phosphoribosyltransferase -APRT- kommt, verursachen dagegen äußerst selten eine CKD. Angesichts der Notwendigkeit, die Pathogenese seltener Krankheiten besser zu verstehen, ist es auch am Beispiel der APRT-Defizienz wichtig, mittels Tiermodellen die Folgen der 2,8-DHA-Ablagerungen umfassend zu analysieren und zu charakterisieren, um Therapieansätze zur Behandlung der APRT-Defizienz und der damit einhergehenden Kristallbildung und Nierenschädigung zu entwickeln.

Ziel dieser Arbeit war es, im Labor der Nephrologie ein robustes Mausmodell einer CKD zu etablieren, das durch eine Adenin-supplementierte Futterdiät induziert wird. Die Frage, ob und wie sich die Adenin-Kristallbildung auf Nierenschäden, Entzündung und Fibrose auswirken, sollte anhand molekularbiologischer und mikroskopischer Analysen der Nieren erfolgen. Im Fokus standen dabei die Makrophagen und deren Aktivierung, was sowohl im Tiermodell als auch mittels *in vitro* kultivierter Makrophagen nach Stimulierung mit Adenin-Kristallen analysiert werden sollte. Nach erfolgreicher Etablierung des chronischen 2,8-DHA-Nephropathie-Mausmodells sollte schließlich auch die Rolle von p53 im Verlauf der sich entwickelnden CKD untersucht werden. Dazu wurde zum einen der Frage nachgegangen, wie sich die Adenin-Futterdiät in transgenen p53^{-/-} Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auswirkt. Zum anderen sollte die Reaktion von *in vitro* kultivierten Makrophagen nach Stimulierung mit Adenin-Kristallen in Folge der pharmakologischen Inhibierung von p53 untersucht werden.

Zusammenfassend wurden in dieser Doktorarbeit folgende Teilaspekte behandelt:

1. Einfluss von Adenin-Kristallen auf *in vitro* kultivierte Makrophagen bezüglich deren Immunaktivierung.
2. Etablierung eines Mausmodells für 2,8-DHA-induzierte CKD mit klinischer und histologischer Charakterisierung der Niere und molekularbiologischer Analyse der aktivierten Makrophagen.
3. Untersuchung der Rolle von p53 durch Nutzung des etablierten Mausmodells für 2,8-DHA-induzierte CKD in transgenen p53^{-/-} Mäusen und pharmakologische Inhibierung von p53 in *in vitro* kultivierten und Adenin-Kristall-behandelten Makrophagen.

2 Material

2.1 Tierhaltung

Tiere

Name	Firma
C57 BL/6N Mäuse	Charles River
C57 BL/6N, LysMCre:p53 ^{lox/lxx} Mäuse	Eigenzucht

Tierhaltung

Name	Firma
Einstreu, Espenholz	Ssniff Spezialdiäten, Soest, D
Innenliegende Gitterdeckel	Techniplast, Hamburg, D
Mouse House, rot	Techniplast, Hamburg, D
PSU H-Temp Filterhauben	Techniplast, Hamburg, D
PSU H-Temp Käfig Eurostandard Typ II	Techniplast, Hamburg, D
Tränkeflaschen	Techniplast, Hamburg, D

Futter

Name	Firma
Standard-Futterdiät	Ssniff Spezialdiäten, Soest, D
Adenin-Futterdiäten	Altromin Spezialfutter, Lage, D

Futterzusammensetzung der Standarddiät

Bruttoenergie (GE)	16,7 MJ/kg
Umsetzbare Energie (UE)	13,6 MJ/kg
Rohnährstoffe	
Trockenmasse	87,9 %
Rohprotein	22,0 %
Rohfett	4,5 %
Rohfaser	3,9 %
Rohasche	6,8 %
N freie Extraktstoffe	50,8 %

Stärke	34,0 %
Zucker	5,0 %
Mineralstoffe	
Calcium	1,00 %
Phosphor	0,70 %
Natrium	0,24 %
Magnesium	0,21 %
Kalium	1,02 %
Vitamine	
Vitamin A	2.000 IU/kg
Vitamin D ₃	1.000 IU/kg
Vitamin E	135 mg/kg
Vitamin K (als MNB)	20 mg/kg
Thiamin (B ₁)	86 mg/kg
Riboflavin (B ₂)	32 mg/kg
Pyridoxin (B ₆)	31 mg/kg
Cobalamin (B ₁₂)	150 µg/kg
Nikotinsäure	145 mg/kg
Pantothensäure	60 mg/kg
Folsäure	10 mg/kg
Biotin	700 µg/kg
Cholin-Chlorid	3.130 mg/kg
Inositol	100 mg/kg
Inosin	25,6 g/kg

Futterzusammensetzung der Adenin-Diäten

Inhaltsstoff	Einheit	Gehalt 0,1%	Gehalt 0,15%	Gehalt 0,2%
Rohprotein / Crude Protein	mg/kg	191919,548	191823,732	191728,012
Rohfett / Crude Fat	mg/kg	40750,268	40729,923	40709,599
Rohfaser / Crude Fibre	mg/kg	60683,524	60653,228	60622,962
Rohasche / Crude Ash	mg/kg	58494,452	58465,248	58436,074

Feuchtigkeit / Moisture	mg/kg	113312,977	113256,405	113199,890
Disaccharide(s)	mg/kg	47731,119	47707,289	47683,483
Polysaccharide(s)	mg/kg	390825,405	390630,285	390435,359
Umsetzb. Energie/Metab. Energy	kcal/kg	3223,637	3222,028	3220,420
Lysin / Lysine	mg/kg	8092,737	8088,697	8084,661
Methionin / Methionine	mg/kg	2706,054	2704,703	2703,353
Cystin / Cystine	mg/kg	3178,561	3176,975	3175,389
Threonin / Threonine	mg/kg	6392,847	6389,656	6386,467
Tryptophan	mg/kg	2340,020	2338,852	2337,685
Arginin / Arginine	mg/kg	11163,477	11157,903	11152,335
Histidin / Histidine	mg/kg	4346,414	4344,244	4342,076
Isoleucin / Isoleucine	mg/kg	7400,100	7396,405	7392,715
Leucin / Leucine	mg/kg	13200,999	13194,408	13187,824
Phenylalanin / Phenylalanine	mg/kg	8213,087	8208,987	8204,890
Valin / Valine	mg/kg	8625,754	8621,448	8617,146
Alanin / Alanine	mg/kg	8284,036	8279,900	8275,768
Asparaginsäure / Aspartic acid	mg/kg	15281,379	15273,749	15266,128
Glutaminsäure / Glutamic acid	mg/kg	38656,743	38637,444	38618,164
Glycin / Glycine	mg/kg	8019,740	8015,736	8011,737
Prolin / Proline	mg/kg	12510,130	12503,884	12497,645
Serin / Serine	mg/kg	8956,064	8951,593	8947,126
Tyrosin / Tyrosine	mg/kg	5842,697	5839,780	5836,866
Vitamin A	I.E./kg	14985,015	14977,534	14970,060
Vitamin D3	I.E./kg	599,401	599,101	598,802
Vitamin E	mg/kg	75,422	75,384	75,347
Vitamin K3 als/as Menadion(e)	mg/kg	2,997	2,996	2,994
Vitamin B1	mg/kg	17,982	17,973	17,964
Vitamin B2	mg/kg	11,988	11,982	11,976
Vitamin B6	mg/kg	8,991	8,987	8,982
Vitamin B12	mg/kg	0,024	0,024	0,024
Nikotinsäure / Nicotinic acid	mg/kg	35,964	35,946	35,928

Pantothensre./Pantothenic acid	mg/kg	20,979	20,969	20,958
Folsäure / Folic acid	mg/kg	2,21099	2,20989	2,20878
Biotin	mg/kg	0,166	0,166	0,166
Cholinchlorid/Choline chloride	mg/kg	599,401	599,101	598,802
Vitamin C	mg/kg	35,964	35,946	35,928
Calcium	mg/kg	7005,345	7001,847	6998,353
Ges.Phosphor / Phosphorus	mg/kg	5008,933	5006,432	5003,934
Verd.Phosphor/Digest.Phosphorus	mg/kg	2039,750	2038,732	2037,715
Magnesium	mg/kg	2217,351	2216,244	2215,138
Natrium / Sodium	mg/kg	2126,182	2125,120	2124,060
Kalium / Potassium	mg/kg	8788,635	8784,248	8779,864
Schwefel / Sulfur	mg/kg	1140,080	1139,511	1138,942
Chlor / Chlorine	mg/kg	3480,593	3478,856	3477,120
Eisen / Iron	mg/kg	192,312	192,216	192,121
Mangan / Manganese	mg/kg	94,962	94,914	94,867
Zink / Zinc	mg/kg	95,087	95,040	94,992
Kupfer / Copper	mg/kg	12,797	12,791	12,784
Jod / Iodine	mg/kg	1,660	1,659	1,658
Molybdän / Molybdenum	mg/kg	1,096	1,095	1,094
Fluor / Fluorine	mg/kg	2,797	2,795	2,794
Selen / Selenium	mg/kg	0,250	0,250	0,250
Kobalt / Cobalt	mg/kg	0,344	0,344	0,343
Palmitinsäure C-16:0	mg/kg	3874,446	3872,511	3870,579
Palmitoleinsäure C-16:1	mg/kg	21,978	21,967	21,956
Stearinsäure C-18:0	mg/kg	1185,375	1184,783	1184,192
Ölsäure C-18:1	mg/kg	6815,904	6812,501	6809,102
Linolsäure C-18:2	mg/kg	16135,744	16127,688	16119,641
Linolensäure C-18:3	mg/kg	2207,592	2206,490	2205,389
Arachinsäure C-20:0	mg/kg	35,165	35,147	35,130
Eicosaensäure C-20:1	mg/kg	43,956	43,934	43,912
Aluminium	mg/kg	79,291	79,251	79,211

Volumen / Volume	kg	1001,000	1001,500	1002,000
------------------	----	----------	----------	----------

2.2 Geräte und Materialien

Durchflusszytometrie

Name	Firma
FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg, D
FACSCanto™ II	BD Bioscience, Heidelberg, D
FACS-Tubes	BD Bioscience, Heidelberg, D
LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Pre-Seperation Filters (30 µm)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
QuadroMACS™ Starting Kit (LS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D

Enzyme-linked immunosorbent assay

Name	Firma
ELISA-Reader Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, D
Mouse IL-6 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg, D

Glomeruläre Filtrationsrate

Name	Firma
Abdecktücher, steril, Raucodrape®	Lohmann und Rauscher GmbH & Co KG, Rengsdorf, D
Batterien für NIC-Devices	MediBeacon GmbH, Mannheim, D
Ladegerät für Batterien der NIC-Devices	MediBeacon GmbH, Mannheim, D
Leukoplast® Rollenpflaster	BSN medical GmbH, Hamburg, D
Mulltupfer	Nobamed Paul Danz, Wetter, D
NIC-Kidney Patches 3 x 3 cm	MediBeacon GmbH, Mannheim, D
SurgiVet vaporizer	Smiths Medical, Grasbrunn, D

Transdermaler GFR Monitor	MediBeacon GmbH, Mannheim, D
Vintage Classic Klingen für Rasierhobel	Wilkinson Sword GmbH, Solingen, D
Werkbank mit Chemikalienabzug	Nunc GmbH, Langenselbold, D

Mikroskopie

Name	Firma
Axiocam HR	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, D
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
HE-Färbung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Lichtmikroskop Leitz DM IL	Leica Microsystems, Solms, D
Lichtmikroskop Zeiss Axioplan 2	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, D
Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA
OptiScan II™	Prior Scientific Instruments Ltd., Cambridge, UK
Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Pipetten

Name	Firma
Einkanalpipetten 2 µl	Gilson, Middleton, USA
Einkanalpipetten 10 µl	Gilson, Middleton, USA
Einkanalpipetten 20 µl	Gilson, Middleton, USA
Einkanalpipetten 200 µl	Gilson, Middleton, USA
Einkanalpipetten 1000 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen 20 µl	Peske, Aindling-Arnhofen, D
Pipettenspitzen 200 µl	Peske, Aindling-Arnhofen, D
Pipettenspitzen 1000 µl	Peske, Aindling-Arnhofen, D
Pipettierhilfe Pipetus – classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Serologische Pipetten 5 ml	BD Bioscience, Heidelberg, D

Serologische Pipetten 10 ml	BD Bioscience, Heidelberg, D
Serologische Pipetten 25 ml	BD Bioscience, Heidelberg, D

Real-time PCR

Name	Firma
BioStab PCR Optimizer	Biomol GmbH, Hamburg, D
DirectPCR [®] Lysis Reagent Tail	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Einbettkassetten	NeoLab, Heidelberg, D
Klebefolie	Roche, Basel, CH
LightCycler 480 Multiwell-Platte 96	Roche, Basel, CH
LightCycler 480 Real-Time PCR System	Roche, Basel, CH
PureLink [™] RNA Mini Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
Quali-PCR-Tubes	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, D
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hinden, D
Spektrophotometer NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Waagen

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

Zellkultur

Name	Firma
Brutschrank Heraeus Typ B 5060 EC – CO ₂	Heraeus Sepatech, München, D
Gas Incubation System for CO ₂ and O ₂	ibidi GmbH, Martinsried, D
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe, D
Permanox [®] Chamber Slides [™] 1-well	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Permanox [®] Chamber Slides [™] 8-well	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Petrischalen [div Größen]	TPP, Trasandigen, CH
UV-Licht	Bachhofer Laborgeräte, Reutlingen, D

Sonifier B-12	Bronson Sonic Power Company, USA
Steril Card Hood Class II Typ A/B ₃	The Baker Company, Sanford, ME, USA
Temperature Controller	ibidi GmbH, Martinsried, D
Zellsieb, steril, 70 µm	Corning Science, Kaiserslautern, D

Zentrifugen

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

2.3 Chemikalien

Chemikalien

Name	Firma
AccuCheck Counting Beads	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, D
Acrylamid	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Adenin $\geq 99\%$ (C ₅ H ₅ N ₅) 1 g	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Agarose	Invitrogen Ltd., Waltham, USA
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Anti-phospho-Ser/Thr-Pro, MPM-2, Cy5	EMD Millipore Corporation, Temecula, CA, USA
Aqua ad injectabile	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, D
Cellpack DCL	Systemex, Kobe, Japan
Destilliertes Wasser (DNAse/RNAse frei)	gibco/Invitrogen, Paisley, Scotland, UK
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

DNase I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
DNase-free RNase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
dNTP Set	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Essigsäure 99-100 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol 96 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Fetales Bovines Serum (FBS)	Summit Biotechnology, Fort Collins, USA
FITC-Sinistrin	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Formalin 4%	Morphisto GmbH, Frankfurt, DE
Hexanukleotid-Mix	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Hoechst 33342	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isofluran Forene [®]	Abbott, Wiesbaden, D
Kollagenase	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Low MW DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt, D
Lysing Matrix D, 2 mL Tube	MP Biomedicals, Eshwege, D
Macrophage-SFM	gibco/Invitrogen, Paisley, Scotland, UK
Magnesiumchlorid 25 mM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Methylgrün	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumazid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumacetat trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natronlauge (4N)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Nuclear Fast Red Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Nycodenz [®]	Axis-Shield Diagnostics Ltd., Dundee, UK

Paraplast®	Merck KGaA, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin (PS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
peqGREEN DNA/ RNA Farbstoff	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Periodsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Propidiumiodid (PI)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Proteinase K	Qiagen GmbH, Hinden, D
Pyronin Y	SIGMA-ALDRICH GmbH, Schnelldorf, D
Rasburikase	EBiosciences, San Diego, USA
Ribonuklease A, aus bovinem Pankreas	SIGMA-ALDRICH GmbH, Schnelldorf, D
RNAlater	Life Technologies, Darmstadt, D
RNase Away®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
RNasin®	Promega GmbH, Walldorf, D
RPMI 1640 Medium	gibco/Invitrogen, Paisley, Scotland, UK
RPMI 1640 Medium (Phenolrot-frei)	gibco/Invitrogen, Paisley, Scotland, UK
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Schiffs Reagenz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Sonnenblumenöl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
SuperScript™ III Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
SybrGreen I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Taq DNA-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt, D
Thioglykolat	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled	WaterInvitrogen GmbH, Karlsruhe, D
VECTASHIELD® Hardset Antifade	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, D
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

Xylol	Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, UK
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
3,3'-Diaminobenzidine	Merck KGaA, Darmstadt, D
5x Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
6x DNA Loading	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
10x Standard Taq Reaction Puffer	New England BioLabs, Frankfurt, D

2.4 Zytokine und Inhibitoren

Zytokine und Inhibitoren

Name	Firma
Recombinant Mouse Macrophage Colony Stimulating Factor (rm M-CSF)	ImmunoTools, Friesoythe, D
Pifithrin- α HBr	Selleck Chemicals, München, D

2.5 Murine Antikörper für Durchflusszytometrie

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

2.6 Primer für die qRT-PCR

Name	Firma
PCR Primer	Metabion, Martinsried, D

Maus Primer Sequenzen

Maus Zielgen	Forward-Sequenz (5'-3')	Reverse-Sequenz (5'-3')
<i>Arginase 1</i>	AGAGATTATCGGAGCGCCTT	TTTTTCCAGCAGACCAGCTT
<i>ASC</i>	GGGCCATTCTGTTTCTCTC	CGTTCACCCTGGTTTTGT
<i>CD206</i>	CCTCTGGTGAACGGAATGAT	CTTCCTTTGGTCAGCTTTGG
<i>iNOS</i>	GAGACAGGGAAGTCTGAAGCAC	CCAGCAGTAGTTGCTCCTCTTC
<i>Mrc-1/CD206</i>	ATATATAAACAAGAATGGTGGGC AGT	TCCATCCAAATGAATTTCTTATCC
<i>NGAL</i>	AATGTCACCTCCATCCTGGT	ATTTCCCAGAGTGAAGTGGC
<i>Fibronectin 1</i>	GGAGTGGCACTGTCAACCTC	ACTGGATGGGGTGGGAAT
<i>Il-6</i>	TGATGCACTTGCAAAAACA	ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC
<i>KIM-1</i>	TCAGCTCGGGAATGCACAA	TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT
<i>Tnf-α</i>	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	AGGGTCTGGGCCATAGAAGT
<i>18s rna</i>	GCAATTATTCCCCATGAACG	AGGGCCTCACTAAACCATCC

2.7 Sonstige Materialien

Name	Firma
BD Microlance™ 3, 16-30 G	Becton, Dickinson, Franklin Lakes, USA
BD Plastipak™ Blasenspritze 1 ml	Becton, Dickinson, Franklin Lakes, USA
BD Plastipak™ Blasenspritze 2 ml	Becton, Dickinson, Franklin Lakes, USA
BD Plastipak™ Blasenspritze 5 ml	Becton, Dickinson, Franklin Lakes, USA
BD Plastipak™ Blasenspritze 10 ml	Becton, Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD45MicroBeads, mouse 2 mL	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Basel, CH
Einwegskalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., JPN

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

2.8 Software

Name	Firma
Apple Keynote	Apple Inc., Cupertino, USA
Apple Numbers	Apple Inc. Cupertino, USA
ImageJ	Wayne Rasband, USA
Prism	Graph Pad, San Diego, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corp., Redmond, USA
R	R Core Team

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

3.1.1 Tierversuchsvorhaben

Die Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes wurden während der Durchführung der Experimente stets eingehalten. Alle Tierversuche wurden im Vorfeld der Studie von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: ROB-55.2-2-2532.Vet_02-18-127). Diese Vorgaben basieren auf der Grundlage der EU-Richtlinie zum Schutz von Tieren, die zu wissenschaftlichen Zwecken benutzt werden (2010/63/EU), und stehen in Übereinstimmung mit den ARRIVE-Leitlinien [122].

3.1.2 Versuchstiere

Sieben bis zwölf Wochen alte männliche C57BL/6N-Wildtyp- sowie C57BL/6N-LysMCre-p53-Mäuse (p53^{-/-}) wurden für die *in vivo* Experimente verwendet. Die C57BL/6N-Mäuse wurden bei der Firma Charles River Laboratories Deutschland erworben. Heterozygote C57BL/6N Zell-spezifische LysMCre p53 Mäuse (p53^{+/-}) wurden verpaart, um folgende Genotypen der Nachwuchsgeneration(en) der p53 Mäuse zu generieren: wildtyp (+/+), heterozygot (+/-), homozygot (k/o) in einem Verhältnis von 1:2:1, entsprechend der Mendelschen Regeln. Äußerlich waren die Versuchstiere nicht zu unterscheiden.

3.1.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Versuchstiere wurde im Alter von ca. drei Wochen durchgeführt. Zur Gewinnung der DNA wurde jeweils ein ca. 1 cm Stück des Schwanzendes der Versuchstiere mindestens drei Stunden lang bei 55°C in einem Heizblock (Thermomixer) unter Schütteln mit 150 µl DirectPCR® Lysis Reagent Tail (PeqLab Biotechnologie) mit 1 µl Proteinase K-Lösung inkubiert, bis das Gewebe vollständig bezüglich der Proteinbausteine abgebaut war. Das Extrakt wurde anschließend 45 Minuten lang bei 85°C inkubiert, um die Proteinase K zu inaktivieren. Um das Kondensat vom Deckel des Reaktionsgefäßes zu gewinnen sowie unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurde die DNA-Probe anschließend eine Minute lang bei 12.000 U/min zentrifugiert und bei -20°C gelagert. Anschließend folgte eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei der spezifische DNA-Sequenzen anhand von Primern vervielfältigt wurden. Die DNA-Doppelhelix wird dabei im ersten Schritt bei 94°C in ihre Einzelstränge geschmolzen. Im zweiten Schritt wird die Temperatur auf 59°C reduziert, sodass spezifische Primer, kurze komplementäre Abschnitte von DNA, welche die zu amplifizierende DNA-

Sequenz flankieren, (siehe Tabelle 4) komplementär an die DNA-Einzelstränge anlagern ("Annealing"). Durch Anwesenheit der vier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und einer hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase im Reaktionsgemisch kann im dritten Schritt der jeweils komplementäre DNA-Strang ausgehend vom 3'-OH Ende des jeweiligen Primers bei 72°C synthetisiert werden. Durch die 38-fache Wiederholung dieser drei Schritte wird der zu analysierende Genabschnitt amplifiziert. Abschließend werden angefangene DNA-Stränge bei 72°C für fünf Minuten zu Ende synthetisiert.

Die DNA der in den Experimenten verwendeten Mäuse wurden auf das Vorhandensein der p53-loxP Sequenzen/Kassetten (+/+, +/- und -/-) in den 5' und 3'-Bereichen des p53 Gens untersucht. Hierfür wurden zwei sogenannte Mastermixe vorbereitet, die aus einem Mehrfachen des 25 µl Reaktionsvolumen einer PCR Reaktion bestand. Letztere enthielt (in den jeweiligen Endkonzentrationen) 1x PE-Puffer, 0,25 mM dNTPs, jeweils 1 µl der zwei Primer (Tabelle 1), 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5.000U/ml), 15,3 µl H₂O sowie 1 µl der oben beschriebenen DNA-Probe aus einem Schwanzextrakt.

Tabelle 1: Primer

Primernamen	Primer Sequenz (5'-3')
P53-A	CAC AAA AAC AGG TTA AAC CCA G
P53-B	AGC ACA TAG GAG GCA GAG AC
P53-C	AAG GGG TAT GAG GGA CAA GG
P53-D	GGA GAC AGA AAA GGG GAG GG

Die Primerpaare P53-A und P53-B detektierten dabei den 5'-flankierenden loxP-Bereich (bei wt DNA ergibt sich ein 288 bp, bei loxP DNA ein 370 bp-Fragment), die Primerpaare P53-C und P53-D den 3'-flankierenden loxP-Bereich (wt 431 bp, loxP 584 bp). Das Programm der PCR Reaktion bestand aus folgenden im Thermocycler programmierten Teilschritten: nach erster Hitzedenaturierung für fünf Minuten bei 94°C folgte eine 38-fache Wiederholung der drei Reaktionsschritte von 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 59°C und 30 Sekunden bei 72°C. Abschließend erfolgte eine einmalige 5-minütige Polymerisation durch die Taq-Polymerase bei 72°C. Zur Lagerung wurden die PCR Reaktionen bei 4°C gekühlt oder langfristig bei -20°C eingefroren. Die Analyse der PCR erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese, einer Technik, bei der die amplifizierten DNA-Fragmente im Agarosegel

aufgetrennt werden. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandert diese im elektrischen Spannungsfeld in Richtung Anode entsprechend ihrer Größe, kleine Fragmente migrieren dabei schneller als Größere. Zur exakten Größenbestimmung der durch PCR erzeugten DNA-Fragmente wurden diese mit einem Standardgemisch aus Fragmenten bekannter Größe (DNA-Leiter) verglichen.

Das Gel wurde aus einem Gemisch von 2% (wt/vol) Agarose und 1x TBE-Puffer (90 mM Tris Base, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA) hergestellt, zunächst für wenige Minuten aufgekocht, mit wenigen Microlitern einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt, abgekühlt und im flüssigen Zustand in eine Kammer gegossen, die einen Kamm mit Taschen enthielt. Nach Aushärten wurde das Agarosegel auf dem Träger in eine Elektrophoresekammer mit 1x-TBE-Puffer überführt, der Kamm entfernt und die Taschen mit einem Gemisch der jeweiligen PCR-Proben und DNA-Ladepuffer beladen. Die DNA-Leiter mit Fragmenten bekannter Länge (Standard) wurde zur Längenbestimmung ebenfalls in eine der Tasche pipettiert. Eine konstante Spannung von 125 Volt wurde für ca. 30 Minuten angelegt, so dass die DNA-Fragmente in Richtung der Anode wanderten. Durch Anwesenheit von Ethidiumbromid, einem Farbstoff der sich in die doppelsträngige DNA einlagert und im UV-Bereich absorbiert, konnten die im Gel vorhandenen DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden. Das Vorhandensein der DNA-Banden mit den zu erwartenden Längen (s.o.) signalisierte die Amplifizierung der für p53 codierenden DNA-Abschnitte bzw. das Vorhandensein der 3' bzw. 5'-flankierenden loxP-Bereiche durch die PCR.

3.1.4 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in einer speziellen pathogenfreien Tiereinrichtung unter Standardbedingungen gehalten. Der Tierstall war mit einem Lichtsystem ausgestattet, das einen 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus sicherstellte, klimatisiert, und ermöglichte eine konstante Zielraumtemperatur von $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ sowie eine relative Luftfeuchtigkeit im Bereich von 50 bis 70%. Die Mäuse wurden in Gruppen von maximal 5 Tieren in konventionellen Filterkäfigen untergebracht. Die Mäuse hatten *ad libitum* Zugang zu autoklaviertem Wasser und autoklaviertem Standardfutter („Chow“) (Ssniff, Soest, Deutschland) bzw. dem in dieser Arbeit untersuchten Futter, das zusätzlich mit Adenin angereichert war (Altromin, Seelenkamp, Deutschland). Zusätzliches Futter wurde auf dem Boden der Käfige platziert, um den Versuchstieren den Zugang zu erleichtern. Außerdem wurden während der gesamten Versuchsdauer zusätzliches Nistmaterial und Holzstöcke zum Nagen sowie

durchsichtige rote Plastikhäuschen als Unterschlupf zur Verfügung gestellt. Zusätzliche Einstreu wurde bereitgestellt und dreimal pro Woche ausgewechselt. Sämtliche Einstreu sowie alle Ausstattungsgegenstände, Käfige, Wasser und das Futter wurden vor deren Verwendung hitzesterilisiert.

Der Umgang mit den Versuchstieren erfolgte lediglich durch geschultes Personal mit Kenntnissen zur Tierschutzversuchstierverordnung. Alle beteiligten Personen nahmen verpflichtend am Modul „Versuchstierkunde“ entsprechend der GV-SOLAS teil und schlossen dieses mit einer theoretischen und praktischen Prüfung ab. Das Betreten der Einrichtung war nur bei Tragen eines Kopfnetzes, Mundschutz, Laborkittel, Einmalhandschuhen und Schuhüberziehern gestattet. Auf das Verwenden von Desinfektionsmittel innerhalb der Einrichtung vor und nach Kontakt mit jeglichen Gegenständen zum Infektionsschutz und Reduzierung der Keimbelastung wurde stets geachtet. Besondere Aufmerksamkeit galt der Einhaltung des 3R Grundsatzes, dessen Abkürzungen für „Replace, Reduce, Refine“ stehen. Replace bedeutet, dass nach Möglichkeit auf Tierversuche verzichtet und alternative Methoden gewählt werden sollen. Reduce besagt, dass die Anzahl von Versuchstieren auf ein Minimum reduziert wird. Die Gruppengröße wird danach statistisch berechnet und die Methoden werden optimiert, um unnötiges Tierleid zu vermeiden. Entsprechend dem Refinement werden Lebensbedingungen der Versuchstiere so artgerecht und die Methoden so schonend wie möglich gestaltet.

3.1.5 Mausmodell einer 2-8-DHA-Nephropathie und CKD

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen eingeteilt, die unterschiedliche Futterdiäten erhielten, um eine 2-8-Dihydroxy-Adenin-Kristall-induzierte Nephropathie zu induzieren. Die erste Gruppe (Kontrollgruppe) erhielt autoklaviertes Standardfutter. Die drei Interventionsgruppen erhielten autoklaviertes Standardfutter, welches zu jeweils unterschiedlichen Anteilen mit Adenin angereichert und rot eingefärbt war. Die erste dieser Interventionsgruppen erhielt durchgängig ein mit 0,2% (Gewichtsprozent) Adenin-angereichertes Standardfutter für einen Zeitraum von 42 Tagen. Die zweite bzw. dritte Interventionsgruppe erhielt eine alternierende Futterdiät mit abwechselnd 0,2% und 0,15% bzw. 0,2% und 0,1% Adenin-angereichertem Standardfutter. Das Adenin-supplementierte Futter wurde in Abständen von zwei Wochen gewechselt und insgesamt über einen Zeitraum von 49 Tagen verabreicht (siehe Abbildung 6). Die Mäuse hatten *ad libitum* Zugang zum Futter, das zusätzlich auf dem Boden der Käfige platziert wurde, um den Zugang zu erleichtern. Die Versuchsserie mit alternierender Zugabe von 0,2% und 0,15% Adenin wurde zusammen mit einer Kontrollgruppe wiederholt.

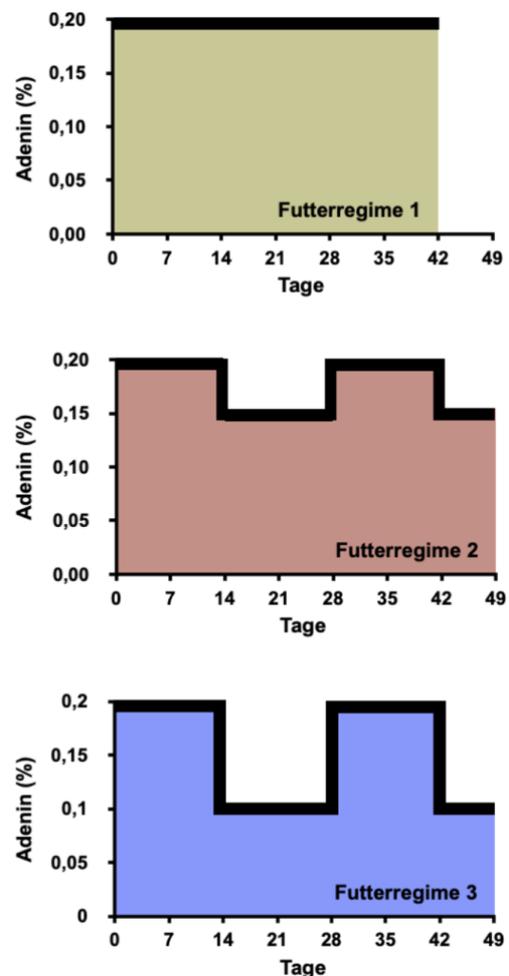


Abbildung 6: Adenin-Futterregime der Mausmodell-Etablierung.

3.1.6 Intravenöse Injektion

Den Versuchstieren wurde durch Punktion der Schwanzvenen Blut entnommen. Hierfür wurden die Versuchstiere in einer Plastikröhre, die mit Luftlöchern für eine ausreichende Sauerstoffversorgung perforiert war, fixiert, was ein Drehen der Mäuse verhinderte. Anschließend wurde der Schwanz kurzzeitig in 40°C warmes Wasser getaucht, um die Durchblutung zu fördern. Nach lokaler Desinfektion des Schwanzendes mit Ethanol (60%) wurde den Versuchstieren mit einer 26G-Kanüle langsam über die Schwanzvene die Testsubstanz (max. Volumen 5 ml/kg KG) injiziert. Nach dem Zurückziehen der Nadel wurde

die Injektionsstelle mit einem sterilen Tupfer komprimiert, bis die Blutung zum Stillstand kam.

3.1.7 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wurde durch eine transkutan erhobene Messung der Clearance der i.v. applizierten Substanz Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugiertem Sinistrin (Mannheim Pharma and Diagnostics) bestimmt. Dieses ist mit dem weiter verbreiteten FITC-Inulin vergleichbar, jedoch besser wasserlöslich und bezüglich seines pharmakologisch-toxikologischen Profils gleichermaßen unbedenklich. Somit können höhere Konzentrationen bei gleichzeitigem Einhalten der empfohlenen Injektionsvolumina der GV-SOLAS ermöglicht werden. Das markierte Polysaccharid wird ausschließlich glomerulär filtriert und nicht im Körper zurückgehalten. Die transkutan-erhobene Bestimmung der GFR wurde erstmals von Schreiber et al. beschrieben [123]. In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich diese Methode durch hohe Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit auszeichnet und die Ergebnisse mit der Plasma-Clearance korrelieren. Die Filtration von FITC-Sinistrin wurde mit einem miniaturisierten Lichtsignalsensor (Imager) aufgezeichnet, der auf der nackten Haut der bewussten Versuchstiere angebracht wurde. Die Plasmahalbwertszeit von FITC-Sinistrin wurde nach Messung der kontinuierlichen Signalveränderung von FITC-Sinistrin berechnet. Die Messung erfolgte mit geringfügigen Abänderungen gemäß wie folgt:

1. Die Versuchstiere wurden unter Isoflurannarkose narkotisiert. Der Nackenbereich wurde mit 70% Ethanol befeuchtet und die Haut mit einer handelsüblichen Einmal-Nassrasierklinge vorsichtig unter Vermeidung von Verletzungen freirasiert, so dass eine etwa $1,5 \times 1,5 \text{ cm}^2$ große fellfreie Hautfläche freigelegt wurde.
2. Der Imager für FITC-Sinistrin wurde mit einer kleinen Batterie verbunden und mit Hilfe eines gefensterten doppelseitigen Klebebandes (NIC-Pflaster, Mannheim Pharma & Diagnostics) auf der freirasierten Haut befestigt. Zur zusätzlichen Sicherung wurde der Imager mit einem 1 cm breiten Leukoplast Klebestreifen einmal in Höhe des Brustkorbes um das Versuchstier befestigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich der Klebestreifen unterhalb des Schultergürtels befand, um Wohlbefinden und Bewegungsfreiheit nicht zu beeinträchtigen. Die Prozedur fand auf einer sterilen Unterlage unter einem dafür geeigneten Abzug statt.

3. 10 Minuten vor Injektion mit FITC-Sinistrin wurde die Aufzeichnung des Imagers gestartet, um Hintergrundsignale für die spätere Datenanalyse aufzuzeichnen.
4. Anschließend wurde den Mäusen intravenös 120 mg/kg Körpergewicht FITC-Sinistrin in die Schwanzvene appliziert.
5. Jedes Versuchstier war hierbei bei Bewusstsein, wurde einzeln in einem Polypropylenkäfig mit Filterdeckel ohne Futter- und Wasserversorgung gehalten und konnte sich frei bewegen. Das FITC-Sinistrin-Signal wurde über einen Zeitraum von 90 Minuten aufgezeichnet.
6. Die Geräte wurden anschließend entfernt und mit der MPDLab-Software ausgewertet.

Eine FITC-Sinistrin-Signalkurve besteht aus drei Anteilen: der Aufzeichnungsphase des Hintergrundsignals (vor Injektion von FITC-Sinistrin), der Spitzenphase (nach Injektion von FITC-Sinistrin) und der Abklingphase (Abfall des Fluoreszenzsignals über die Zeit auf den Ausgangswert) (Abbildung 7). Die gemessene FITC-Sinistrin-Signalkurve wurde mittels der MPD-Lab Software ausgewertet, wodurch die Plasmahalbwertszeit von FITC-Sinistrin ($t_{1/2}$) ermittelt wurde. Die Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$) wurde anschließend anhand eines empirisch ermittelten Umrechnungsfaktors und der Einbeziehung des Körpergewichtes (KG) des Versuchstieres als GFR ($\mu\text{l}/\text{min}$) mittels der unten aufgeführten Formel berechnet.

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

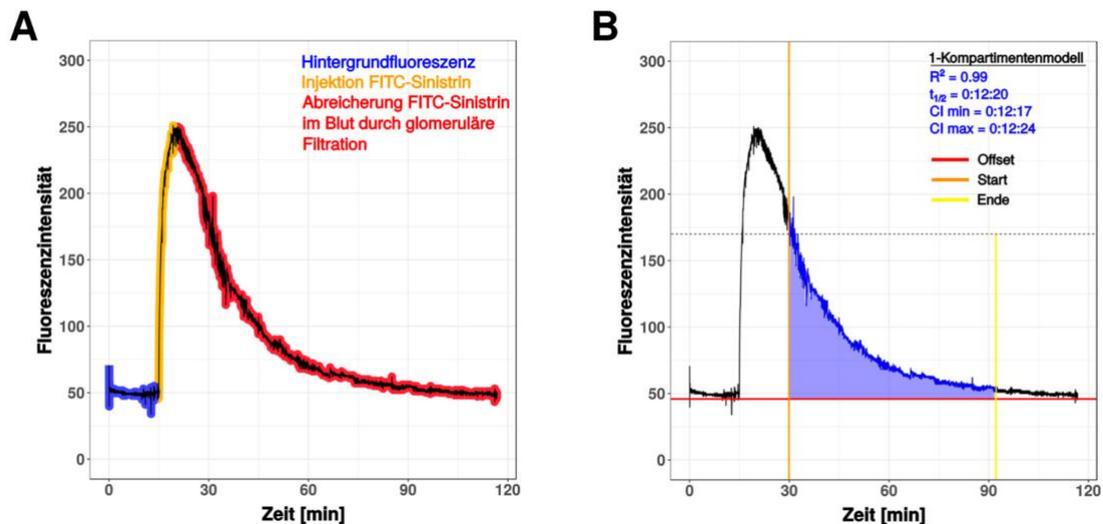


Abbildung 7: Messung der glomerulären Filtrationsrate. Charakteristischer Verlauf der transkutan erfassten FITC-Emission eines 8 Wochen alten C57BL/6N Versuchstiers mit intakter Nierenfunktion. (A) Die zeitlichen Fluoreszenzintensitäten können klassifiziert werden: Hintergrundfluoreszenz vor FITC-Sinistrin-Injektion (blau), Injektionsphase (gelb) und die Phase glomerulärer Filtration des Moleküls (rot). (B) Zur Bestimmung der Plasma-Halbwertszeit von FITC-Sinistrin wurden ein Fluoreszenz-Offset (rot), ein Start bei 60% Maximalfluoreszenz (orange) und ein asymptotischer Annäherungsendpunkt (gelb) festgelegt. Mithilfe dieser Daten berechnete die MPD-Lab Software die Area-under-the-curve (blau) und die resultierende Plasma-Halbwertszeit von FITC-Sinistrin. Adaptiert nach Marschner et al. [124].

3.1.8 Urinabnahme

Der Spontanurin der Versuchstiere wurde in wöchentlichen Abständen sowie zum Zeitpunkt der Euthanasie gesammelt. Hierfür wurde ein Versuchstier auf rutschfester Unterlage am Schwanz gehalten und der Urin wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wurde dieser 10 Minuten lang bei 8.000 U/min zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C für spätere Analysen gelagert.

3.1.9 Blutabnahme

Den Versuchstieren wurde in wöchentlichen Abständen ein kleiner spontan entstehender Blutropfen nach Punktion der Schwanzvene mit einer 30G-Kanüle entnommen sowie retrobulbär mit einer heparinisierten Glaskapillare (0,8 mm Durchmesser) in terminaler Isoflurannarkose bei Versuchsende. Hierfür wurden die Versuchstiere wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben mittels Inhalationsnarkose narkotisiert.

Nach Versuchsende wurden retrobulbär mit einer Glaskapillare acht Tropfen Blut entnommen, entsprechend einem Volumen von ca. 800 µl, und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 10 µl 0,5 M EDTA aufgefangen. Die Blutproben wurden anschließend sechs Minuten lang bei 6.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zur Verwendung für die Bestimmung von Kreatinin und Blood-Urea-Nitrogen (BUN) mittels nicht-enzymatischer bzw. enzymatischer Kits gelagert.

Für die hämatologische Analyse durch die German Mouse Clinic des Helmholtz Zentrums München wurde den Versuchstieren Blut an den Tagen 0, 14 und 49 wie oben beschrieben abgenommen. Für die Serumanalyse wurde je ein Reaktionsgefäß mit 150 µl Blut gefüllt und für 10 Minuten bei 5000g zentrifugiert. Der Überstand (50 µl) wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Für die hämatologische Zellanalyse wurden jeweils 50 µl Blut in einer Kunststoff-Einmal-Kapillarpipette (Servoprax, Wesel) gesammelt und in einem mit 200 µl Cellpack DCL (Sysmex, Kobe) gefüllten Reaktionsgefäß bis zur zellspezifischen Analyse auf Eis gelagert.

3.1.10 Entnahme und Probenvorbereitung der Nieren

Nach Versuchsende wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Anschließend wurden sie in steriler Umgebung fixiert und laparotomiert, um die Nieren zu entnehmen. Nach Entfernung der Nierenkapsel durch vorsichtiges Drücken des intakten Organs mit Zeigefinger und Daumen beider Hände, wurde eine der Nieren mithilfe eines Skalpell in drei Teile geteilt. Unmittelbar danach wurde für die histologische Probenvorbereitung das Mittelstück der einen Niere in einer Einbettungskassette in 4% (vol/vol) Formalin (pH 7) für 24 Stunden fixiert (siehe 3.3.1), um Proteine zu denaturieren und vor gewebeeigener Autolyse zu schützen. Außerdem wurden die für die genetische Expressionsanalyse vorgesehenen Nierenpole in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 500 µl RNAlater suspendiert, um das Nierengewebe vor gewebeeigenen RNAsen zu schützen und anschließend bei -20°C bis zur weiteren Präparation gelagert. Die zweite Niere jedes Versuchstieres wurde für die Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.5.1) verwendet und dazu in 2 ml PBS mit Kollagenase/DNase I Lösung überführt und weiterverarbeitet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

Sämtliche in diesem Kapitel beschriebenen Experimente wurden auf Eis durchgeführt. Bei Tätigkeiten mit RNA wurden alle Oberflächen und Arbeitsmaterialien 20 Minuten lang mit RNase AWAY behandelt und anschließend mit 70%-igem Ethanol gereinigt. Experimente mit 2-Mercaptoethanol wurden unter einem Abzug mit entsprechender Schutzkleidung durchgeführt.

3.2.1 Isolierung der Gesamt RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus *in vivo* extrahierten Nierenpolen und *in vitro* kultivierten Makrophagen erfolgte bei 4°C anhand des PureLink RNA Mini Kits (#12183018A, Invitrogen) nach folgendem Protokoll:

1. Die aus *in vivo* Experimenten gewonnene Gewebeprobe wurde in ein 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, welches 1 ml des Kit-eigenen, eiskalten Lysepuffer (supplementiert mit 1 % 2-Mercaptoethanol) enthielt.
2. Mittels des ULTRA-TURRA wurde das Nierengewebe 30 Sekunden lang zu einer feinen Suspension homogenisiert und anschließend 5 Minuten bei 12.000 g bei 4°C zentrifugiert. Die Suspension wurde anschließend erneut auf Eis gelagert. Das Rotorblatt des ULTRA-TURRA wurde nach jeder prozessierten Probe zuerst mit 70% Ethanol, dann mit ddH₂O gewaschen.
3. Zur Lyse der *in vitro* kultivierten Makrophagen wurden pro Well 400 µl Lysepuffer des kit-eigenen Lysepuffers (gemischt mit 1% 2-Mercaptoethanol) eingesetzt, die Zellen mit dem Schaber vom Boden abgeschabt und anschließend in Portionen von ca. 1 ml vereinigt.
4. Die Gewebe- bzw. Zellkultursuspensionen wurden jeweils in neue 1,5- bzw. 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit gleichem Volumenanteil 70% Ethanol (z. A.) versehen und kurz gemischt.
5. Die Extrakte wurden in zwei Säulendurchgängen auf PureLink-Silikagel-Säulen (Firma) aufgetragen, die sich in einem Sammelgefäß befanden, und 30 Sekunden lang bei 12.000 g zentrifugiert. Dieser Säulendurchfluß wurde verworfen.
6. Die an die Säule gebundene Nukleinsäuren wurde einmal mit 350 µl Waschpuffer 1 gewaschen und anschließend 30 Sekunden lang bei 12 000 g zentrifugiert.
7. Um kontaminierende genomische DNA zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau mit RNase-freier DNase (#79254, Qiagen) durchgeführt. Gemäß Herstellerangaben

wurden 80 µl der DNase-Lösung auf die Säule pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

8. 350 µl des Waschpuffers 1 wurden auf die Säule pipettiert und 30 Sekunden lang bei 12000 g zentrifugiert.
9. Zwei weitere Waschschrirte, jeweils mit 500 µl Waschpuffer 2 bei 12.000 g und 15 Sekunden Zentrifugation folgten. Schließlich wurde die Säule 1 Minute lang trocken zentrifugiert.
10. Die Säule wurde in ein frisches RNase/DNase-freies 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß plaziert und 32 µl RNase-freies Wasser aus dem Kit wurden zur Elution auf die Säule pipettiert und 1 Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert.
11. Die gebundene RNA wurde durch Zentrifugation bei 12.000 g für 2 Minuten von der Säule eluiert und zur sofortigen Weiterverarbeitung auf Eis gekühlt. Wenn möglich, erfolgte unmittelbar im Anschluss daran die cDNA Synthese (siehe 3.2.2). Andernfalls wurde die isolierte Gesamt-RNA bei -80°C gelagert.

Die Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration und Reinheit (Quotient 260 nm/280 nm) erfolgte mit einem NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific). Letzte lag im Bereich von 1,8 bis 2,2. Die Konzentration der RNA aus den Nierenpolen lag in der Regel im Bereich von 400 bis 800 ng/µl und zwischen 50 bis 100 ng/µl für die *in vitro* differenzierten Makrophagen.

3.2.2 Reverse Transkriptase PCR

Um eine standardisierte Menge von RNA-Probe für anschließende Schritte zu verwenden, wurde 2 µg der oben beschriebenen RNA-Präparation aus der Niere bzw. 1 µg RNA aus Makrophagen in einem Gesamtvolumen von 15 µl RNase-freiem H₂O verwendet. Um RNA-Sekundärstrukturen aufzulösen, wurden die Ansätze 10 Minuten bei 65°C in einem Thermocycler (Mastercycler pro, Eppendorf AG) erwärmt und anschließend bei 4°C gekühlt. Zur reversen Transkription der mRNAs in cDNAs wurde zunächst ein Mastermix aus Puffer, Dithiothreitol (DTT), der reversen Transkriptase, RNase-Inhibitor, einem Desoxyribonukleosidtriphosphat-Gemisch (dNTPs), randomisierten Hexanukleotid-Primern und linearem Acrylamid entsprechend der in Tabelle 2 beschriebenen Volumenanteile hergestellt.

Tabelle 2: Mastermix für die reverse Transkription von mRNA in cDNA (Angaben der Volumenanteile für eine Reaktion)

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

Ein zweiter Mastermix, in dem das Enzym reverse Transkriptase durch ddH₂O ersetzt wurde, wurde für Kontrollreaktionen verwendet, um potentielle Kontamination mit genomischer DNA bei der folgenden Polymerase-Kettenreaktion zu detektieren.

Die oben beschriebenen RNA-Proben (15 μl der Ansätze in Quali-PCR-Tubes) wurden anschließend nach Zugabe von 7,45 μl RT-PCR-Mastermix im Thermocycler unter den in Tabelle 3 aufgeführten Bedingungen in cDNA umgeschrieben und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

Tabelle 3: Thermocycler-Programm zum Umschreiben von mRNA in cDNA

Programm	Zieltemperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer [min]
Umschreibung	42	120
Beendigung der Reaktion	85	5
Abkühlen	4	∞

3.2.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-qPCR)

Zur Quantifizierung von mRNA-Transkripten der analysierten Zielgene wurde ein LightCycler 480 Real-Time PCR-System (Roche Diagnostics GmbH) unter Verwendung von 96-Well-

Schalen verwendet. Die Methode ermöglicht eine kinetische Quantifizierung der erzeugten doppelsträngigen PCR-Fragmente unter Verwendung des DNA-interkalierenden Farbstoffs SYBR Green I, dessen Emissionsintensität am Ende jedes Amplifikationsschrittes durch das Gerät bestimmt wird.

Als Template dieser RT-qPCRs dienten die in cDNAs umgeschriebene mRNAs, die sich in kleinen Anteilen in der isolierten Gesamt-RNA aus Nierengewebe bzw. Makrophagen befanden (siehe oben). Die jeweiligen Primerpaare, die zum spezifischen Nachweis der Transkripte der Zielgene eingesetzt wurden (siehe 2.6), waren so gewählt, dass sie eine Schmelztemperatur von $60 \pm 1^\circ\text{C}$ besaßen. Dies ermöglichte die Verwendung ein und desselben RT-qPCR-Programmes und somit die gleichzeitige Reaktion für alle Zielgene innerhalb einer 96-Well-LightCycler-Platte.

Die RT-qPCR Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 μl pro Well wie folgt beschrieben:

1. Pro Well der 96-Well-Platte wurden 2 μl einer 1:10-verdünnten cDNA-Probe (Verdünnung mit nukleasefreiem Wasser) pipettiert.
2. Für jedes Zielgen wurde ein spezifischer Mastermix wie folgt hergestellt: 0,6 μl 10 μM Vorwärts-Primer, 0,6 μl 10 μM Rückwärts-Primer, 10 μl 2x SYBR Green Mix, 0,16 μl Taq-DNA-Polymerase und 6,64 μl nukleasefreies Wasser. Pro Well wurden 18 μl des spezifischen Mastermixes pipettiert.
3. Nach Verschließen der 96-Well-Lightcycler-Platte mit einer transparenten Klebefolie (Sarstedt) wurde die Platte 15 Sekunden bei 500 g zentrifugiert, um die Reaktionslösung auf den Boden der Vertiefungen zu sammeln. Bis zur Durchführung der RT-qPCR konnten die Platten bis maximal 6 Stunden bei 4°C gelagert werden.
4. Die DNA-Amplifikation erfolgte in dem LightCycler 480 Gerät unter Verwendung folgender Schritte:
 - a. Vor-Inkubation: Die Zieltemperatur von 95°C wurde 5 Minuten lang gehalten. Diese Erhitzung ermöglicht die Aufhebung von Sekundärstrukturen innerhalb der cDNAs.
 - b. Amplifikation: Die Amplifikationsphase wurde für 40 Zyklen programmiert, welche jeweils aus 15 Sekunden Annealing bei 60°C und 40 Sekunden Extension bei 72°C bestehen.

- c. Schmelzkurve: Die Einstellung der ersten Zieltemperatur lag bei 95°C, die für 5 Sekunden gehalten wurde. Die zweite Zieltemperatur betrug 65°C und erlaubte somit eine kontinuierlich abnehmende Temperaturentwicklung von 95°C auf 65°C.

Tabelle 4: qPCR Mastermix

Reagenz	Volumen [μ l]
SYBRgreen-Mix	10
Taq DNA Polymerase	0,16
Forward Primer 10 μ M	0,6
Reverse Primer 10 μ M	0,6
Gesamt	11,36

Für Zwecke der Normalisierung wurde auch die Expression der 18S rRNA bestimmt, welche in allen Geweben hoch exprimiert wird und im Verlauf der Präparation und Analyse relativ stabil bleibt. Dieses Transkript eignet sich somit als konstante Referenzprobe innerhalb der möglicherweise leicht variierenden RNA/cDNA Präparationen.

Weitere Kontrollreaktionen wurden ohne Zugabe der cDNA-Probe als Template durchgeführt, indem die cDNA durch nukleasefreies Wasser ersetzt wurde. Die Werte der Crossing-Points (Zyklusnummer, bei dem das Fluoreszenzsignal den Hintergrund überschreitet) für Zielgen (CP_{target}) bzw. Referenzgen (CP_{ref}) wurden durch das LightCycler 480 Gerät durch die softwareeigenen „Second Derivative Maximum“-Methode bestimmt. Das Verhältnis von spezifischer mRNA/18S rRNA wurde anhand der nachfolgenden Formel bestimmt:

$$\Delta CP = 2^{CP_{\text{target}} - CP_{\text{ref}}}$$

3.3 Histologische Nachweismethoden

3.3.1 Formalin-Fixierung und Paraffineinbettung

Nach Fixierung der Mittelstücke der Nieren in 4% (vol/vol) Formalin (pH 7) für 24 Stunden (siehe 3.1.10) wurden diese inklusive Einbettungskassetten in einen Karussell-

Gewebeeinbettautomat (Shandon Citadel™, Thermo Electron Corporation) überführt und entsprechend des folgenden Protokolls prozessiert:

1. Entwässerung durch Ethanol: Um restliches Wasser aus dem Gewebe zu entfernen, wurden die Nierenproben schrittweise in 70% Ethanol für 5 Stunden, 96% Ethanol für 2 Stunden und abschließend in 100% Ethanol für 3,5 Stunden inkubiert.
2. Weiterverarbeitung mit Xylol: Um Ethanol zu entfernen, erfolgte eine 2,5 Stunden lange Inkubation der Nierengewebe in Xylol.
3. Einbettung in Paraffin: Zur Verdrängung des Xylols, wurden die Gewebeprouen 4 Stunden in Paraffin eingebettet.

Schließlich wurden die Einbettungskassetten entfernt und die Gewebeprouen an einer Paraffin-Ausgießstation (EC 350, Microm International GmbH) in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 2 µm dicke Transversalschnitte mithilfe eines Rotationsmikrotom (HM 340 E, Microm International GmbH) produziert. Diese wurden in einem 40°C warmen Wasserbad (HI 1210, Leica Instruments GmbH) aufgefangen, auf Objektträger übertragen und über Nacht bei 60°C getrocknet. Die Objektträger wurden dazu vorab entfettet zweimal für 5 Minuten mit 100% Aceton, einmal für 5 Minuten mit einer Lösung aus 0,02% Ammoniumpersulfat in Aceton, mit ddH₂O gespült und schließlich an der Luft getrocknet.

Vor histochemischen bzw. immunhistochemischen Färbungen (Kapitel 3.3.2) wurden die Schnitte zur Entparaffinierung auf den Objektträgern zweimal für 5 Minuten mit Xylol behandelt. Zur Rehydrierung wurden sie dann in Lösungen mit schrittweise abnehmender Ethanol Konzentration für jeweils 2 Minuten inkubiert (dreimal in 100%, zweimal in 96%, einmal in 70% Ethanol). Schließlich wurden die Schnitte 5 Minuten mit ddH₂O gewaschen.

3.3.2 Histochemische und immunhistochemische Färbungen

Periodsäure-Schiff- (PAS) Reaktion

Für die PAS Färbung wurden entparaffinierte und rehydrierte Schnitte wie folgt weiterverarbeitet:

1. Die Schnitte wurden 5 Minuten mit 0,5%-iger Periodsäure behandelt und anschließend 5 Minuten lang in ddH₂O gewaschen.

2. Die Schnitte wurden 5 Minuten in Schiff'scher Reagenzlösung inkubiert, wobei die Periodsäure Aldehydgruppen oxidiert. Diese reagieren mit der schwefligen Fuchsin-Säure im Schiff'schen Reagenz und produzieren eine magentafarbene Färbung. Anschließend folgten drei Waschschrirte von je 3 Minuten in 37°C warmem Leitungswasser.
3. Die Schnitte wurden 2 Minuten lang mit Hämatoxylin-haltiger Farblösung nach Mayer zur Darstellung der Zellkerne gegengefärbt, anschließend 5 Minuten lang in Leitungswasser gewaschen.
4. Die Schnitte wurden mit 90% Ethanol dehydriert und mit einem Deckblättchen präpariert.

Picro-Sirius Red Färbung

Für die Picro-Sirius Red Färbung wurden entparaffinierte und rehydrierte Nierenschnitte wie folgt weiterverarbeitet:

1. Die Schnitte wurden im Warmbad bei 56°C 1 Stunde lang erwärmt.
2. Die Schnitte wurden zweimal für 5 Minuten mit Xylol gewaschen und anschließend jeweils zweimal 2 Minuten lang mit 100%, 95%, 70% und 50% Ethanol dehydriert, woraufhin nochmals zwei 2-minütige Waschschrirte mit ddH₂O folgten.
3. Die Schnitte wurden mit einer Picro-Sirius Red Lösung behandelt und 60 Minuten lang bei Raumtemperatur angefärbt.
4. Die Schnitte wurden zweimal mit angesäuertem Wasser gewaschen, woraufhin das Wasser von den Schnitten durch Schütteln entfernt wurde.
5. Abschließend wurden die Schnitte zweimal je 10 Sekunden lang mit 100% Ethanol dehydriert, in Xylol gewaschen und mit Einbettungsmedium und Deckblättchen fixiert.

Silber-Färbung

Für die Silber-Färbung wurden entparaffinierte und rehydrierte Nierenschnitte wie folgt weiterverarbeitet:

1. Die Schnitte wurden in destillierten Wasser für 5 Minuten gewaschen.
2. Anschließend in Periodsäure für 15 Minuten gewaschen und erneut für 5 Minuten in destillierten Wasser gereinigt.

3. Die Schnitte wurden in Thiosemicarbazid 5 Minuten gewaschen und anschließend erneut für 5 Minuten in destillierten Wasser gereinigt.
4. Die Schnitte wurde mit einer Silber Lösung für 10 Minuten behandelt und anschließend kurz mit destillierten Wasser gereinigt.
5. Die Schnitte wurden in Goldchloridlösung für 15 Minuten behandelt und anschließend zweimal kurz mit destillierten Wasser gereinigt.
6. Die Schnitte wurden in Salpetersäure Formalin 1 Minute behandelt und anschließend zweimal kurz mit destillierten Wasser gereinigt, woraufhin eine längere Reinigung für 2 Minuten in destillierten Wasser stattfand.
7. Die Schnitte wurden in Mayer'schem Hämatoxin für 2 Minuten behandelt
8. Abschließend wurden die Schnitte 10mal in Eosin getränkt und anschließend mit 70% Ethanol dehydriert und mit einem Deckblättchen präpariert.

Immunhistochemische Färbungen

Für immunhistochemische Färbungen wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wie folgt weiterverarbeitet:

1. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 20 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln mit einer Lösung aus 10 ml Wasserstoffperoxid (30%) und 80 ml Methanol inkubiert und anschließend 5 Minuten lang mit PBS gewaschen.
2. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in einer kochenden Pufferlösung von 10 mM Natriumcitrat (pH 6) inkubiert, abgekühlt und dann 5 Minuten lang in PBS gewaschen.
3. Zur Blockierung des endogenen Biotins wurden die Schnitte zunächst 15 Minuten lang mit einem Tropfen Avidin inkubiert. Nach kurzem Waschen mit PBS wurden die Schnitte 15 Minuten lang mit einem Tropfen Biotin behandelt, um freie Biotin-Bindungsstellen abzusättigen (Avidin/Biotin Blocking Kit, SP-2001, Vector Laboratories). Anschließend wurde kurz mit PBS gewaschen.
4. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungen wurden die Gewebeschnitte 10 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 10% Ziegen Serum inkubiert.
5. Zur Inkubation mit spezifischen primären Antikörpern wurden die Schnitte eine Stunde lang bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit den primären

Antikörpern (siehe Tabelle 5) inkubiert und anschließend sieben Minuten lang in PBS gewaschen.

6. Die Inkubation der Schnitte mit biotinylierten Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 5) erfolgte 30 Minuten lang bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte 7 Minuten lang in PBS gewaschen.
7. Die Schnitte wurden 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit einer Avidin-Biotin-Komplexlösung behandelt und anschließend in PBS und Tris-HCl-Puffer gewaschen.
8. Um die immunhistochemisch-markierten Epitope für die Durchlichtmikroskopie sichtbar zu machen, wurden die Schnitte in 200 ml einer 37°C-warmen Lösung entwickelt, die Tris/HCl Buffer, 4 ml DAB-Arbeitslösung, 1 ml 8%-iges Nickelchlorid (zur Stabilisierung und Intensivierung der Färbung von braun zu schwarz) sowie 500 µl 3%-iges Wasserstoffperoxid enthielt. Die Schnitte wurden schließlich mit Methylgrün für 2 Minuten gegengefärbt.
9. Die Schnitte wurden durch jeweils 10 Sekunden Inkubationen mit schrittweise 96%, 100% und Xylol dehydriert und abschließend mit Deckblättchen fixiert. Alle Objektträger wurden am Ende des beschriebenen Färbungsverfahrens mit VectaMount abgedeckt.

Tabelle 5: Primäre und sekundäre Antikörper

Färbung	Primärer-AK	Sekundärer AK
ERHR3	T-2012 (BMA Biomedicals)	BA-4001 (Vector)
CD206	LS-B9805 (LS Bio)	ZRB1001 (Linaris)
Ly6B2/Neutrophile	MCA771GA (SeroTec)	BA-4001 (Vector)

3.3.3 Histopathologische Befundung

Auswertung der PAS Färbungen

Das Ausmaß der Nierenschädigung der Versuchstiere wurde anhand eines semi-quantitativen Bewertungssystems ermittelt. Hierzu wurden die Nierenschnitte nach PAS Färbung bei 200-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop (Leica D II) systematisch abgetastet und hinsichtlich der vier Parameter tubuläre Nekrose, tubuläre Dilatation, Castformation und Verlust des Bürstensaumes bewertet. Die Parameter wurde entsprechend

der Schädigung innerhalb einer Skala von 0 bis 5 bewertet, wie in Tabelle 6 beschrieben. Die Quantifizierung wurde als Mittelwert \pm SD in Prozent angegeben.

Tabelle 6: PAS Score

Parameter	Score	Schaden [%]
Tubuläre Nekrose	0	0
Tubuläre Dilatation	1	1 bis 9
Castformation	2	11 bis 25
Verlust des Bürstensaumes	3	26 bis 45
	4	46 bis 75
	5	76 bis 100

Die Anzahl der Adeninkristalle wurde anhand der PAS-gefärbten Nierenschnitte unter 10-facher mikroskopischer Vergrößerung durch systematische Bilderhebung ermittelt.

Auswertung aller anderen Färbungen

Zur semi-quantitativen Auswertung der Nierenschnitte wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (Leica D II) der Picro-Sirius Red Färbungen (10-fache Vergrößerung) und der immunhistochemischen Färbungen (2,5-fache Vergrößerung) angefertigt. Mithilfe der Software ImageJ (Fiji) wurden die Aufnahmen wie folgt analysiert und quantifiziert:

1. Die Farbaufnahmen (RGB) wurden in drei Graustufenkanäle aufgetrennt. Zur Weiterbearbeitung dienten lediglich die Aufnahmen des Grünkanals.
2. Die Aufnahmen wurden beschnitten, indem die Außenränder der Nieren mit einem Polygon Werkzeug abgefahren wurden. Anschließend wurden freie Flächen gelöscht, sodass ausschließlich das Nierengewebe Inhalt der Bildaufnahmen war.
3. Die Anzahl dunkler Pixel wurde anhand festgelegter Schwellenwerte je Färbung ermittelt. Die Anzahl markierter Pixel im Verhältnis zur Gesamtpixelzahl wurde zur Berechnung der gefärbten Regionen daher prozentual angegeben.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Kreatinin Bestimmung

Die Bestimmung der Kreatininkonzentration im Blutplasma von Versuchstieren erfolgte nach der Jaffé'-Methode mithilfe eines Analysekits (Creatinin FS, DiaSys Diagnostic System

GmbH). Die im Kit verwendete Pikrinsäure bildet unter alkalischen Bedingungen einen orange-gelben Farbkomplex mit Kreatinin, dessen Absorption photometrisch bei der Wellenlänge von 492 nm analysiert wird. Als Standardreihe wurde das im Kit mitgelieferte Kreatinin verwendet, wobei 0 bis 5 mg/dl eingesetzt wurden. Die Blutplasmaproben der Versuchstiere wurden unverdünnt eingesetzt (10 µl). Außerdem wurden zwei Negativproben mit jeweils 10 µl ddH₂O verwendet, um bei der späteren Auswertung das Hintergrundsignal zu subtrahieren. Alle Proben wurden auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die Arbeitslösung, welche Pikrinsäure enthielt, wurde aus den Reagenzien R₁ (vier Volumenanteile) und R₂ (ein Volumenanteil) nach Herstellerangaben hergestellt; davon wurden 200 µl pro Well und Probe eingesetzt. Nach Zugabe erfolgte die erste Absorptionsmessung (492 nm) nach 60 Sekunden Inkubationszeit, die zweite nach 180 Sekunden. Die Absorptionsmesswerte beider Zeitpunkte wurden anschließend voneinander subtrahiert (erster Absorptionsmesswert - zweiter Absorptionsmesswert - Mittelwert der Negativprobe ddH₂O). Die Kreatininmesswerte (Angabe in mg/dl) der unbekanntenen Proben konnten schließlich anhand der Standardreihe mit bekannten Konzentrationen und der erstellten linearen Regression ermittelt werden.

3.4.2 BUN Bestimmung

Die Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Blutplasma der Versuchstiere erfolgte indirekt mittels einer gekoppelten enzymatischen Umsetzung mittels eines Analysekits (Urea FS, DiaSys Diagnostic System GmbH). Hierbei wird im ersten Schritt Harnstoff durch Urease in Ammoniumionen und Hydrogencarbonat gespalten. Im zweiten Schritt werden die erzeugten Ammoniumionen und α -Ketoglutarat unter Verbrauch von NADP(H) durch die Glutamatdehydrogenase zu L-Glutamat umgesetzt. Die Abnahme von NADP(H) in der Probe ist proportional zum Umsatz von Ammoniumionen und kann photometrisch bei 340 nm verfolgt werden. Für die Messung wurden stets 2 µl der Blutplasmaproben der Versuchstiere unverdünnt eingesetzt. Der im Testkit mitgelieferte Harnstoff wurde für die Standardreihe in einer Konzentrationsreihe verwendet, wobei die Volumenunterschiede mit ddH₂O kompensiert wurden. Zusätzlich wurden Negativproben mit je 2 µl ddH₂O gemessen, um das Hintergrundsignal zu bestimmen. Alle Proben wurden in Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert. Gemäß den Herstellerangaben wurde die Arbeitslösung, die aus Urease, Glutamatdehydrogenase, α -Ketoglutarat und NADP(H) bestand, aus den Reagenzien R₁ (4 Volumenanteile) und R₂ (1 Volumenanteil) hergestellt. Davon wurden 200 µl je Well/Probe

pipettiert. Die erste Absorptionsmessung bei 340 nm erfolgte nach 60 Sekunden Reaktionszeit, die zweite nach 180 Sekunden. Die Absorptionswerte beider Zeitpunkte wurden voneinander subtrahiert (erster Absorptionswert - zweiter Absorptionswert - Mittelwert der Werte der ddH₂O-Probe). Anschließend konnte mit Hilfe der Harnstoff-Standardreihe und der Erstellung einer linearen Regression die Harnstoff-Konzentrationen der unbekannt Proben in mg/dl ermittelt werden.

3.4.3 Zelltodbestimmung mittels Laktatdehydrogenase-Reaktion

Zum Nachweis des Zelltodes von Makrophagen in Zellkultur wurde der Zellkulturüberstand mithilfe eines Kits (Cytotoxicity Detection Kit/LDH, Roche) analysiert. Hierbei wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) durch eine gekoppelte enzymatische Reaktion bestimmt. Im ersten Reaktionsschritt wird NAD⁺ durch die LDH-katalysierte Umwandlung von Lactat in Pyruvat zu NADH/H⁺ reduziert. Im zweiten Schritt überträgt das Enzym Diaphorase H/H⁺ von NADH/H⁺ auf den Farbstoff Tetrazolium (gelb), das dadurch zu Formazan (rot) reduziert wird. Die Messung bestand aus den folgenden Schritten:

1. Ein Volumen von 100 µl des Zellkulturüberstandes wurden pro Well einer 96-Well-Platte überführt. Außerdem wurden gleiche Volumina von Positiv- und Negativkontrollen in einzelne Wells pipettiert.
2. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Reaktionsreagenzes (1 Volumenanteil Katalysator, 45 Volumenanteile Farbstofflösung) in die Wells hinzugefügt und für 30 Minuten inkubiert.
3. Die Absorption des Farbstoffs wurde bei der Wellenlänge von 492 nm verfolgt, was direkt mit der Menge von LDH im Zellkulturüberstand korrelierte. Die Zytotoxizität (Angabe in Prozent) wurde anhand der folgenden Formel berechnet.

$$\text{Zytotoxizität} = \frac{\text{erwartetes Ergebnis} - \text{Kontrolle niedrig}}{\text{Kontrolle hoch} - \text{Kontrolle niedrig}} \times 100$$

Detaillierte Serumanalyse und hämatologische Zellanalyse

Blutproben der Versuchstiere wurden wie in 3.1.9 beschrieben vorbereitet und an der German Mouse Clinic des Helmholtz Zentrum München einer detaillierten Serumanalyse und hämatologischen Zellanalyse unterzogen.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Durchflusszytometrie

Zur genauen Bestimmung der intrarenalen Immunzellpopulationen, insbesondere der Makrophagen, wurde die Methode der Durchflusszytometrie (FACS) benutzt. Die zu diesem Zweck verwendeten fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörper sind in Tabelle 7 aufgeführt. Alle Analysen wurden mit dem GERÄT FACSCanto II (BD Biosciences) durchgeführt.

Probenaufbereitung der Nieren

Sämtliche Gewebeproben wurden bei 4°C bzw. auf Eis und unter Verwendung von 4°C-kalten Reagenzien und Lösungen präpariert, sofern nicht anders angegeben.

Nach Entnahme der Nieren wurde jedes Organ einzeln in 2 ml eines Verdauungspuffers (2 ml PBS mit 8 mg Kollagenase und 2000 U DNase I) transferiert und mit der Rückseite einer 2-ml-Spritze vorsichtig in kleine Stücke zermahlen. Anschließend wurde die grobe Gewebesuspension 40 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die grobe Suspension mit einer 2-ml-Spritze aufgezogen und dreimal durch eine 20-G und dreimal durch eine 25-G Nadel zur Homogenisierung gedrückt. Die daraus resultierende Gewebesuspension wurde durch einen 30 µm Siebfilter in ein 15-ml-Falconröhrchen überführt und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 300 g wurde der Überstand abgenommen und die abzentrifugierten Zellen in 900 µl PBS resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 100 µl magnetische CD45-markierte MicroBeads (Miltenyi Biotec, Deutschland) vorsichtig auf- und abpipettiert und anschließend für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Gesamtzellpopulation (markierte und unmarkierte Zellen) mit 10 ml PBS gewaschen und 10 Minuten lang bei 300 g zentrifugiert, wobei der Überstand erneut abpipettiert und die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert wurden. Die teilweise magnetisch CD45-markierte Zellsuspension wurde nun mit Hilfe einer Trennsäule und Magnetvorrichtung in CD45⁺ und CD45⁻ Zellpopulationen separiert. Nach Waschen der Trennsäule mit PBS wurde die Gesamtzellpopulation auf die Trennsäule aufgebracht und die unmarkierten, CD45⁻ Zellen in drei aufeinander folgenden Waschschrritten mit je 3 ml PBS in ein 15-ml Falconröhrchen eluiert, wogegen die CD45⁺ Zellen auf der Trennsäule haften blieben. Die Trennsäule mit den CD45⁺ Zellen wurde anschließend von der magnetischen Vorrichtung gelöst und in ein neues

15-ml-Falcon gesetzt. Die Trennsäule wurde nun unter Druck mit 5 ml PBS gespült, wobei ein mitgelieferter Kolben verwendet wurde, um alle CD45⁺ Zellen von der Säule zu lösen. Anschließend wurden sowohl die CD45⁺ als auch die CD45⁻ Zellsuspensionen bei 300 g abzentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 450 µl PBS resuspendiert.

Probenaufbereitung des Blutes

Den Tieren wurde Blut entnommen, welches mit EDTA versetzt und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur mit Ammoniumchlorid-Lösung inkubiert wurde, um die im Blut enthaltenen Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde die Zellsuspension in 5 ml PBS gewaschen, bei 300 g abzentrifugiert und wiederum in 450 µl PBS resuspendiert.

Probenaufbereitung von Makrophagen in Zellkultur

Makrophagen in Zellkultur wurden von zwei bis drei Wells einer 6-Well Platte mit EDTA/Trypsin abgelöst und in ein 15-ml Falconröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml PBS gewaschen, bei 300 g abzentrifugiert und die gesammelten Makrophagen erneut in 450 µl PBS resuspendiert.

Färbung der Zellpopulationen für Durchflusszytometrieanalysen

Zur Identifizierung spezifischer Zellpopulationen wurden CD45⁺ Zellen aus dem Blut und der Niere sowie der Makrophagen-Zellkultur mit spezifischen Fluoreszenz-Antikörpern markiert. Zunächst wurde jeder Zellprobe 1 µl Fc-Rezeptorblocker zugesetzt, um eine unspezifische Bindung der jeweiligen Antikörper an Fc-Rezeptoren auf den Zielzellen zu verhindern. Nach 5-minütiger Inkubation wurde ein Mastermix aus mehreren Antikörpern (jeweils 1,4 µl) zu jeder Probe hinzugegeben (siehe Tabelle 7). Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen in zwei Durchgängen mit FACS-Puffer (PBS, 2% Fetales Rinder Serum (FBS), 0,05% Natriumazid und 2 mM EDTA) gewaschen, bei 300 g abzentrifugiert und in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Neben den eigentlichen Proben wurden parallel die Kontrollen zur Kalibrierung des FACSCantoTM II (wurde für die Analyse der Nieren genutzt) oder FACSCalibur (wurde für die Analyse des Bluts genutzt) vorbereitet, wobei jeder Antikörper zu je 200 µl des Nierengemischs zugegeben wurde. Die markierten Zellen wurden bis zur Durchführung der Durchflusszytometrie (FACS)-Analyse bei 4°C in 5 ml Falconröhrchen gelagert.

Zellzyklus-Analyse mit der Durchflusszytometrie

Die Analyse der Zellzyklusstadien anhand der Durchflusszytometrie basiert auf dem DNA-Gehalt der Zellen im Verlauf des Zellzyklus. Bei Zellen in der G₀/G₁-Phase liegt die DNA in einfacher Kopienzahl vor, in Zellen der G₂/M-Phase dagegen in doppelter Kopienzahl. Zellen in der S-Phase, wenn DNA repliziert wird, enthalten eine Kopienzahl der DNA, die sich zwischen dem einfachen bzw. doppelten Gehalt befindet. Die Anfärbung der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen wie beispielweise Propidiumiodid (PI) ermöglicht somit die Quantifizierung der beschriebenen Zellstadien anhand einer Durchflussanalyse.

Nach Inkubation der kultivierten Makrophagen mit Adeninkristallen (+/-) und Inhibierung von p53 durch Pifithrin- α (+/-) in 8-Well-Schalen (siehe Makrophagen-Zellkultur (Kapitel 3.6)) wurden die Zellen wie folgt für die FACS-Analyse vorbereitet. Das Medium wurde in der Sicherheitswerkbank aus den Kulturschalen abgesaugt, so dass die adhärierenden Makrophagen zurückblieben. Anschließend wurden pro Zell-Kammer der 8-Well-Schalen jeweils 500 μ l DPBS pipettiert und die Zellansätze für fünf Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Nach Absaugen wurden anschließend 100 μ l/Kammer eines EDTA-haltigen DPBS-Puffers zugegeben, der durch eine 1:20 Verdünnung einer 0,5 M EDTA-Lösung mit DPBS hergestellt wurde. Anschließend wurden die Zellen ca. 24 Stunden bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Dadurch wurde ermöglicht, dass sich die Makrophagen vom Boden der Kammern ablösten. Die Zellsuspensionen wurden dann in FACS-Röhrchen transferiert, zentrifugiert (10 min bei 200 x g; 4°C) und der Überstand abgenommen. Die jeweiligen Zellpellets wurden anschließend in 200 μ l PI- und Triton X-100-haltiger Färbelösung (5 ml DPBS; 5 μ l Triton X-100; 50 μ l DNase-freie RNase A; 300 μ l PI-Lösung (500 μ g/ml)) resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation der Suspensionen bei 37°C wurde diese danach auf Eis gelagert. Kurz vor Beginn der eigentlichen FACS-Analyse wurde den Proben 50 μ l einer „AccuCheck Counting Beads-Lösung“ zugegeben, um die absoluten Zellzahlen zu bestimmen [125].

Für die Durchflusszytometrie wurde das Gerät FACSCaliburTM verwendet, als Software das Programm CellQuestTM Pro. In dieser Anwendung wurden vier Diagramme benötigt, zwei Punktdiagramme und zwei Histogramme. Im ersten Punktdiagramm wurde die Vorwärts-Streuung (*Forward Scatter*, FSC) gegen die Seitwärts-Streuung (*Side Scatter*, SSC) aufgetragen, im zweiten Diagramm wurde die Transit-Zeit (*Width*, FL2-W) gegen die Gesamt-Fluoreszenz (*Area*, FL2-A) der jeweiligen Zellen untersucht. In den Histogrammen

entsprach die X-Achse der maximalen Intensität des Fluoreszenz-Signals (*Height*, FL2-H) bzw. der gesamten Fluoreszenz (FL2-A), die Y-Achse beider Diagramme der Anzahl der Zellen. Um tote Zellen, Zelldebris und Zellaggregate von der Analyse auszuschließen, wurde in beiden Punktdiagrammen jeweils ein Fenster, das sogenannte „Gate“, gesetzt. So tauchten im zweiten Punktdiagramm (FL2-W vs. FL2-A) nur Zellen auf, die sich innerhalb des Fensters im ersten Punktdiagramm (FSC vs. SSC) befanden. Beide Histogramme enthielten nur Ereignisse, die innerhalb des „Gates“ im zweiten Punktdiagramm registriert wurden. Gestoppt wurde die Messung, sobald 10.000 Ereignisse im zweiten „Gate“ erreicht wurden [126].

Tabelle 7: Zusammensetzung der Antikörper zur Identifizierung der Zellpopulationen

Zellpopulation	CD45	CD11b	Ly6g	F4/80	CD11c	Cx3cr1	Ccr2	Mhcll	Ly6c	CD206
Leukozyten	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Neutrophile	+	+	+	-	-	-	-	-	low	-
Monozyten	+	+	-	-	-	-	+	-	high	-
Dendritische Zellen	+	+	-	-	high	-	-	+	-	-
Makrophagen	+	+	-	+	low	-	-	-	-	-
M1-Makrophagen	+	+	-	+	low	+	-	+	-	-
M2-Makrophagen	+	+	-	+	low	+	-	+	-	+

Auswertung

Die Datenanalyse wurde mit der Software FlowJo (Version 10.0.7, Tree Star Inc.) durchgeführt. Die Gating-Strategie für die Identifizierung verschiedener Makrophagen-Populationen sowie Monozyten und Neutrophile in der Niere ist in Abbildung 8 dargestellt. Demnach wurden im FSC-SSC-Plot erst die Immunzellen identifiziert und im nächsten Schritt die Leukozyten, wie Neutrophile, Monozyten und Makrophagen, abhängig von der Expression der Antikörper (siehe Tabelle 7). Diese quantitative Analyse ermöglichte es neben den prozentualen Anteil der jeweiligen Zellpopulation auch die absolute Anzahl an Zellen mit Counting Beads (Invivogen) zu ermitteln.

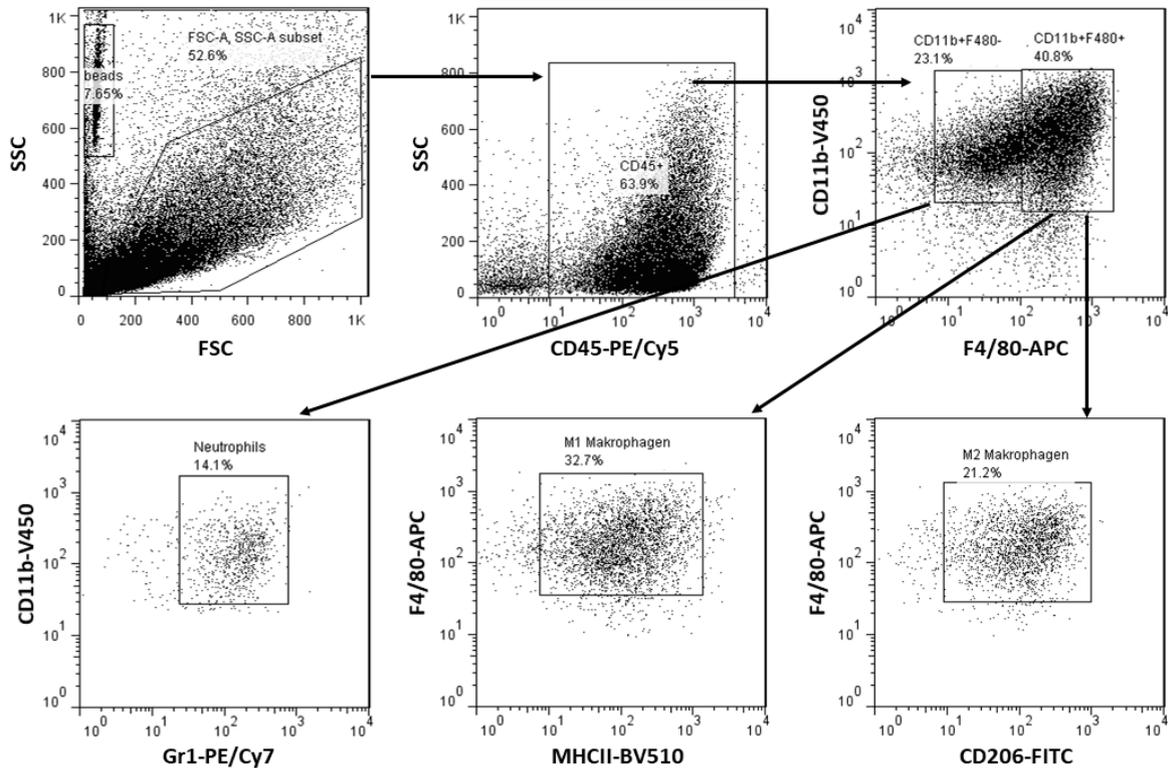


Abbildung 8: Gating-Strategie für die Zytometrieanalysen von Makrophagen in der Niere. Darstellung der Gating-Strategie zur Identifizierung von Leukozyten (CD45+ Zellen), Neutrophilen (CD45+CD11b+F4/8o-Gr1+), Makrophagen (CD45+CD11b+F4/8o+), und den Makrophagen-Populationen M1 (CD45+CD11b+F4/8o+MHCII+) und M2 (CD45+CD11b+F4/8o+CD2o6+) in den Nieren der Mäuse.

3.5.2 Enzymimmunoassay (ELISA)

Zur Detektion des pro-entzündlichen Zytokins IL-6 im Zellkulturmedium von den durch M-CSF differenzierten Makrophagen wurde ein Enzymimmunoassay anhand eines Kits (Mouse IL-6 ELISA Set, BD OptEIA) nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs durchgeführt. Hierbei wird der zu messende Analyt, in meinem Fall IL-6, zwischen zwei primären anti-IL6 Antikörpern gebunden, die jeweils ein anderes Epitop von IL-6 erkennen - dem Capture-Antikörper, der auf die Platte beschichtet wird, und dem Detektionsantikörper, der durch eine Enzymreaktion nachgewiesen wird. Die Vorgehensweise zur IL-6 Detektion durch diese Sandwich-Methode war wie folgt:

1. 100 µl des in einem Beschichtungspuffer (0.1 M Natrium Karbonat, 7.13 g NaHCO₃, 1.59 g Na₂CO₃; zu pH 9.5 titriert) verdünnten Capture-Antikörpers (anti-Maus IL-6 Antikörper) wurden über Nacht bei 4°C jeweils in Vertiefungen einer 96-Well-Platte (MaxiSorp, Thermo Fisher) inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

2. Die Wells der Platten wurden mit 200 µl PBS/10% fetalem bovinem Serum 1 Stunde lang bei Raumtemperatur blockiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen.
3. Die Platten wurden mit 100 µl Proben (Makrophagenkultur-Überstände) bzw. Standardproben 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend fünfmal gewaschen.
4. Die Platten wurden mit 100 µl 10 ng/ml Detektions-Antikörper (Streptavidin-Meerrettichperoxidase-konjugiertem anti-Maus-IL-6) eine Stunde lang bei Raumtemperatur beschichtet und anschließend siebenmal gewaschen.
5. Die Platten wurden mit 100 µl Tetramethylbenzidin- und Wasserstoffperoxid-Substratmischung im Dunkeln ohne Abdeckung 30 Minuten lang beschichtet.
6. Die Platten wurden mit 50 µl Stopplösung (2 N H₂SO₄) versetzt.
7. Die Platten wurden innerhalb von 30 Minuten mit einem ELISA-Lesegerät zur Messung der Absorption bei 450 nm analysiert.
8. Eine Standardkurve mit bekannten IL-6 Konzentrationen wurde durch eine lineare Kurvenanpassung mit vier Parametern erstellt. Die IL-6-Konzentration im Medium der Makrophagenzellkultur wurde entsprechend berechnet.

3.6 Zellkultur Methoden

Die Kultivierung der Knochenmarkzellen erfolgte unter Standardbedingungen in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt der Luft. Um bei der Zellkultur Sterilität zu gewährleisten, wurden sämtliche Arbeiten unter einer Sterilbank durchgeführt, die durch einen laminaren Luftstrom, einen Filter und der kurzzeitigen UV-Licht-Bestrahlung vor Arbeitsbeginn eine keimfreie Umgebung garantierten. Sämtliche Materialien und Geräte wurden vor Benutzung mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und ebenfalls einer kurzzeitigen UV-Licht-Bestrahlung unterzogen.

3.6.1 Isolation von Knochenmarkszellen

Für die Isolation von primären Knochenmarkszellen wurden C57BL/6N Mäuse im Alter von 6 Wochen per zervikaler Dislokation euthanasiert. Unter einer sterilen Abzugshaube wurde die untere Extremität der Versuchstiere im Hüftgelenk abgetrennt, das Muskelgewebe von Femur und Tibia freipräpariert und die Knochen mit 70% Ethanol und PBS gereinigt. Anschließend wurden sie in serumfreies RPMI Medium überführt und die Markhöhle an den Epiphysen der Knochen geöffnet und anschließend mit einer 24-G Nadel mit 5 bis 10 ml

eisgekühltem serumfreien RPMI Medium gespült. Das gewonnene Knochenmark wurde in einem 50-ml Falconröhrchen aufgefangen, die Zellen anschließend durch einen 70 µl Siebfilter in ein frisches 50-ml-Falconröhrchen überführt und 7 Minuten lang bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nach Lyse der Erythrozyten mit 0,15 M NH₄Cl für 10 Minuten, wurden die Knochenmarkszellen in zwei Waschschritten mit jeweils 50 ml serumfreien RPMI Medium gewaschen (durch Zentrifugation bei 1200 rpm, 4°C). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen schließlich in 5 ml serumhaltigen RPMI Medium resuspendiert.

3.6.2 *In vitro* Differenzierung von Makrophagen

Nach Zählung wurden die Zellen in das Well einer 6-Well-Zellkulturplatte verteilt, wobei in jedes Well 3x10⁶ Zellen, 2 ml Zellkulturmedium (bestehend aus 1 ml serumhaltigen RPMI Medium und 1 ml serumhaltigen Makrophagen Medium) mit 30 ng/ml M-CSF ausplattiert wurden. Nach zweitägiger Inkubation (unter Standardbedingungen, s.o.) wurden weitere 2 ml Zellkulturmedium mit 30 ng/ml M-CSF zu den jeweiligen Wells hinzugefügt. An Tag 5 wurde das Medium gewechselt, indem der Überstand der Zellen abgesaugt und 2 ml frisches Zellkulturmedium mit 30 ng/ml M-CSF hinzugefügt wurde. Unter diesen Bedingungen differenzierten die aus dem Knochenmark gewonnene Zellen zu „BMMs“ (*bone marrow-derived macrophages*).

3.6.3 Stimulation von Makrophagen

Um die zu BMMs differenzierten Zellen zu aktivieren, wurde an Tag 6 das Zellkulturmedium abgesaugt und durch 2 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt, das mit 50 pg/ml Lipopolysaccharid (LPS) supplementiert war, um die Zellen zu primen. Nach 24 Stunden Inkubation wurde dieses entfernt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium überschichtet, welches mit unterschiedlichen Stimuli (siehe Tabelle 8) supplementiert war. Je nach experimentellen Bedingungen erfolgte eine Inkubation für 3, 8 bzw. 18 Stunden.

Tabelle 8: Zellkulturstimuli

Stimulus	Dosis
Kommerziell-Adeninkristalle	200 µg / ml, 500 µg / ml

Self made-Adeninkristalle

200 µg / ml, 500 µg / ml

LPS

100 ng / ml

Nach Stimulation der BMMs wurde der jeweilige Zellkulturüberstand in 2-ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die verbleibenden Zellen wurden mit dem Puffer des Isolationskits für Gesamt RNA (siehe 3.2.1) lysiert und unmittelbar zur Isolation der Gesamt-RNA weiterverarbeitet. Um ausreichend hohe Mengen von Gesamt-RNA/mRNA zu erhalten, wurden die Lysate von jeweils zwei bis drei Wells vereint.

Um zu untersuchen, ob die Stimulierung der zu BMM differenzierten Zellen einen Einfluss auf deren Zellzyklus besitzt, und ob p53 dabei eine Rolle spielt, wurde in einem der Experimente den Zellen an Tag 7 neben dem frischen Zellkulturmedium (supplementiert mit verschiedenen Stimuli [siehe Tabelle 8]), der p53-Inhibitor Pifithrin- α (Endkonzentration 100 nmol) zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 72 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und die Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse vorbereitet.

3.7 *In chemico* Herstellung von Adeninkristallen

Zur Herstellung von Adeninkristallen *in chemico* wurden 200 mg Adenin (Sigma-Aldrich) in 8,5 ml ddH₂O in einem 20 ml Becherglas gelöst. Anschließend wurden 1,5 ml einer 1 M HCl-Lösung hinzugefügt. Zur Auskristallisierung von Adenin wurde die Lösung über Nacht bei 4°C gekühlt. Anschließend wurden die Kristalle mithilfe eines Ultraschall-Gerätes (Bronson Sonic Power Company) in kleinere Einzelstücke zertrümmert. Nach Absetzen der Kristalle wurde der Überstand der Suspension vorsichtig abpipettiert und die verbleibenden Kristalle mit 1 ml 100%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Kristalle bei



Abbildung 9: *In chemico* hergestellte Adeninkristalle. Unter dem Lichtbildmikroskop mit Polarisation dargestellt

37°C in einen Brutschrank 6 Stunden lang getrocknet, erneut in PBS resuspendiert (in einem

Verhältnis von 1 mg/10 µl Volumen PBS), autoklaviert, bevor sie bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

3.8 Statistische Auswertung

Vor Anwendung weiterer statistischer Methoden wurde zuerst der Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest, der Levene-Homoskedastizitätstest und der Grubb-Ausreißertest auf die jeweiligen Datensätze angewendet. Je nach Datensatz wurden unterschiedliche statistische Tests angewendet. Der Student's t-Test wurde für den Vergleich von zwei normalverteilten Gruppen verwendet. Bei zwei nicht normalverteilten Gruppen wurde dagegen der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Bei mehr als zwei Gruppen wurden die normalverteilten und homoskedastischen Datensätze mittels einseitiger Varianzanalyse (ANOVA) mit Tukey's Post-Test ausgewertet. Im Falle von Heteroskedastizität wurde der Post-hoc Games Howell Test verwendet. Bei der Verwendung von zwei Parametern mit mehreren Gruppen wurde eine Zwei-Wege-ANOVA mit Bonferroni's post-hoc-Test durchgeführt. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism (v9.4.1, California, USA) durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, sind die Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben. Unterschiede wurden wie folgt als signifikant angesehen: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; nicht signifikante Unterschiede (n.s.) wurden entsprechend gekennzeichnet. Der Stichprobenumfang wurde in der Legende der jeweiligen Abbildung angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Effekt von Adeninkristallen auf die Funktionen von Makrophagen *in vitro*

Makrophagen spielen bei der CKD eine entscheidende Rolle [81, 82]. Bisher ist nur wenig über die Effekte von Adeninkristallen auf die Funktionen von Makrophagen bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, dies genauer zu untersuchen. Dafür wurden aus dem Knochenmark von

C57BL6/N Mäusen isolierte Monozyten in Kultur über einen Zeitraum von sieben Tagen mithilfe von M-CSF zu Makrophagen ausdifferenziert. Nach Priming mit LPS wurden die Makrophagen entweder mit kommerziell-erhältlichen Adeninkristallen (200 µg Adenin/ml Medium, c-Adenin) oder mit selbst-hergestellten Adeninkristallen (200 µg Adenin/ml Medium, sm-Adenin), die vorher auskristallisiert, sonifiziert und sterilisiert wurden, für drei Stunden stimuliert (Abbildung 10). Als positive Kontrolle für eine Immun-Stimulation wurden Makrophagen auch mit LPS inkubiert. Nach dreistündiger Inkubation wurden die Makrophagen geerntet und die Gesamt-RNA isoliert, um die mRNA Expression von proinflammatorischen Zytokinen und spezifischen Markern von M1- und M2-ähnlichen Makrophagen mittels RT-qPCR zu quantifizieren.

Nach Stimulation mit beiden Adeninkristall-Präparationen (c-Adenin und sm-Adenin) im Vergleich zur Kontrolle (Medium) konnten nach dreistündiger Inkubation deutlich -und teilweise signifikant- erhöhte mRNA Expressionswerte der proinflammatorischen Zytokine *Tnf-α* und *Il-6* sowie von *ASC*, eines *Nlrp3* Inflammasomen-relevanten Gens, detektiert werden (Abbildung 10B). Nach Exposition mit LPS waren ebenso im Vergleich zur Kontrolle signifikant zunehmende mRNA Expressionswerte aller proinflammatorischen Marker zu beobachten, allerdings waren die mRNA Expressionswerte deutlich höher als die nach Stimulation mit Adeninkristallen (Abbildung 10B).

Zudem induzierten c-Adeninkristalle einen Anstieg der Expression von M2-ähnlichen Makrophagen-spezifischer Genen, wie *Cd206* und *Arginase1 (Arg1)*, im Vergleich zur Medium-Kontrolle nach dreistündiger Stimulation (Abbildung 10C). Hingegen konnte zwischen sm-Adenin-Kristallen und Medium kein Unterschied in den mRNA Expressionswerten von *Cd206* und *Arg1* detektiert werden (Abbildung 10C). Bezüglich der mRNA Expression des M1-ähnlichen Makrophagen Gen *iNos* zeigten die Daten, dass Adeninkristalle keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Expression von *iNos* hatten, anders als LPS. LPS ist bekannt dafür, einen pro-inflammatorischen Phänotyp zu induzieren [127].

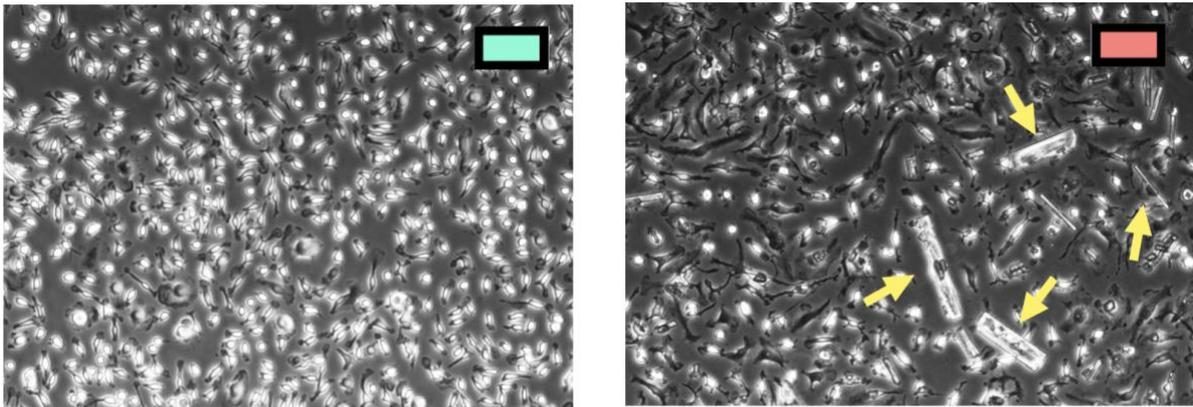
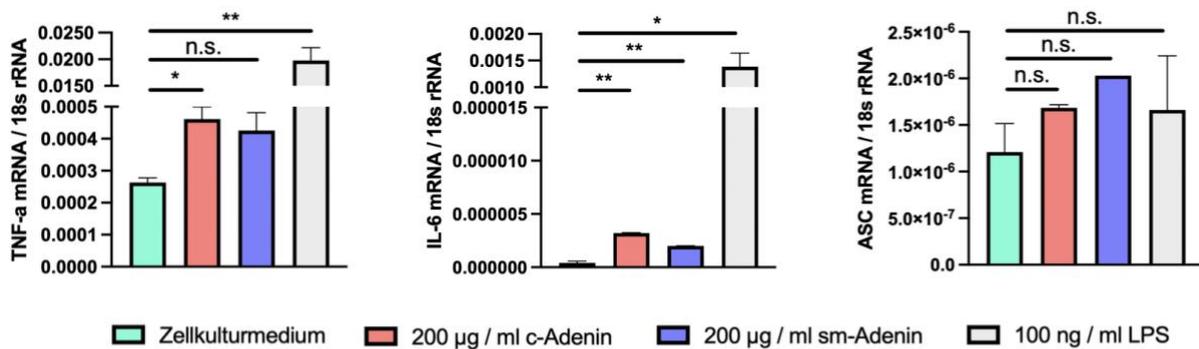
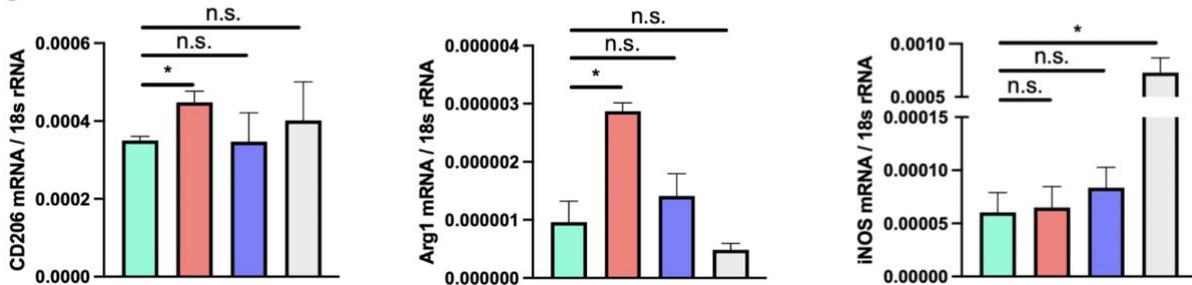
A**B****C**

Abbildung 10: Adeninkristalle aktivieren Makrophagen in Zellkultur. Monozyten wurden aus dem Knochenmark von sechs Wochen alten C57BL/6N Mäusen gewonnen und 7 Tage mit M-CSF (mit regelmäßigem Mediumwechsel) zu Makrophagen differenziert. Anschließend wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, welches mit 200 µg/ml Adeninkristallen supplementiert war. Kontrollzellen erhielten Medium mit 100 ng/ml LPS bzw. reines Medium. (A) Repräsentative Bilder der Makrophagen in der Zellkulturschale nach 3 Stunden Inkubation in Zellkulturmedium (links) und 200 µg/ml c-Adenin (rechts) (Pfeile = Kristalle). Nach 3 Stunden Inkubation mit Adeninkristallen (c- und sm-Adeninkristalle), LPS bzw. Kontrollmedium wurde dieses entfernt, die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und die mRNAs in cDNAs umgeschrieben. Die mRNA Expressionen der Gene *Tnf-α*, *Il-6*, *Asc* (B) sowie *Cd206*, *iNos*, *Arg1* (C) wurden mittels qRT-PCR und Normierung zu 18S rRNA quantifiziert. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (Daten von mindestens zwei unabhängigen Versuchsreihen, gemessen jeweils in Duplets, unverbundener T-Test, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****), $p \geq 0,05$ (n.s. = nicht signifikant)).

Um herauszufinden, ob Adeninkristalle über einen längeren Stimulationszeitraum einen Einfluss auf die proinflammatorischen Funktionen von Makrophagen haben, wurden Makrophagen mit c- und sm-Adeninkristallen (200 µg/ml) aktiviert und die mRNA Expressionswerte von *Il-6* und *Arg1* mittels RT-qPCR nach drei, acht bzw. 18 Stunden bestimmt (Abbildung 11). Nach Exposition mit beiden Adeninkristall-Präparationen konnte in der Tat über den Zeitraum von drei bis 18 Stunden ein gradueller und - im Fall von *Arg1* - signifikanter Anstieg der mRNA Expression beobachtet werden (Abbildung 11A). Diese Resultate zeigen, dass Adeninkristalle eine proinflammatorische Reaktion in Makrophagen induzieren und eine Differenzierung sowohl in proinflammatorische M1-ähnliche als auch alternativ aktivierte M2-ähnliche Makrophagen begünstigen.

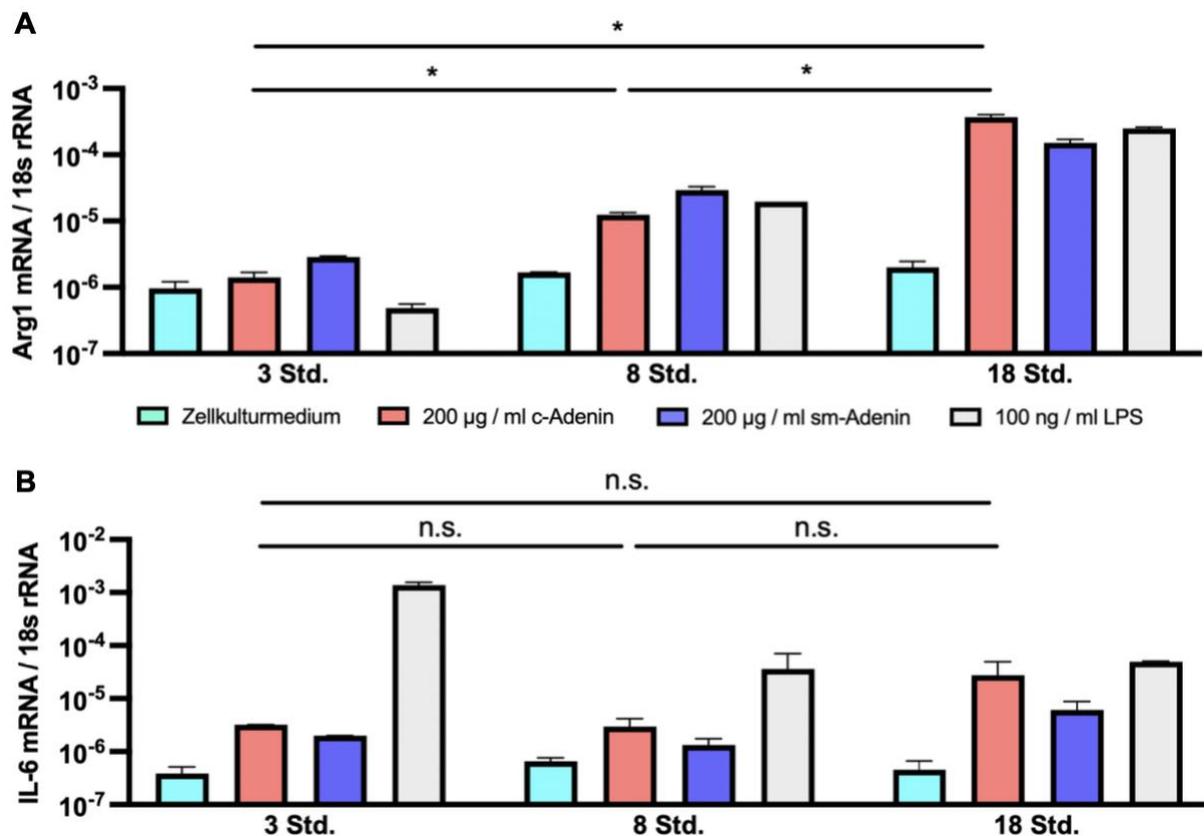


Abbildung 11: Ein mit Adenin übersättigtes Zellkulturmedium führt zur Induktion der Expression von *Arg1* und *Il-6* in Makrophagen in Zellkultur. Monozyten wurden aus Knochenmark von sechs Wochen alten C57BL/6N Mäusen gewonnen und 7 Tage in M-CSF (mit regelmäßigem Mediumwechsel) zu Makrophagen differenziert. Anschließend wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, welches mit Adenin supplementiert war (200 µg/ml). Kontrollzellen erhielten Medium mit 100 ng/ml LPS bzw. reines Medium. Induktion der Expression von *Arg1* (A) und *Il-6* (B) mRNAs nach 3, 8 und 18 Stunden Inkubation mit Adenin-übersättigtem Medium bzw. Kontrollmedium. Die mRNA Expression wurde anschließend quantifiziert. Die

Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (Daten von mindestens zwei unabhängigen Versuchsreihen, gemessen jeweils in Duplets, unverbundener T- Test, $p < 0.05$ (*), $p \geq 0,05$ (n.s. = nicht signifikant)).

Obwohl diese Experimente mit *in vitro* kultivierten Makrophagen erste Hinweise dafür liefern, dass eine Exposition mit Adeninkristallen zur erhöhten mRNA Expression von Immunregulatoren wie *Tnf- α* und *Il-6* führt und die Polarisation von M1- und M2-ähnlichen Makrophagen begünstigt, ist bisher unklar, ob Adeninkristalle zytotoxisch auf Makrophagen wirken. Um dies zu untersuchen, wurden nach drei-stündiger Inkubation die Zellüberstände der aktivierten Makrophagen gesammelt, um das Ausmaß der Zytotoxizität durch Freisetzung von LDH mittels kolorimetrischen Assay zu messen. Wie in Abbildung 12 zu erkennen, induzierten c- und sm-Adeninkristalle einen – im Falle von sm-Adenin - signifikanten Anstieg von LDH im Vergleich zur Medium-Kontrolle und LPS; das heißt, dass die Zellintegrität der Makrophagen nach Inkubation mit Adeninkristallen vermindert ist.

In Übereinstimmung mit der zuvor nachgewiesenen mRNA Expression von *Il-6* nach 18-stündiger Inkubation mit beiden Adeninkristall-Präparationen (Abbildung 12B) konnte auch auf Proteinebene die Expression und Sekretion von IL-6 nachgewiesen werden. Nach Zugabe von Adeninkristallen war die Konzentration von IL-6 ca. 18- bzw. 10-fach erhöht im Vergleich zum Kontrollmedium; die Zunahme war allerdings statistisch nicht signifikant (Abbildung 12). Die Stimulation mit LPS führte hingegen zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von IL-6 bei Makrophagen im Vergleich zu Adeninkristallen und Medium (Abbildung 12).

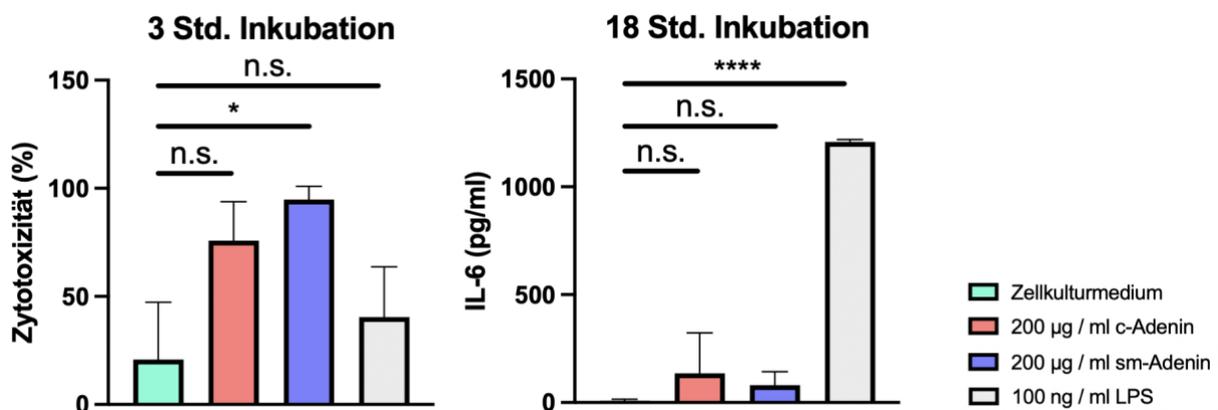


Abbildung 12: Adeninkristalle induzieren ein zytotoxisches und pro-entzündliches Makrophagen Milieu. Monozyten wurden wie in Abbildung 10 beschrieben isoliert und für 7 Tage zu Makrophagen differenziert. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt, das mit Adeninkristallen in einer Konzentration von 200 µg pro Milliliter supplementiert war. Kontrollzellen erhielten Medium mit 100 ng pro Milliliter LPS bzw. reines Medium. Nach 3 bzw. 18 Stunden wurde das Medium gesammelt und abzentrifugiert,

um unlösliches Adenin zu präzipitieren. Im Überstand wurde die Anwesenheit von LDH bzw. IL-6 durch Enzymtest bzw. ELISA nachgewiesen. Einheiten sind anhand der jeweiligen Standardkurven normiert. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (Daten in Duplets bzw. Triplets gemessen, unverbundener T-Test, $p < 0.05$ (*), $p < 0.0001$ (****), $p \geq 0,05$ (n.s. = nicht signifikant)).

4.1.1 Exposition von *in vitro* kultivierten Makrophagen mit Adeninkristallen verändert das kontrollierte Zellzyklusverhalten der Zellen

Es ist bekannt, dass Zellen nach einer Gewebeverletzung den Zellzyklus aktivieren, um die Funktionsstörung des Organs zu verhindern. Durch eine AKI wird beispielsweise das Absterben von Podozyten aufgrund der Umgehung des G₂/M-Kontrollpunkts gefördert (siehe 1.4.3). Auch in typischerweise ruhenden Tubulusepithelzellen ist die Blockierung von p53 für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase essentiell (siehe 1.4.3). Vermutlich werden auch renale Entzündungsprozesse durch p53 kontrolliert: eine Funktion von p53 bei der Polarisierung zum M1- oder M2-Subtyp führt nachweislich zu einer Induktion von p53 [117].

Um zu untersuchen, ob nach Stimulation der *in vitro* kultivierten Makrophagen mit Adeninkristallen das Proliferationsverhalten der Zellen in Abhängigkeit von p53 verändert wird, wurden die *in vitro* kultivierten Makrophagen nach Inkubation mit Adeninkristall-Präparationen, LPS bzw. Medium zur Bestimmung ihres DNA-Gehalts mit Propidiumiodid markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Unter Standardbedingungen (ohne den p53-Inhibitor Pifithrin- α) stieg bei LPS-stimulierten Makrophagen im Vergleich zu Kontrollzellen (Medium-behandelt) der Anteil der in der G₂/M-Phase befindlichen Zellen an (Abbildung 13B unten), jedoch nicht signifikant. Bei allen drei Testansätzen, die mit Adeninkristallen inkubiert wurden, nahm der Anteil der in der G₂/M-Phase befindlichen Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen in ähnlichem Maß zu, jedoch ebenso nicht statistisch relevant (Abbildung 13B unten). Der Anteil der in der S-Phase befindlichen Zellen war dagegen nach Behandlung mit LPS als auch Adeninkristallen im Vergleich zur Kontrolle vermindert, allerdings nicht signifikant (Abbildung 13B Mitte). Dieses Ergebnis deutet, allerdings noch mit Vorsicht, darauf hin, dass es infolge der Stimulation von Makrophagen mit Adeninkristallen -ähnlich wie bei LPS- zu Veränderungen bezüglich der charakteristischen Zellzyklusphasen kommt.

Nach pharmakologischer Inhibierung von p53 durch Pifithrin- α stieg im Vergleich zu nicht inhibierten Zellen der Anteil von Zellen in der G₂/M-Phase unter fast allen Inkubationsbedingungen (Kontrolle, LPS, Adeninkristalle) signifikant an (Abbildung 13B

unten). Auch eine Zunahme von Zellen in der S-Phase sowie eine Reduktion von Zellen in der G₀/G₁-Phase konnte detektiert werden, die allerdings nur in zwei Fällen statistisch signifikant waren (Abbildung 13B oben und Mitte). Diese Ergebnisse zeigen, dass Pifithrin- α unter den experimentellen Bedingungen wirksam war und p53 spezifisch blockiert wurde.

Insgesamt konnten erste Hinweise dafür gewonnen werden, dass eine Exposition von *in vitro* kultivierten Makrophagen mit Adeninkristallen zu einem veränderten Zellzyklusverhalten führt, welches durch aktiviertes p53 kontrolliert wird. Diese Ergebnisse müssen allerdings durch weitere Versuche insgesamt statistisch untermauert werden.

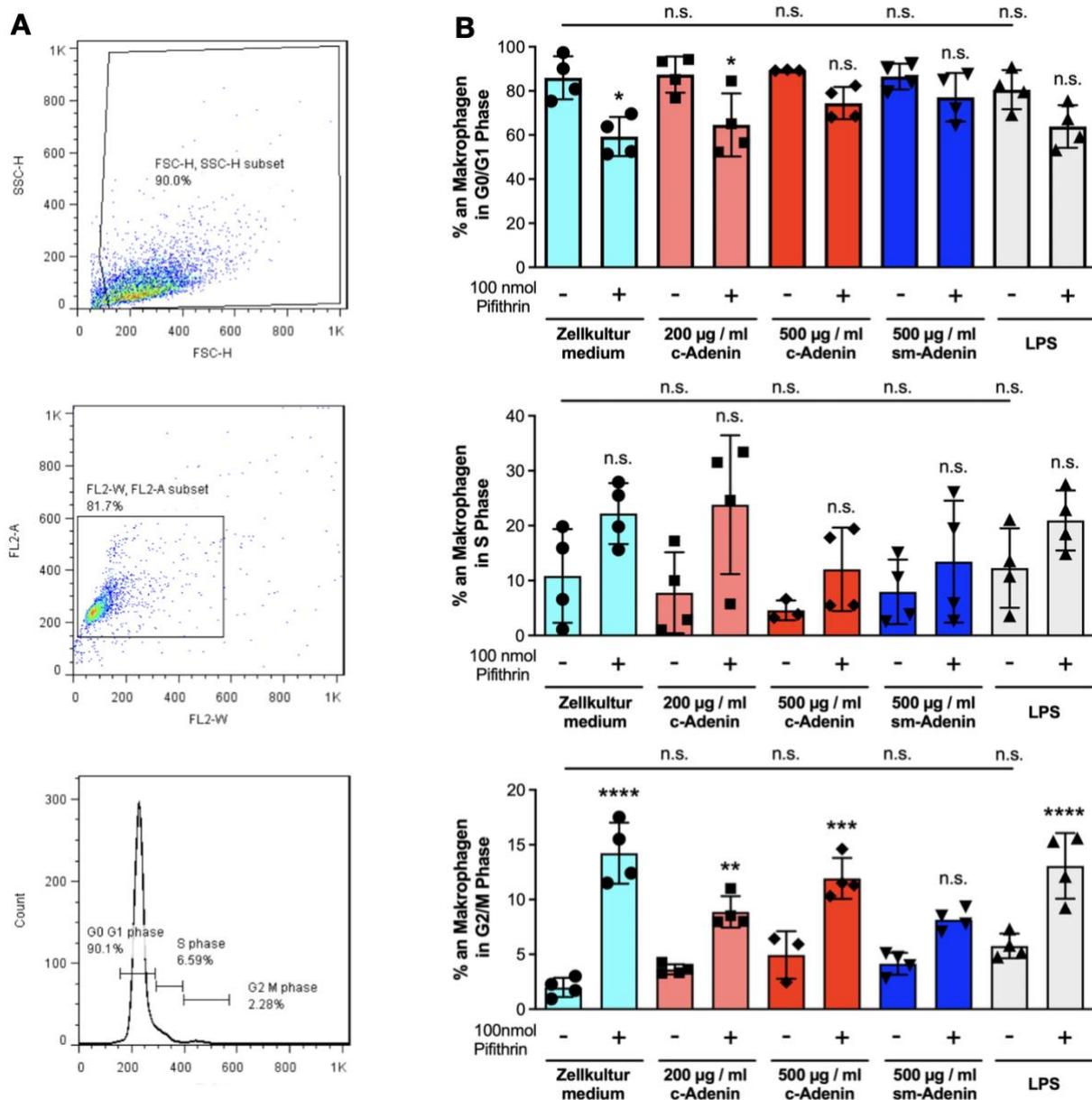


Abbildung 13: Einfluss des Adenin-supplementierten Zellkulturmediums auf den Zellzyklus von kultivierten Makrophagen und mögliche Beteiligung des Tumorsuppressors p53. Die aus Knochenmark isolierten

Monozyten wurden 3 Tage in M-CSF Medium zu Makrophagen differenziert. Das Medium wurde durch frisches Medium ersetzt, das mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Adenin aus unterschiedlichen Quellen supplementiert war (200 bzw. 500 µg/ml). Kontrollzellen erhielten Medium mit 100 ng/ml LPS bzw. reines Medium. Parallele Makrophagen-Zellkulturen wurde sowohl mit Adenin- bzw. Kontrollmedium und in Anwesenheit des p53 Inhibitors Pifithrin- α (100 nmol) durchgeführt. Nach 18 Stunden wurden die Zellen mit Propidiumiodid markiert und mittels Durchflusszytometrie bezüglich ihres DNA-Gehalts (Zellzyklusstadiums) analysiert. (A) Exemplarische Gating-Strategie für die Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie. (B) Ergebnisse der Analyse. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (Daten jeweils in Duplets gemessen, 2-way-ANOVA, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****), $p \geq 0,05$ (n.s. = nicht signifikant)).

4.2 Etablierung eines Mausmodells zur Adeninkristall-induzierten Nephropathie

Im Anschluss an die *in vitro* Experimente sollte nun im Labor der Nephrologie ein Mausmodell zur Adeninkristall-induzierten chronischen Niereninsuffizienz (CKD) etabliert werden, welches durch eine Adenin-angereicherte Futterdiät induziert wird. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Analyse und Charakterisierung der Makrophagen Phänotypen, die in Abhängigkeit der sich verändernden Mikroumgebung innerhalb der Niere eine Entzündung des Gewebes fördern bzw. lindern. Die anfänglich gesetzten Kriterien für die erfolgreiche Induktion einer CKD mit konsekutiver Infiltration durch Makrophagen waren die Reduktion der Nierenfunktion, chronische Entzündung sowie interstitielle Fibrose, ausgelöst durch die Ablagerung von makroskopisch-erkennbaren Adeninkristallen in den Nierentubuli, die im Verlauf der Entzündungsreaktion durch Makrophagen abgebaut werden.

Folgende Versuchsgruppen wurden analysiert, um das geeignete Futterregime für weitere Untersuchungen zu identifizieren (siehe Abbildung 6):

1. Kontrollgruppe: Mäuse mit Standarddiät (d.h. gesunde Tiere).
2. Futterregime 1: Mäuse, die durchgängig eine 0,2% Adenin-angereicherte Futterdiät über einen 21-tägigen Zeitraum erhielten.
3. Futterregime 2: Mäuse, die eine alternierende Diät mit abwechselnd 0,2% bzw. 0,15% Adenin im Futter in Zeitblöcken von jeweils 14 Tagen erhielten (insgesamt 49 Tage).
4. Futterregime 3: Mäuse, denen eine alternierende Diät mit abwechselnd 0,2% bzw. 0,1% Adenin im Futter in Zeitblöcken von jeweils 14 Tagen gefüttert wurde (insgesamt 49 Tage).

Während die GFR der gesunden Kontrolltiere über den Zeitraum von 49 Tagen unverändert blieb (Abbildung 14A und 14B), fiel sie bei den Mäusen, die Futterregime 1 erhielten, innerhalb der ersten 21 Tage rasant von 100% auf 16% ab (Abbildung 14A und 14B). Daher wurde diese Versuchsreihe zu diesem Zeitpunkt durch Euthanasie der Tiere abgebrochen. Bei den Mausgruppen, die Futterregime 2 bzw. 3 erhielten, sank die GFR dagegen moderat aber kontinuierlich auf ca. 29% bzw. 49% der Anfangswerte mit ähnlichem Kurvenverlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe ab (Abbildung 14A und 14B). Im Gegensatz zu den Kontrolltieren mit Standarddiät nahmen die Tiere, denen eine Adenin-angereicherte Diät verabreicht wurde (Futterregime 1, 2, und 3), über den Versuchszeitraum nicht an Gewicht zu (Abbildung 14C).

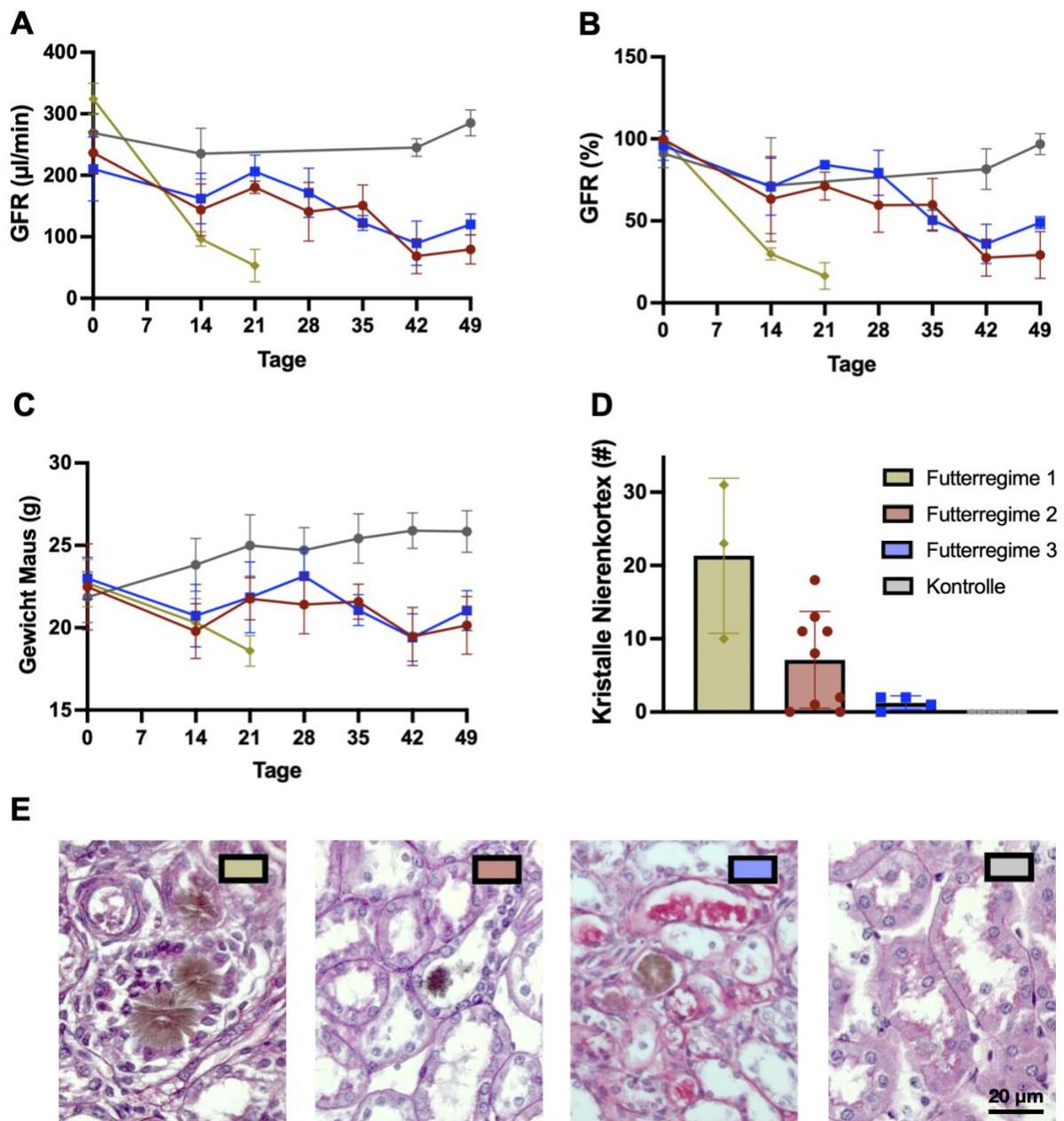


Abbildung 14: Etablierung eines Mausmodells mit Kristall-induzierter chronischer Niereninsuffizienz mittels Adenin-angereicherter Futterdiät. (A, B und C) Zu den jeweils angegebenen Tagen wurde bei allen Tieren die glomeruläre Filtrationsrate (GFR, in $\mu\text{l}/\text{min}$ und Prozent %) und das Körpergewicht gemessen. (D und E) Nach Euthanasie der Tiere wurden die Nieren entnommen und histologische Schnitte erstellt. Anhand von PAS-Färbung wurde die Anzahl der lichtmikroskopisch-sichtbaren Adeninkristalle im Nierenkortex quantifiziert (Mausgruppe „Futterregime 1“ $n=9$, Mausgruppe „Futterregime 2“ $n=12$, Mausgruppe „Futterregime 3“ $n=9$, Kontrollgruppe $n=7$, Daten aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen).

Um die Ablagerungen der Adeninkristalle in den Nieren der Tiere und deren Folgen nach Adenin-Fütterung zu untersuchen, wurden Nierenschnitte mit Periodic Acid–Schiff gefärbt und lichtmikroskopisch quantifiziert. In Übereinstimmung mit dem starken Absinken der

GFR, fanden sich bei den Tieren mit Futterregime 1 die meisten Kristalle im Nierenkortex und Medulla, in den Tubuli und im Interstitium (durchschnittlich ca. 21,3 Kristalle pro Nierenschnitt) (Abbildung 14D). Die Glomeruli blieben unbeeinträchtigt, da sich Adeninkristalle hauptsächlich in den Tubuli ablagern. Diese Ergebnisse ähneln sich mit denen einer parallel durchgeführten Studie [91]. In anderen Organen (Herz, Leber, Milz) wurden keine Kristalle nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Obwohl die Tiere, die Futterregime 2 und 3 erhielten, eine ähnliche GFR-Reduktion zeigten, war die Zahl der Kristallablagerungen in der Niere bei Gruppe 2 deutlich höher als bei Gruppe 3 (durchschnittlich 7,1 im Vergleich zu 1,12 Kristallen/Schnitt) (Abbildung 14E). Da sich nach Futterregime 3 nur sehr wenige Adeninkristalle abgelagert hatten, ähnlich wie bei Kontrolltieren mit Standardfutter, entsprach dieses Modell nicht den Zielvorstellungen. Aus diesen Gründen wurde daher das Futterregime 2 für weitere Analysen zur Charakterisierung einer Adeninkristall-induzierten CKD in dieser Arbeit gewählt.

In weiteren funktionellen Untersuchungen zeigten die Daten, dass die GFR bei Tieren, die Futterregime 2 erhielten, sowohl an Tag 14, Tag 42 als auch Tag 49 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant abnahm (Abbildung 15A und 15B). Zudem stiegen die Plasmaspiegel von Kreatinin (Abbildung 15C) und Harnstoff (BUN) (Abbildung 15D) bei Tieren nach Adenin-Fütterung im Vergleich zur Kontrollgruppe kontinuierlich an. In der fortgeschrittenen Phase nach 49 Tagen erhöhten sich bei den Tieren mit Adenin-Diät sowohl die Plasmaspiegel von Kreatinin (0,8%) und Harnstoff (75 mg/dl) signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 15C und 15D). Dies bedeutet, dass die Tiere in Folge des Futterregime 2 eine CKD entwickelten. Grund dafür war die Ablagerung von Adeninkristallen in den Nieren. In den PAS-gefärbten Nierenschnitten der Tiere nach Adenin-Diät konnten Adeninkristalle im Kortex als auch in der Medulla nachgewiesen werden (Abbildung 15E, links). Diese Kristallablagerungen waren auch unter dem Polarisationsmikroskop sichtbar (Abbildung 15E, rechts). Nach weiterer Vergrößerung zeigte sich, dass die Kristalle überwiegend im Tubulussystem vorlagen (Abbildung 15F); im Interstitium, wohin die Ablagerungen durch den Prozess der Extratubularisierung gelangen, konnten sie vereinzelt nachgewiesen werden (Abbildung 15G).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Futterregime 2 eine Adeninkristall-induzierte Nephropathie verursacht hat, welche durch eine Verschlechterung der Nierenfunktion sowie

Ablagerungen von Adeninkristallen in der Niere, überwiegend innerhalb der glomerulären Tubulusystems, gekennzeichnet ist.

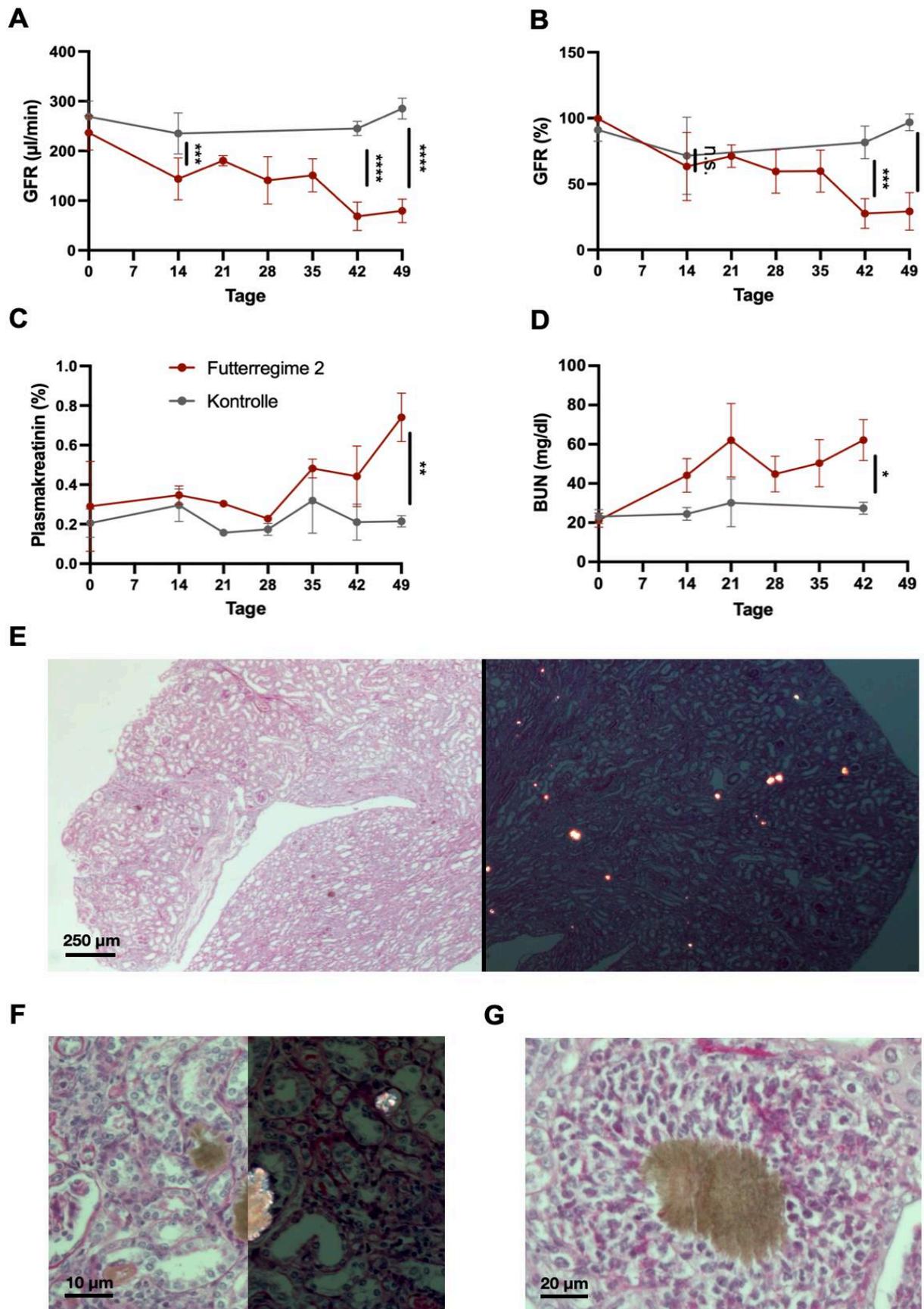


Abbildung 15: Adenin-angereicherte Futterdiät führt zu Kristall-induzierter chronischer Niereninsuffizienz in C57BL/6N Mäusen. 6 Wochen alte männliche C57BL/6N Mäuse erhielten eine alternierende Futterdiät mit zusätzlich 0,2% bzw. 1,5% Adenin in Zeitintervallen von jeweils 14 Tagen für einen Zeitraum von 49 Tagen. Die

Kontrollgruppe erhielt normale Kost. (A-D) Zu den jeweils angegebenen Versuchstagen wurde bei allen Tieren die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Plasmakreatinin sowie Blut Urea Nitrogen (BUN) gemessen. (E) PAS-gefärbter Gesamtnierenschnitt mit prominent erkennbaren Adeninkristallen in Lichtbildeinstellung (links) und unter polarisierendem Licht (rechts). (F) PAS-gefärbter Nierenschnitt mit Adenin-Kristallen im Tubuluslumen wie in (E). (G) PAS-gefärbter Nierenschnitt mit Adeninkristallen im Interstitium in normaler Lichtbildeinstellung. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (Mausgruppe „Futterregime 2“ n=12, Kontrollgruppe n=7, aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen, unverbundener T-Test, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) , $p < 0.0001$ (****), $p \geq 0,05$ (n.s. = nicht signifikant)).

4.2.1 Serum- und Differentialblutbildanalysen im Mausmodell der Adenin-Diät

Als nächstes wurden die Serumparameter in Folge der gewählten Adenin-Diät (Futterregime 2) an den Tagen 0, 14 und 49 analysiert. Neben signifikant erhöhten Harnstoff- und Kreatinin-Werten gegenüber den Kontrolltieren an Tag 49 ließ sich ein Anstieg des Serum-Albumins nachweisen, der an Tag 49 signifikant war (Abbildung 16A). Die an der German Mouse Clinic in München erhobenen Harnstoff- und Kreatinin-Konzentrationen deckten sich mit meinen eigenen durch kolorimetrische Assays erhobenen Ergebnissen (Abbildung 16). Die Konzentrationen der im Serum vorhandenen Kalium- und Kalziumionen waren bei Tieren mit Adenin-Diät an Tag 49 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt bzw. erhöht (Abbildung 16B), während die Konzentrationen von Natrium-, Chlorid- und Phosphationen nahezu unverändert blieben (Abbildung 16B). Insgesamt deuten vor allem die klar erhöhten Harnstoff-, Kreatinin- und Albuminkonzentrationen bei den Tieren mit Adenin-Diät auf die Entstehung einer tubulointerstitiellen Nephritis hin [128].

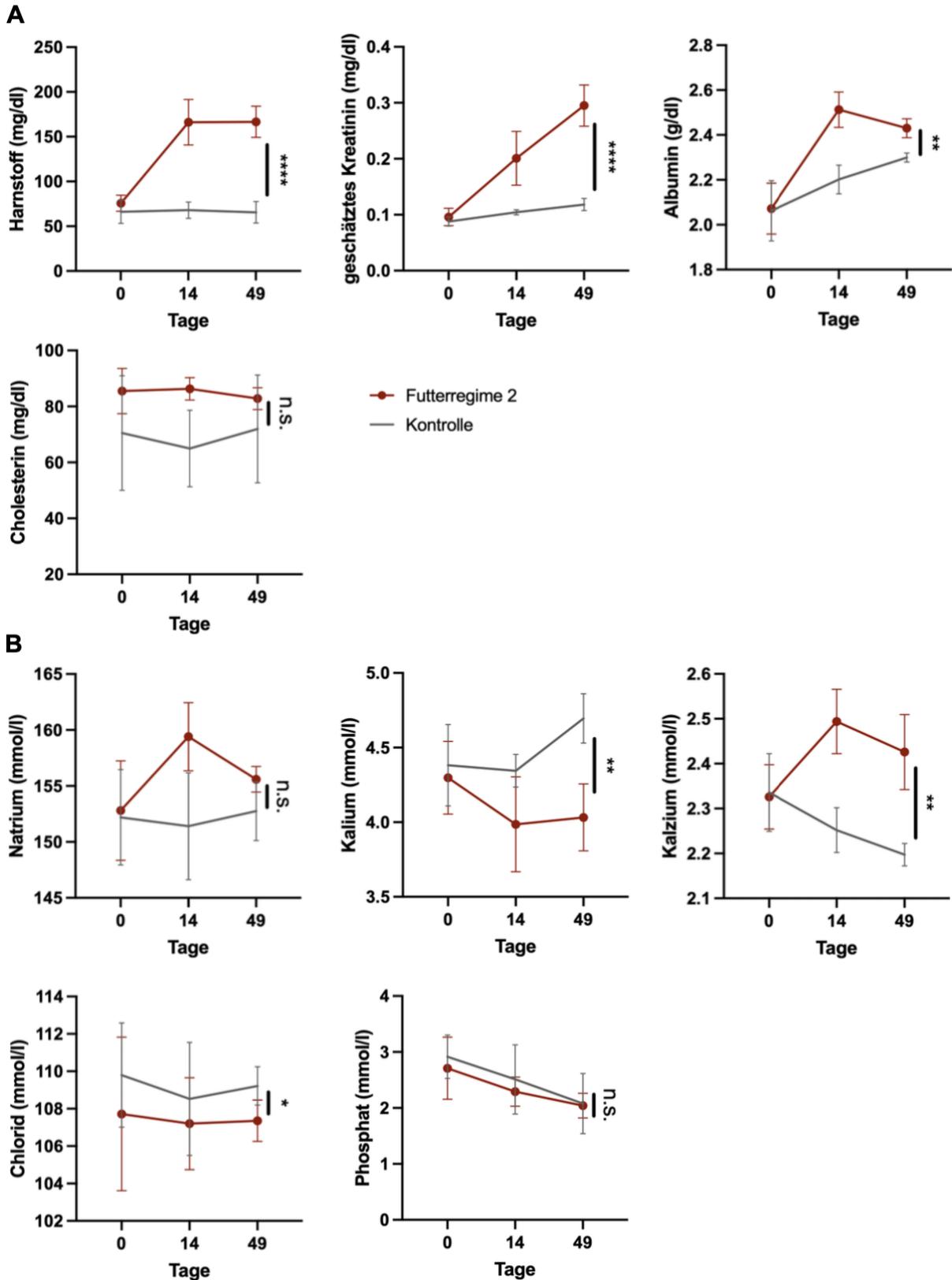


Abbildung 16: Die Adenin-Futterdiät führt zu Veränderung von Serumparametern. C57BL/6N Mäusen, die eine alternierende Adenin-Diät mit 0,2% bzw. 0,15% erhielten (rot) und C57BL/6N Kontrollmäusen, die eine Standarddiät erhielten (grau) wurde jeweils 150 μ l Blut an den Tagen 0, 14 und 49 abgenommen. Das Serum wurde präpariert und einer detaillierten labordiagnostischen Analyse unterzogen. (A) Nierenfunktionsparameter, (B) Blutsalze (Kontrollgruppe n=10, Adenin-Diät n=10, aus

jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (unverbundener T-Test, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.0001$ (****), $p \geq 0.05$ (n.s. = nicht signifikant)).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war im Differentialblutbild der Mäuse mit Adenin-Diät bereits früh (Tag 14) eine signifikante Zunahme der Leukozytenanzahl erkennbar, welche bis zur Euthanasie der Tiere an Tag 49 konstant zunahm (Abbildung 17A). Insbesondere stieg die Anzahl der Lymphozyten im Verlauf nach Adenin-Supplementierung signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe an (Abbildung 17B). Obwohl sich die Anzahl der Monozyten und eosinophilen Granulozyten im Blut nach Adenin-Diät erhöhte, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen an Tag 49 (Abbildung 17C und 17D). Ein ähnlicher Verlauf war bei den Thrombozyten ersichtlich (Abbildung 17E).

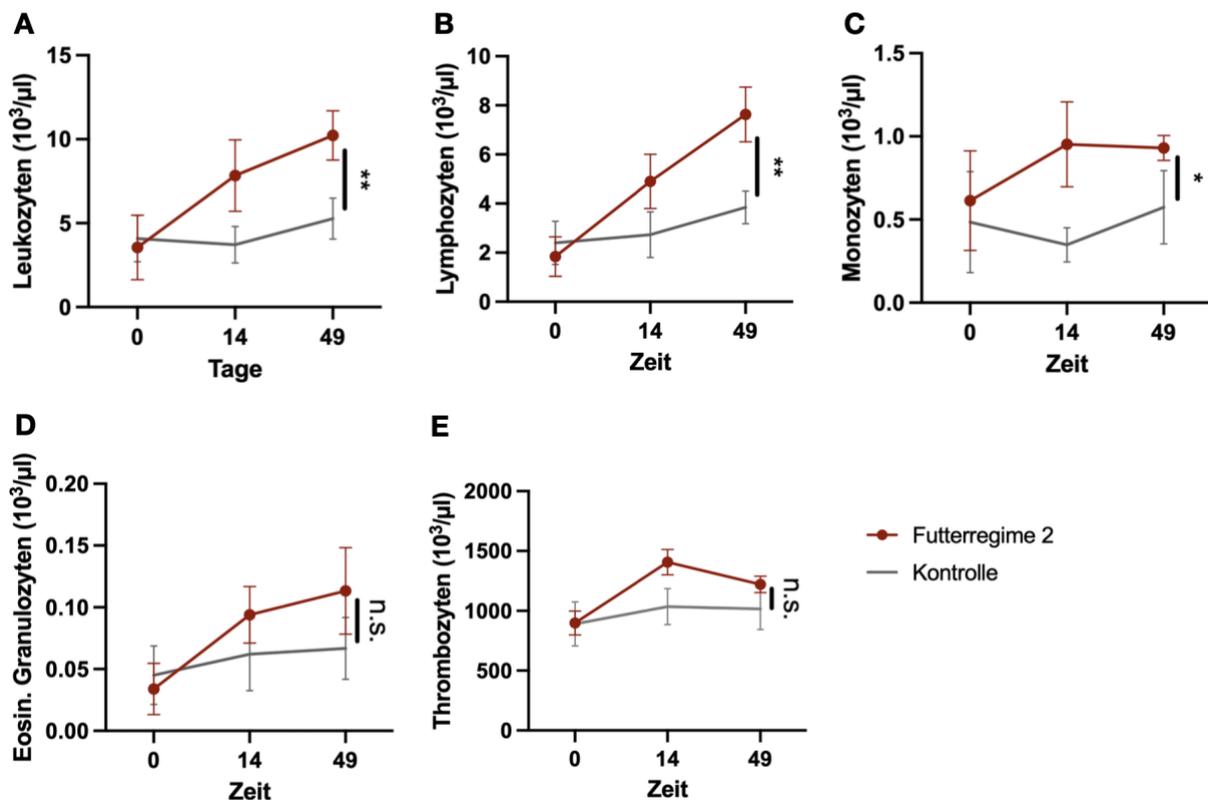


Abbildung 17: Die Adenin-Futterdiät induziert eine Zunahme der Leukozyten, Thrombozyten und Monozyten. C57BL/6N Interventions- und Kontrolltieren wurde Blut an den Tagen 0, 14 und 49 abgenommen. Das Blut wurde in einer Kunststoff-Einmal-Kapillarpipette gesammelt und in einem Reaktionsgefäß mit 200 μl Cellpack bis zur differentialdiagnostischen hämatologischen Analyse auf Eis gelagert (Kontrollgruppe $n=10$, Interventionsgruppe $n=10$, aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen). Anzahl der Leukozyten (A), Lymphozyten (B), Monozyten (C), eosinophilen Granulozyten (D) und Thrombozyten (E) im Blut. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (unverbundener T-Test, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p \geq 0,05$ (n.s. = nicht signifikant)).

Neben der Serum- und Differentialblutbildanalyse wurde den Tieren auch Blut für die durchflusszytometrische Analyse entnommen. Dafür wurden die Immunzellen mit den Antikörpern CD45, CD11b, Ly6G und Ly6C gefärbt und mittels „FlowJo“ quantifiziert (Abbildung 18A). Die Analyse zeigte tendenziell weniger (aber nicht signifikant) Neutrophile im Blut der Tiere mit Adenin-Diät im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 18A/B).

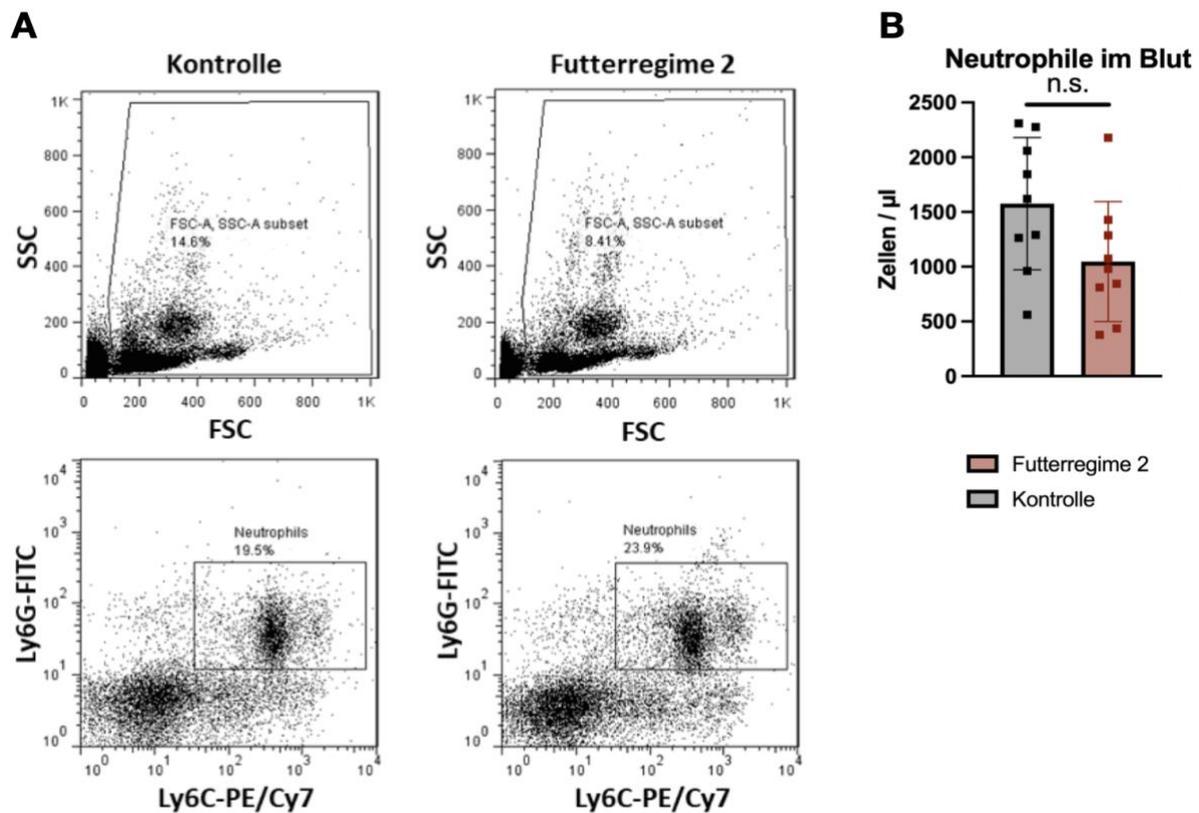


Abbildung 18: Population von Neutrophilen im Blut verändert sich infolge einer Adenin-angereicherten Futterdiät. Interventions- und Kontrolltiere wurden 49 Tage lang mit der in Abbildung 6 beschriebenen Adenin-Diät bzw. Standardfutter gefüttert. Anschließend wurde den Versuchstieren Blut entnommen, wonach diese euthanasiert wurden. Die Nieren wurden entnommen und gemörsert. Immunzellen wurden aus dem Blut isoliert und mit CD45-, CD11b-, Ly6G- und Ly6C-bindenden Antikörpern gefärbt. Abschließend wurde die Anzahl an Neutrophilen (CD45+CD11b+Ly6C-Ly6G+) mittels FACS (18A) sortiert und quantifiziert (18B). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (Interventionsgruppe n=9, Kontrollgruppe n=9, aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen (unverbundener T-Test, $p \geq 0,05$ (n.s. = nicht signifikant))).

Bei den Erythrozyten war bis zum Tag 49 innerhalb der Interventionsgruppe ein leichter Anstieg zu beobachten, wobei dieser im Verlauf der Diät und im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant war (Abbildung 19A). Die Konzentrationen von Hämoglobin als auch Hämatokrit fielen jeweils im Verlauf der Diät und im Vergleich zur Kontrollgruppe

signifikant ab (Abbildung 19B und 19C). Gleiches galt für die MCV (mean corpuscular volume) und MCH (mean corpuscular haemoglobin) Werte (Abbildung 19D und 19E). Dahingegen blieb die MCHC (mean corpuscular haemoglobin concentration) weitestgehend unverändert (Abbildung 19F). Die Retikulozytenanzahl fiel hingegen im Verlauf der Adenin-Supplementierung signifikant ab, insbesondere am Ende der Diät an Tag 49 (Abbildung 19G). Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die veränderte Anzahl von Blut- und Immunzellen auf eine mögliche Entzündungsreaktion hinweist, die aufgrund der Adenin-Kristallablagerungen in der Niere ausgelöst wurde. Zudem deuten die verminderten Hämoglobin- und Hämatokritkonzentrationen sowie die sinkenden Werte für MCV und MCH auf eine mikrozytäre, hypochrome Anämie hin, die durch die Nierenschädigung verursacht wurde.

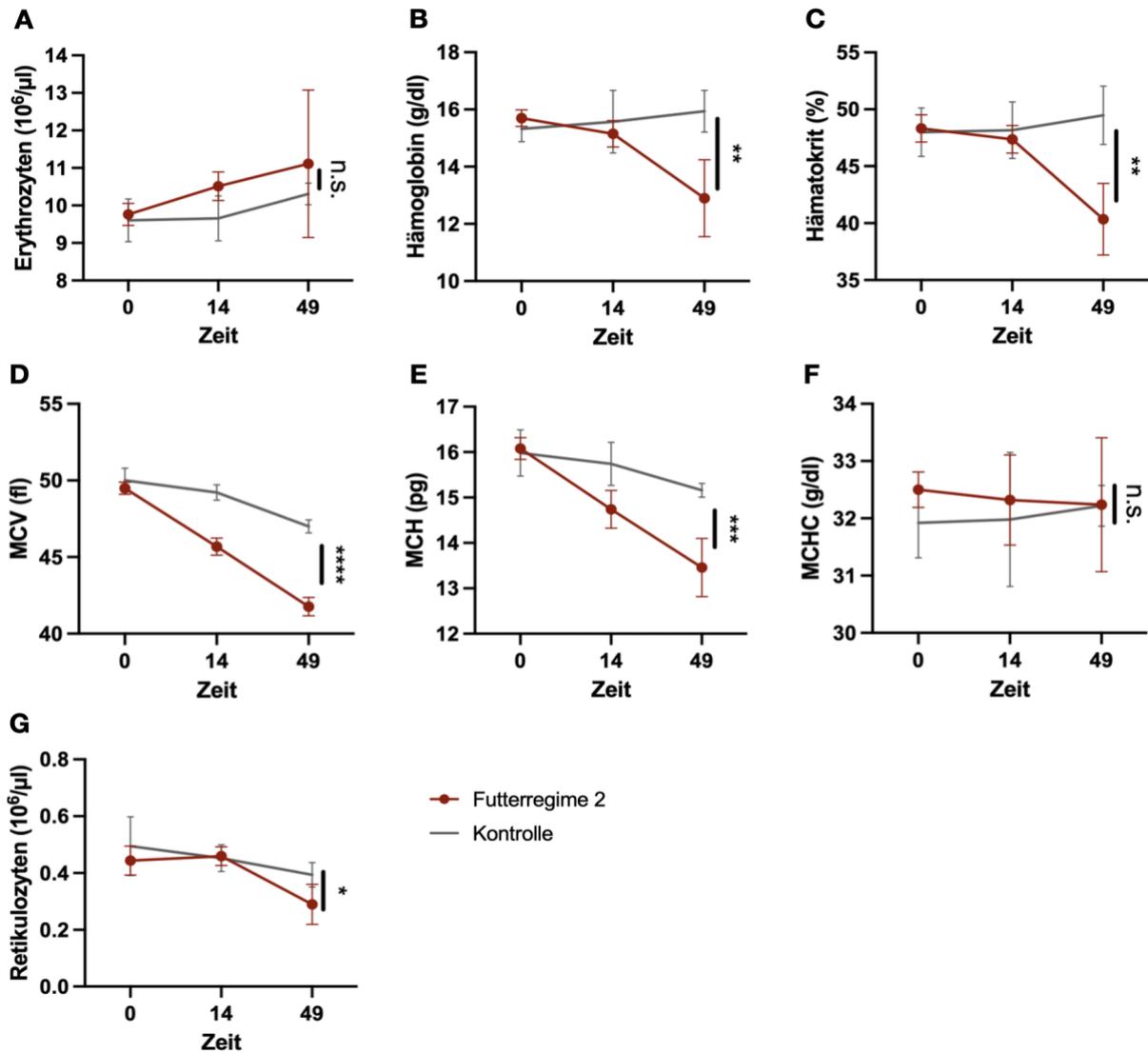


Abbildung 19: Adenin-angereicherte Futterdiät führt zu veränderter Zusammensetzung der Erythrozyten, welche auf eine chronische Niereninsuffizienz hindeutet. C57BL/6N Interventions- und Kontrolltieren wurde Blut an den Tagen 0, 14 und 49 abgenommen. Das Blut wurde in einer Kunststoff-Einmal-Kapillarpipette gesammelt und in einem Reaktionsgefäß mit 200 μ l Cellpack bis zur differentialdiagnostischen hämatologischen Analyse auf Eis gelagert (Kontrollgruppe n=10, Interventionsgruppe n=10, aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen). (A) Anzahl der Erythrozyten im Blut. (B) Konzentration von Hämoglobin, (C) Hämatokrit, (D) MCV, (E) MCH, (F) MCHC und (G) Retikulozyten im Blut. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert \pm SEM dar (unverbundener T-Test, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****), $p \geq 0,05$ (n.s. = nicht signifikant)).

4.2.2 Adenin-Diät verursacht eine für die CKD charakteristische morphologische Nierenschädigung

Um weitere Hinweise dafür zu erhalten, dass es in Folge der Adeninkristallablagerungen zu einer Schädigung des Nierengewebes kommt, wurden den Tieren am Ende der Versuchsreihe (Tag 49) die Nieren entnommen und die Gesamt RNA isoliert. Mittels quantitativer RT-PCR wurde anschließend die Expression des Kidney Injury Molecule 1 (*KIM-1*) als auch die Expression des Neutrophilen Markers „Gelatinase–Associated Lipocalin“ (*Ngal*, codiert durch das *Lcn2* Gen) quantifiziert. Letzterer wird lediglich in aktivierten Neutrophilen exprimiert und gilt als etablierter Biomarker einer Nierenschädigung [129]. Tatsächlich waren die mRNA Expressionswerte beider Gene bei den Tieren mit Adenin-Diät im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an Tag 49 erhöht (Abbildung 20A).

Die histologische Analyse mit semi-quantitativer Auswertung der am Ende der Versuchsreihe gewonnenen Gewebeproben zeigte in mehrfacher Hinsicht ein durch Adeninkristalle geschädigtes Nierengewebe bei den Tieren mit Adenin-Diät (Abbildung 20B bis 20E). Die Tubuluszellen waren im Bereich des renalen Kortex deutlich abgeflacht und wiesen einen signifikant erhöhten Anteil nekrotischer Zellen auf (Abbildung 20B und 20C). Außerdem war zum Lumen hin ein signifikanter Verlust des Bürstensaumepithels erkennbar (Abbildung 20B und 20C). Die Tubuli waren deutlich dilatiert und beinhalteten vermehrt Ablagerungen und deutlich erkennbare Adeninkristalle (Abbildung 20B). Die Morphologie der Glomeruli erschien überwiegend regelmäßig mit lediglich partiellen Sklerosierungen und vergrößerten Bowman'schen Räumen (Daten nicht gezeigt). Die semi-quantitative Auswertung der Nierenschädigung im Bereich der Medulla zeigte eine vergleichbare und signifikante Zunahme der oben beschriebenen strukturellen Veränderungen sowie die Bildung von Kristallen und anderen Ablagerungen (Abbildung 20D und 20E). Bei den Kontrolltieren konnten die beschriebenen morphologischen Veränderungen sowohl im Nierenkortex als auch in der Medulla dagegen nicht beobachtet werden (Abbildung 20B bis 20D).

Zusammenfassend deuten sowohl die erhöhten mRNA Expressionswerte der Nierenschadensmarker *KIM-1* und *Ngal* als auch die Vielzahl von morphologischen Veränderungen im Nierenkortex und in der Medulla darauf hin, dass es infolge der Adenin-Diät zu einer tubulären Schädigung kam.

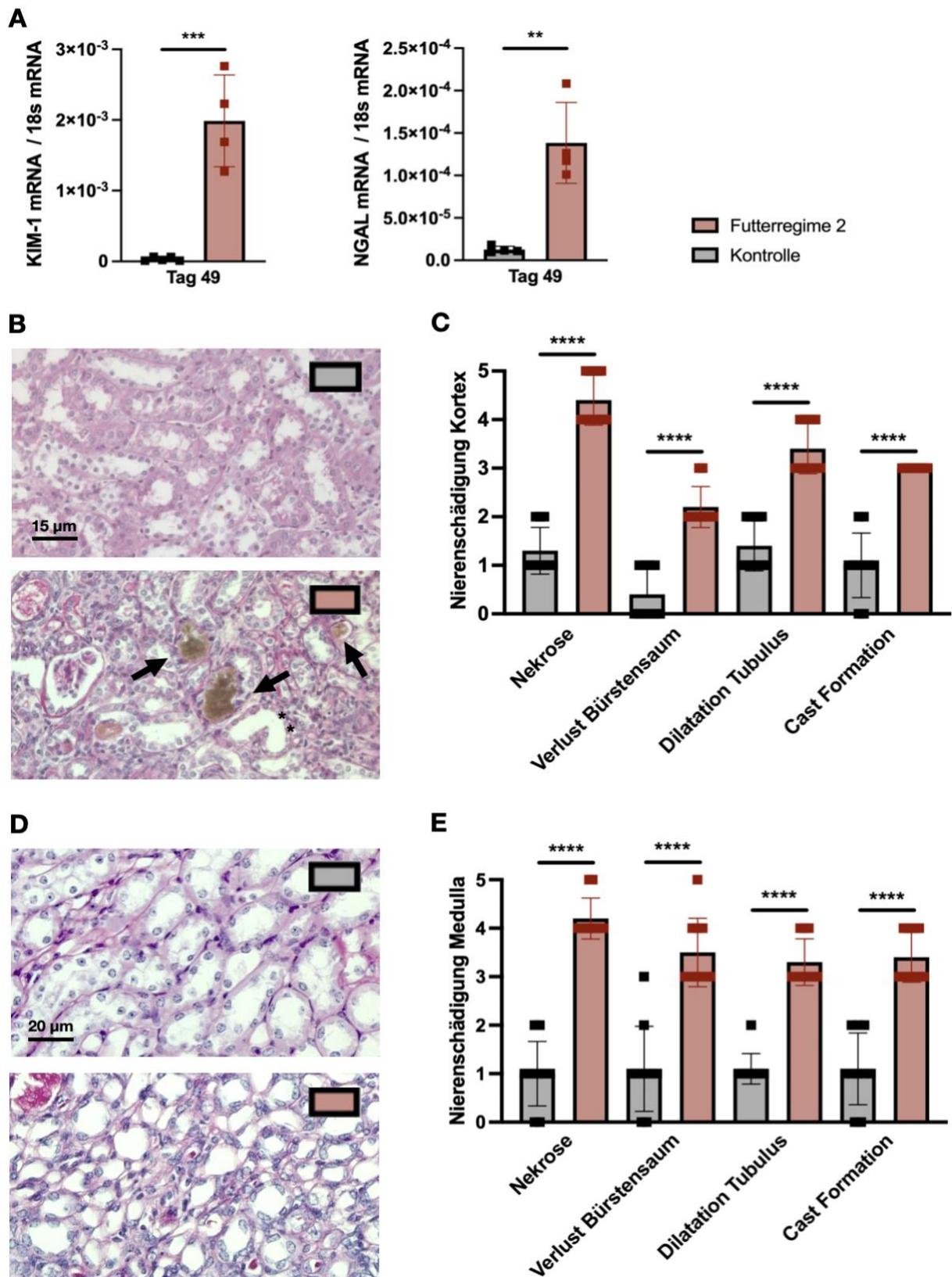


Abbildung 20: Adenin-angereicherte Diät führt zu einer chronischen Nierenschädigung in C57BL/6N Mäusen. Männliche C57BL/6N Mäuse, die ein mit 0,2% bzw. 0,15% Adenin-angereichertes Futter bzw. Standardfutter erhielten, wurden an Tag 49 euthanasiert. Anschließend wurden die Nieren entnommen und für weitere Analysen präpariert. (A) Quantitative Analyse der Expression der *KIM-1* und *Ngal* mRNA mittels RT-qPCR (Kontrollgruppe n=5, Interventionsgruppe n=4, zweite Versuchsreihe

(nicht abgebildet) mit gleichem Effekt). (B und D) Exemplarische histologische Nierenschnitte aus Kortex (B) und Medulla (D) mit PAS Färbung von Interventions- und Kontrollgruppe mit Kristallbildung (Pfeile) und Verlust des Bürstensaums (Sterne). (C und E) Semi- quantitative Beurteilung der Nierenschädigung anhand histologischer Nierenschnitte aus Kortex (C) und Medulla (E) mit PAS Färbung. Nekrose, Verlust des Bürstensaums, Dilatation der Nierentubuli sowie tubuläre Cast Formation wurden hierfür anhand einer Skala von 0 bis 5 bewertet (0: 0%, 1: <10%, 2: 11 bis 25%, 3: 26 bis 45%, 4: 46 bis 75%, 5: >76%) (Kontrollgruppe n=10, Interventionsgruppe n=10, aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (unverbundener T-Test, $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****), $p \geq 0.05$ (n.s. = nicht signifikant)).

4.2.3 Renale Inflammation infolge einer Adenin-Kristall-induzierte Nephropathie

Um Hinweise auf eine Entzündungsreaktion innerhalb des Nierengewebes zu erhalten, wurde als erstes die Expression der proinflammatorischen Zytokine *Tnf- α* und *Il-6* quantifiziert. Dies wurde erneut auf Ebene der entsprechenden aus dem Nierengewebe der Tiere (von Tag 49) gewonnenen mRNA mittels qRT-PCR durchgeführt. Für beide Signalmediatoren konnte eine signifikant erhöhte mRNA Expression bei der Interventionsgruppe (Adenin-Diät) im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abbildung 21A). Diese Ergebnisse wurden in einer zweiten, unabhängigen Versuchsreihe verifiziert (Daten nicht gezeigt) und unterstützen die Schlussfolgerung, dass es infolge der Adenin-Diät zur Entzündung des Nierengewebes kommt.

Außerdem wurde durch immunhistologische Analysen von Nierenschnitten untersucht, ob es zur Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten und Monozyten, in das Nierengewebe kommt. Die Leukozyten wurden dabei mittels eines Antikörpers gegen das Oberflächenprotein Ly6B2 sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 21B und 21C erkennbar, wiesen Tiere mit Adenin-Diät im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich vermehrt infiltrierende Leukozyten auf, v.a. im Bereich des Nierenkortex (Abbildung 21B). Die semi-quantitative Auswertung der Schnitte wies einen signifikanten Anstieg von infiltrierenden Leukozyten im gesamten Nierengewebe der behandelten Mäuse nach (Abbildung 21C). Diese Daten unterstreichen zusammen mit den vorherigen Ergebnissen, dass Adenin-Kristalle eine Entzündung in der Niere auslösen.

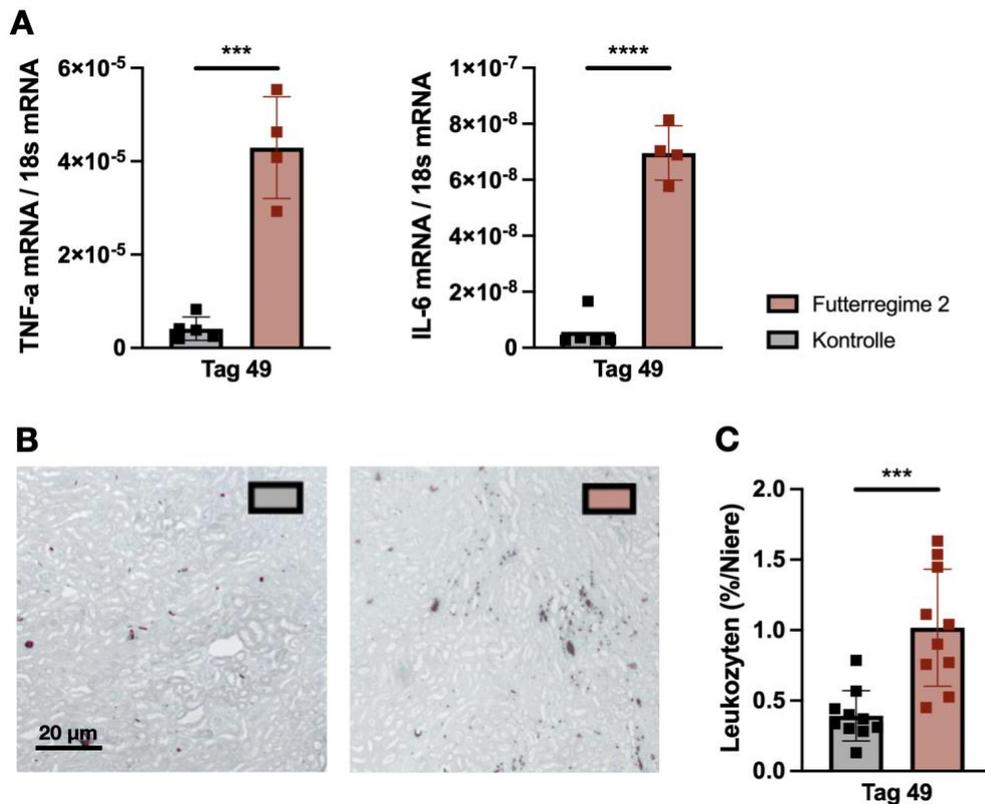


Abbildung 21: Adenin-angereicherte Futterdiät verursacht eine Entzündungsreaktion innerhalb der Niere. Männliche C57BL/6N Mäuse, die mit Adenin-angereicherter Nahrung bzw. mit Standardnahrung gefüttert wurden, wurden an Tag 49 euthanasiert. Anschließend wurden die Nieren entnommen und für weitere Analysen vorbereitet. (A) Quantitative Analyse der mRNA-Expression von *Tnf-α* und *Il-6* durch RT-qPCR (Kontrollgruppe n=5, Interventionsgruppe n=4, zweite Versuchsreihe (nicht abgebildet) mit gleichem Effekt). (B) Beispielhafte histologische Schnittbilder von Nieren mit immunhistochemischer Leukozyten Färbung mit dem Antikörper Ly6B2. (C) Quantifizierung der Leukozyten in Nierenschnitten mittels ImageJ (Kontrollgruppe n=10, Interventionsgruppe n=10, aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (unverbundener T-Test, $p < 0.001$ (***) , $p < 0.0001$ (****)).

4.2.4 Adenin-induzierte Infiltration von Makrophagen in das geschädigte Nierengewebe

Neben der Infiltration von Neutrophilen in die geschädigte Niere ist ein charakteristisches Merkmal die Infiltration von Monozyten und deren Differenzierung in Makrophagen [84]. Abhängig von der Mikroumgebung können Makrophagen entweder in M₁- oder M₂-ähnliche Phänotypen differenzieren [82]. Um herauszufinden, welche Makrophagen Phänotypen bei der Adeninkristall-induzierten Nephropathie überwiegend auftreten, wurden zuerst die mRNA Expressionswerte von drei Makrophagen-spezifischen Markern im Nierengewebe mittels RT-qPCR ermittelt: die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase *iNos*, ein Schlüsselenzym, das unter Stressbedingungen als Abwehrmechanismus große Mengen an

Stickstoffmonoxid (NO) unter Verbrauch von Sauerstoff synthetisiert und durch pro-inflammatorische Zytokine in M1-Makrophagen stark induziert wird; *Arg1*, welche die Umwandlung von L-Arginin in Harnstoff und L-Ornithin katalysiert, und ein wichtiger Marker von alternativ aktivierten Makrophagen (M2a) darstellt; das Zelloberflächenprotein CD206, bekannt als Mannose-Rezeptor C Typ 1, das insbesondere von Makrophagen des M2-, nicht aber des M1-Subtyps exprimiert wird. Wie in Abbildung 22A erkennbar, waren die mRNA Expressionswerte dieser drei Transkripte (*iNos*, *Arg1* und *Cd206*) im Nierengewebe der Tiere der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an Tag 49 erhöht.

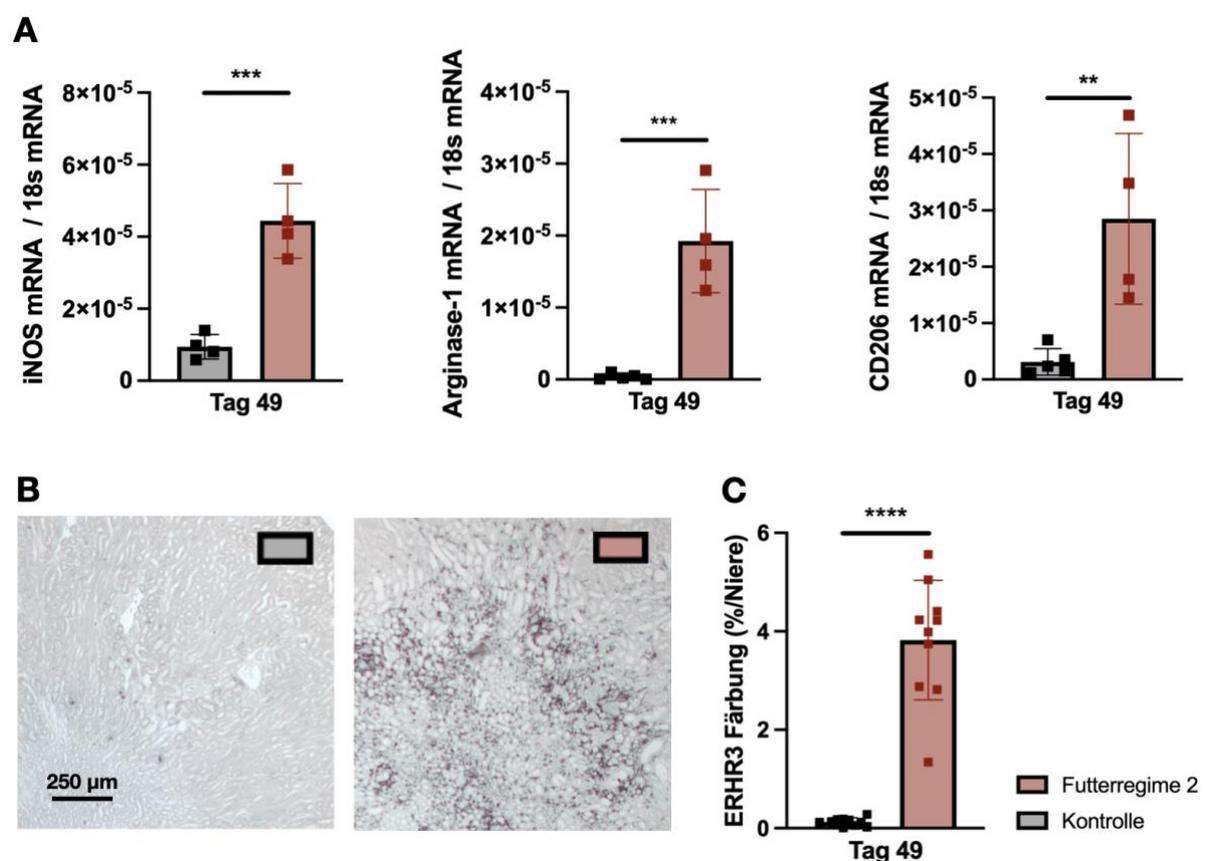


Abbildung 22: Eine Adenin-angereicherte Futterdiät verursacht die renale Infiltration von Makrophagen. Männliche C57BL/6N Mäuse, die durch ein mit 0,2% bzw. 0,15% Adenin-supplementiertes Futter bzw. Standardnahrung erhielten, wurden an Tag 49 euthanasiert. Anschließend wurden die Nieren entnommen und für weitere Analysen vorbereitet. (A) Quantitative Analyse der mRNA Expression von *iNos*, *Arg1* und *Cd206* mittels RT- qPCR (Kontrollgruppe n=5, Interventionsgruppe n=4, zweite Versuchsreihe (nicht abgebildet) mit gleichem Effekt). (B) Exemplarische histologische Nierenschnitte mit immunhistochemischer Färbung des Markers ERHR3. (C) Quantifizierung der immunhistochemischen ERHR3 Färbung mittels ImageJ (Kontrollgruppe n=10, Interventionsgruppe n=10, aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (unverbundener T-Test, p < 0.01 (**), p < 0.001 (***), p < 0.0001 (****)).

Für die Quantifizierung der Makrophageninfiltration innerhalb des Nierengewebes wurden Paraffinschnitte angefertigt und die Nierenschnitte anschließend mit dem monoklonalen Antikörper gegen das Zelloberflächen-Antigen ERHR₃, ein spezifischer Marker für Makrophagen, gefärbt. Die immunhistologische Analyse der Nierenschnitte zeigte eine deutliche Infiltration von ERHR₃-positiven Zellen im gesamten Nierengewebe, besonders in der Medulla und Nierenkortex, sowie in Strängen konfluierend hin zur Papille (Abbildung 22B). Die semi-quantitative Auswertung dieser Immunfärbung wies eine signifikante, deutlich erhöhte Anzahl von infiltrierenden ERHR₃-positiven Makrophagen im gesamten Nierenquerschnitt nach Adenin-Diät im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 49 nach (Abbildung 22C).

Zur genaueren Differenzierung der infiltrierenden Immunzellen bzw. Makrophagen Phänotypen wurde eine Analyse der Nieren von Tieren mit Standardfutter (Kontrolle) und Adenin-Diät (Futterregime 2) an Tag 49 mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Anzahl an infiltrierenden CD₄₅⁺ Immunzellen innerhalb die Niere signifikant nach Adenin-Diät im Vergleich zur Kontrollgruppe anstieg (Abbildung 23A). Dies traf sowohl auf die Anzahl der CD_{11b}+F_{4/80}⁺ Makrophagen (Abbildung 23B) als auch die der Neutrophilen (Abbildung 23C) zu. Zudem zeigte sich an Tag 49 ein signifikanter Anstieg von renalen M₁- (CD₂₀₆ negativ, Abbildung 23D) bzw. M₂- (CD₂₀₆ positiv, Abbildung 23E) - ähnlichen Makrophagen in der Interventionsgruppe, verglichen mit gesunden Kontrolltieren. Hier sei hervorzuheben, dass die Anzahl der M₁-ähnlichen Makrophagen im Vergleich zu den M₂-ähnlichen Makrophagen deutlich (ca. fünf-fach) höher war (Abbildung 23D und 23E).

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass es infolge der Adeninkristall-induzierten CKD zu einer erhöhten renalen Infiltration von Immunzellen (insbesondere der Makrophagen) kam. Die Adeninkristall-induzierte Nephropathie begünstigt die Differenzierung überwiegend von pro-entzündlichen M₁-ähnlichen Makrophagen, die letztlich zur chronischen Entzündung und Progression der CKD beitragen und möglicherweise an der Ausbildung von Adeninkristall-Granulomen im Interstitium involviert sind.

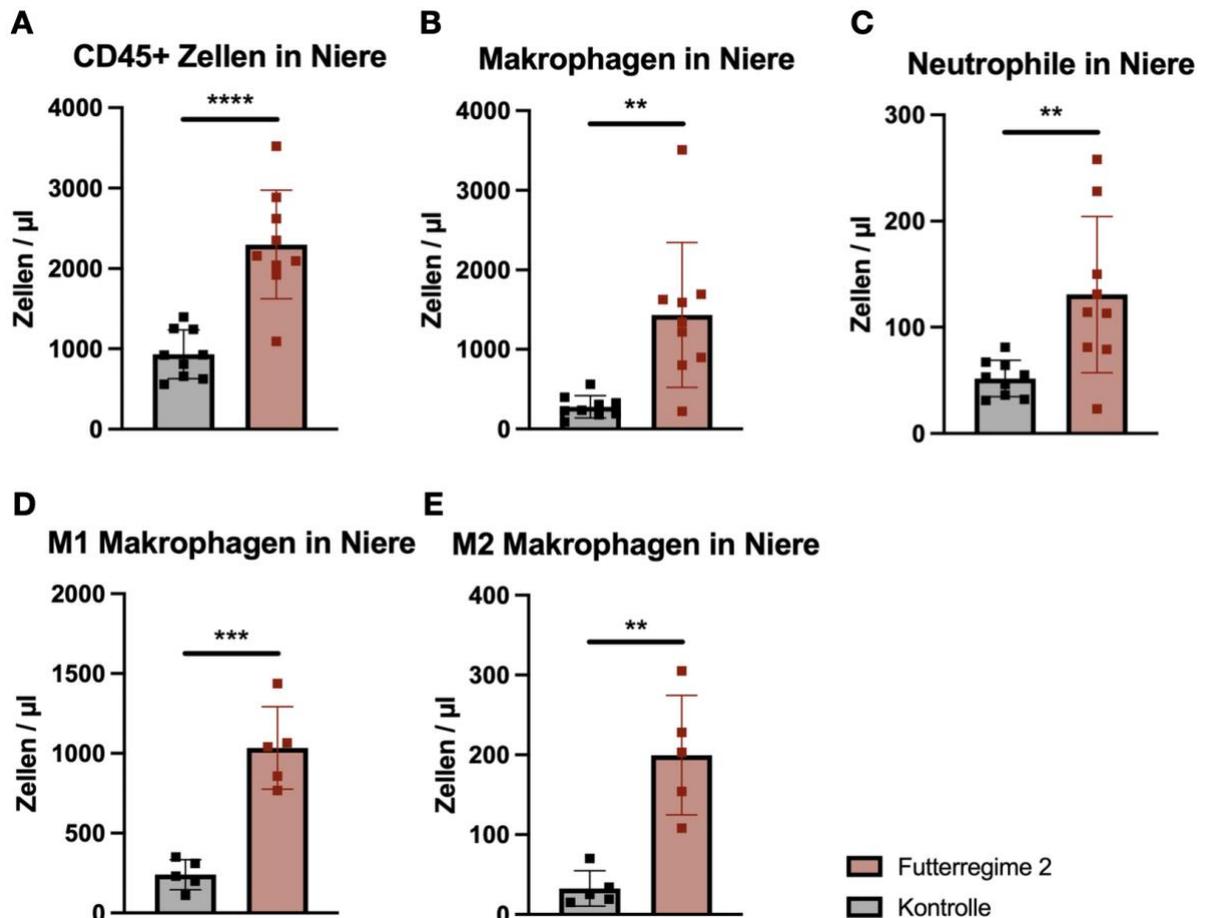


Abbildung 23: Infiltration von Immunzellen und Makrophagen im Nierengewebe infolge Adenin-angereicherter Futterdiät. Interventions- und Kontrolltiere wurden 49 Tage lang mit der in Abbildung 6 beschriebenen Adenin-Diät bzw. Standardfutter gefüttert. Anschließend wurden Tiere euthanasiert und die Nieren entnommen. CD45+ Zellen wurden aus den Nieren isoliert, anschließend mit Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Anzahl der renalen CD45+ Immunzellen (A), Makrophagen (CD45+CD11b+F4/80+) (B), Neutrophile (CD45+CD11b+F4/80-Ly6G+) (C), M1-ähnliche Makrophagen (CD45+CD11b+F4/80+Cx3Cr1+CD206-MHCII+) (D), und M2-ähnliche Makrophagen (CD45+CD11b+F4/80+Cx3Cr1+CD206+MHCIIlow) (E). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (Interventionsgruppe n=9, Kontrollgruppe n=9, aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen (unverbundener T-Test, $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)).

4.2.5 Fibrotischer Umbau infolge der Adeninkristall-induzierten Nephropathie

Ein charakteristisches Merkmal einer CKD ist die interstitielle Fibrose [74, 75]. Um zu untersuchen, ob es infolge der Adenin-Diät auch zu einem fibrotischen Umbau des Nierengewebes kam, wurde u.a. die renale mRNA Expression des Proteins Fibronectin 1, eines in die extrazelluläre Matrix eingelagerten Proteins, mittels RT-qPCR quantifiziert. Die intrarenalen mRNA Expressionswerte zeigten, dass Mäuse mit Adenin-Diät signifikant

erhöhte mRNA Expressionswerte (mehr als 20-fach) von *Fibronectin 1* im Vergleich zu den Kontrolltieren aufwiesen (Abbildung 24A).

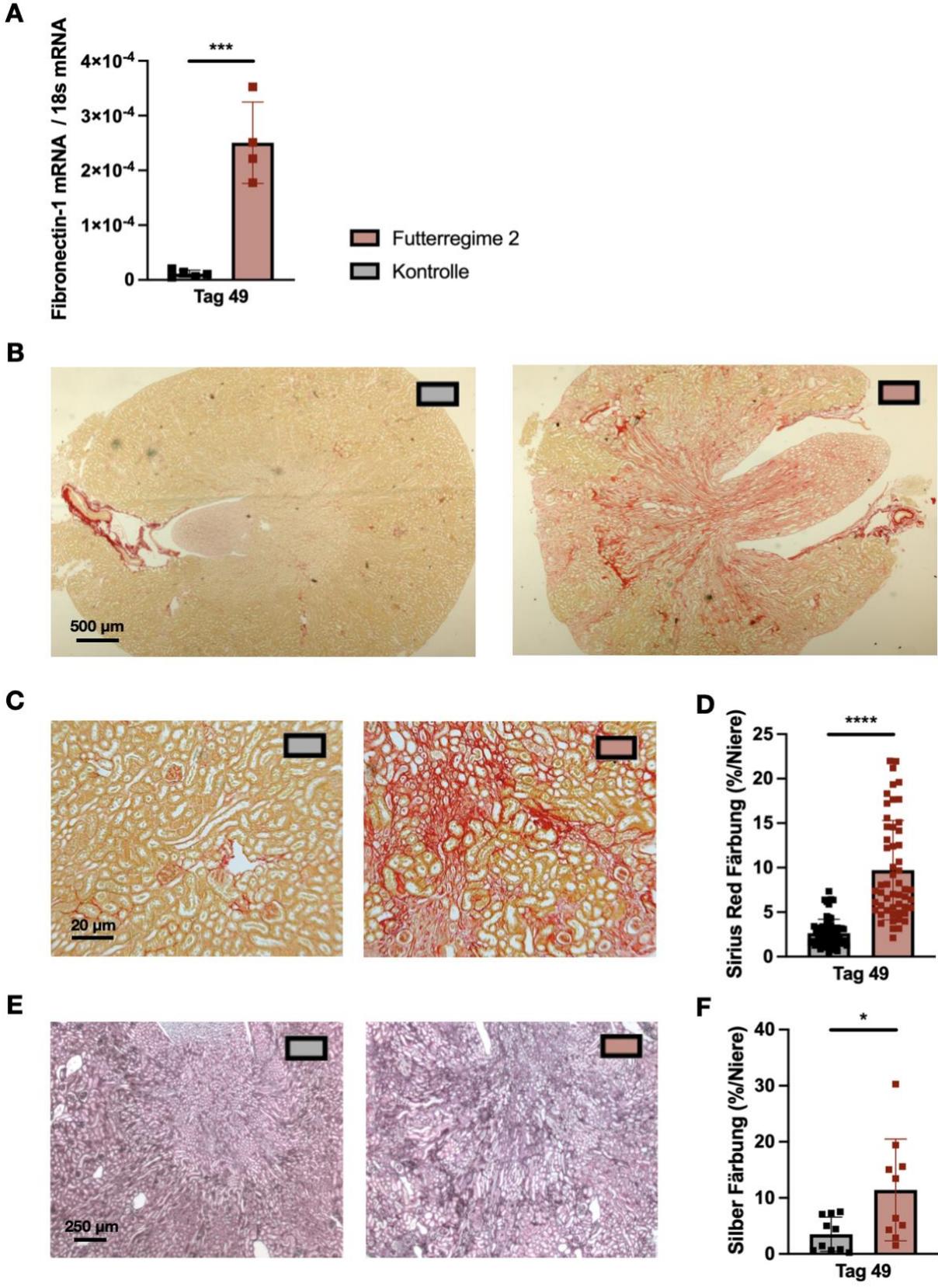


Abbildung 24: Gesteigerte Fibrose in den Nieren der Mäuse mit Adeninkristall-induzierter CKD. C57BL/6N-

Mäuse, die eine 0,2%ige bzw. 0,15%ige Adenin-angereicherte Diät bzw. eine Standarddiät erhielten, wurden an Tag 49 euthanasiert. Die Nieren wurden entnommen und für weitere Auswertungen aufbereitet. (A) Quantitative Analyse der mRNA Expression von Fibronectin 1 mittels RT-qPCR (Kontrollgruppe n=5, Interventionsgruppe n=4, zweite Versuchsreihe (nicht abgebildet) mit gleichem Effekt). (B, C und E) Exemplarische histologische Nierenschnitte mit Picro-Sirius Red Färbung (B und C) sowie Silber Färbung (E). (D und F) Quantifizierung der histologischen Picro-Sirius Red (D) und Silber (F) Nierenfärbungen mittels ImageJ (Kontrollgruppe n=10 mit 65 Aufnahmen für D, Interventionsgruppe n=10 mit 53 Aufnahmen für D, aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (unverbundener T-Test, $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (***) , $p < 0.0001$ (****)).

Für eine histologische Analyse des fibrotischen Nierenumbaus wurden Nierenschnitte von Tieren mit Adeninkristall-induzierter CKD und Kontrolltieren zum Einen mittels Picro-Sirius Red (Abbildung 24B und 24C) und zum Anderen mit Silber (Abbildung 24E) gefärbt. Die Picro-Sirius Red Färbung, welche die Kollagenfasern vom Typ I und III anfärbt, zeigte starke fibrotische Veränderungen des Nierengewebes mit einem hohen Protein-Anteil an extrazellulärer Matrix, Kollagenfasern und fibrotischen Strängen von der Medulla bis zum Kortex in den Tieren mit Adenin-Kristall-induzierter CKD (Futterregime 2) im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 24B und 24C). Die quantitative Auswertung verdeutlichte die signifikant vermehrt auftretende interstitielle Fibrose in den Nieren der CKD Mäuse (Abbildung 24D). Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Silber Färbung (Abbildung 24E und 24F).

Zusammenfassend deuten diese Resultate drauf hin, dass Adeninkristallablagerungen neben dem Tubulusschaden und der Entzündung zu einer interstitiellen Fibrose beitragen, Merkmale, die deutlich für eine CKD sprechen.

4.3 Auswirkungen der Adenin-Diät in einem Mausmodell mit Leukozyten-spezifischem p53-Knock-Out

Die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 ist durch ihre hohe Expression ein zentraler negativer Regulator von p53 in ruhenden Zellen wie beispielsweise Podozyten und tubulären Epithelzellen [104]. Bei akuten tubulären Verletzungen verschlimmert MDM2 die anfängliche Schädigungsphase durch eine NF- κ B-vermittelte Entzündung, in der Heilungsphase fördert das Protein dann jedoch die Regeneration des Gewebes durch die Regulierung von p53 [107]. In der Podozytenhomöostase fungiert MDM2 als entscheidender Faktor, der die Podozyten

vor dem durch eine Überaktivierung von p53 verursachten Zelltod schützt und somit zum lebenslangen Überleben der Podozyten beiträgt [130]. Diese Ergebnisse aus dem Anders Labor zeigten klar, dass eine MDM2-Hemmung und somit die einhergehende unkontrollierte p53 Expression für die Niere schädlich ist. In myeloischen Zellen wurde die Rolle von p53 bei der Adenin-Kristall-induzierten CKD bisher nicht untersucht. Um einen möglichen Einfluss von p53 in Leukozyten auf die Etablierung der Kristall-induzierten CKD nach Adenin-Supplementierung zu testen, wurden Leukozyten-spezifischer p53-defiziente LysMCre:p53flox/flox (p53 k/o) Mäuse verwendet und mit der zuvor beschriebenen Adenin-Diät (Futterregime 2) bzw. Standarddiät für 49 Tage gefüttert. Als Kontrollgruppe dienten C57BL/6N (BL6/N) Wildtypmäuse. Hinsichtlich der Nierenfunktion zeigten die Ergebnisse, dass Tiere mit Leukozyten-spezifischen p53-Defizienz (p53 k/o) im Vergleich zu den Wildtyptieren bereits während der frühen Phase (bis Tag 14) eine signifikant reduzierte GFR nach Adenin-Diät aufwiesen (Abbildung 25A und 25B). Dieser Trend war auch im weiteren Verlauf der Diät zu erkennen; an Tag 42 und 49 waren die leichten Unterschiede bezüglich der GFR zwischen p53 k/o und BL6/N Mäusen nach Adenin-Diät allerdings nicht signifikant (Abbildung 25A und 25B). Die Kontrollgruppen beider Mauslinien mit Standarddiät zeigten keine Abnahme der GFR über den gesamten Zeitraum von 49 Tagen (Abbildung 25A und 25B), wiesen jedoch einen signifikanten Unterschied an Tag 49 auf, der auf die Zunahme der GFR bei den BL6/N Mäusen zurückzuführen ist.

Die Nierenfunktionsparameter Serumharnstoff und -kreatinin waren bei den p53 k/o Tieren im Vergleich zu den BL6/N Tieren nach Adenin-Diät an Tag 14 als auch Tag 49 signifikant erhöht (Abbildung 25C und 25D). Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass p53 in Leukozyten eine schützende, protektive Rolle bei einer Adeninkristall-induzierten Nephropathie vermittelt.

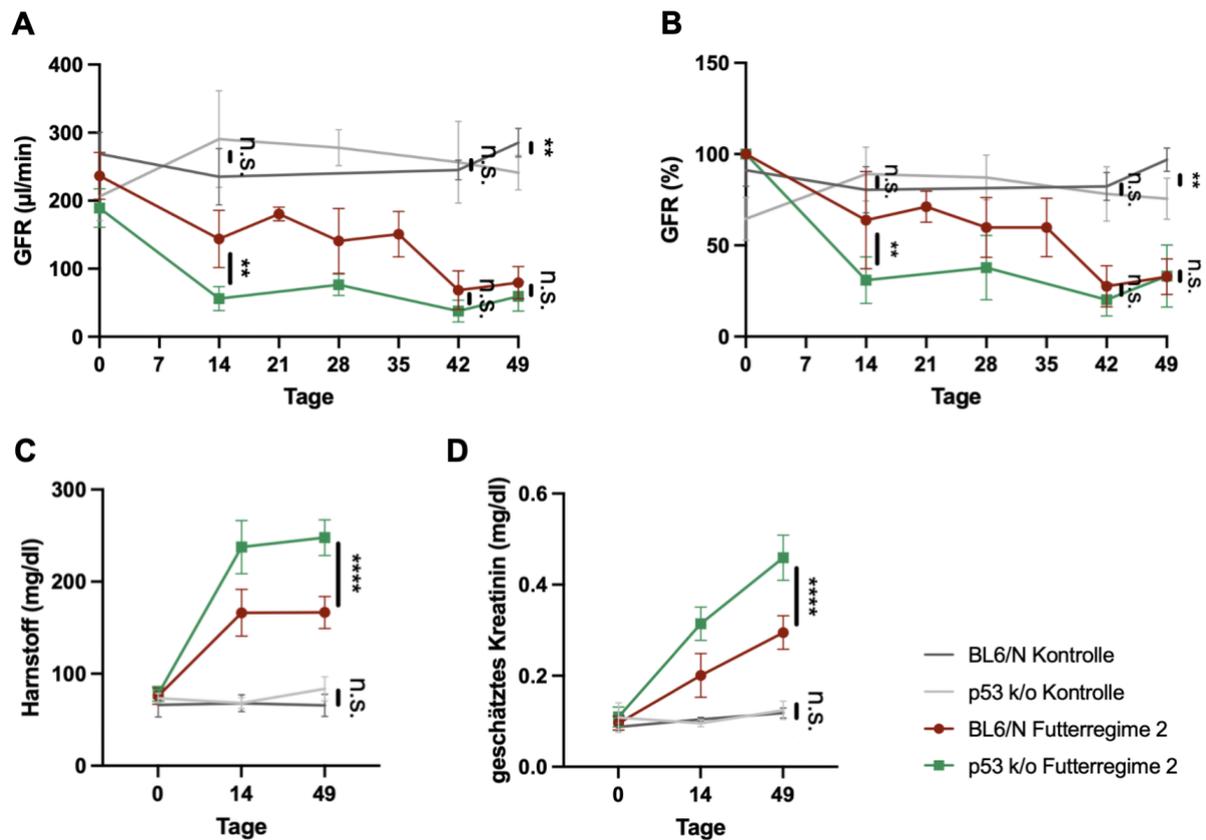


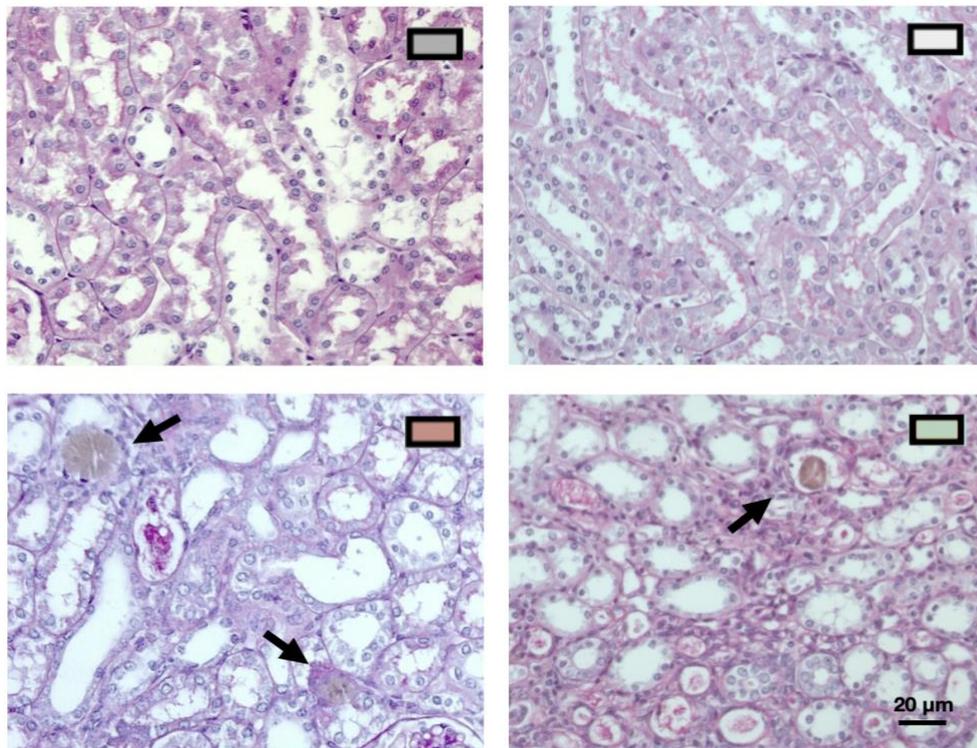
Abbildung 25: p53-defiziente Mäuse weisen eine schlechtere Nierenfunktion nach Adenin-Diät auf. (A) 6 Wochen alte männliche LsyMCre:p53flox/flox Mäuse (p53 k/o) und C57BL6/N (BL6/N) Wildtypmäuse erhielten eine alternierende Futterdiät mit zusätzlich 0,2% bzw. 1,5% Adenin (Futterregime 2) in Zeitintervallen von jeweils 14 Tagen für einen Zeitraum von 49 Tagen. Die Kontrollgruppen erhielten eine normale Standarddiät. Beide Gruppen sind im Vergleich zu BL6/N Mäusen aufgetragen. Bei allen Tieren wurde zu den jeweils angegebenen Versuchstagen die Nierenfunktionsparameter GFR (absolut und relativ, A und B), Harnstoff (C) und Serumkreatinin (D) gemessen. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (Daten jeweils in Duplets gemessen, 2-way-ANOVA, $p < 0.01$ (**), $p < 0.0001$ (****), $p \geq 0.05$ (n.s. = nicht signifikant)).

Nach lichtmikroskopischer Betrachtung von histologischen Gewebeschnitten des Nierenkortex, welche an Tag 49 der Versuchsreihe präpariert wurden, konnten keine gravierenden Unterschiede bezüglich der durch die Diät beeinträchtigten Nierenmorphologie und der Ansammlung von Adeninkristallen zwischen p53 k/o und Wildtyp-Tieren identifiziert werden (Abbildung 26A). Auch die semi-quantitative Auswertung bezüglich der Parameter Nekrose, Verlust des Bürstensaums, tubuläre Dilatation wies keine deutlichen und signifikanten Unterschiede zwischen p53 k/o und Wildtyp-Tieren sowie den entsprechenden Kontrolltieren auf (Abbildung 26B). Lediglich bei der semi-quantitativen Auswertung der Cast Formation in den Tubuluslumen konnte ein

signifikanter Unterschied zwischen den p53 k/o und den BL6/N Kontrolltieren erhoben werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich am Ende der Versuchsreihe an Tag 49 das Fehlen von p53 nicht bzw. nur marginal auf die morphologische Nierenschädigung erkennbar auswirkte. Somit zeigten sich trotz des möglichen positiven Einflusses von p53 auf die Leukozytenfunktion bisher keine nachwirkenden Einflüsse auf die Nierenmorphologie.

A



B

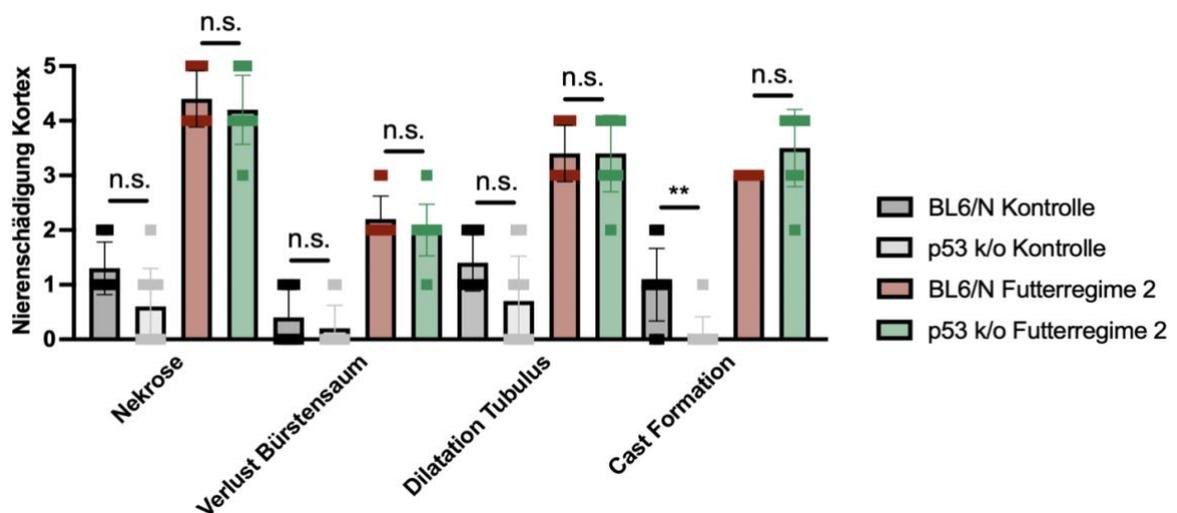


Abbildung 26: Adenin-angereicherte Diät führt zu einer vergleichbaren Nierenschädigung in p53-defizienten Mäusen. Männliche LsyMCre:p53^{flox/flox} (p53 k/o) und BL6/N Mäuse erhielten ein mit 0,2% bzw.

0,15% Adenin-angereichertes Futter bzw. Standardfutter für 49 Tage und wurden anschließend euthanasiert. Anschließend wurden die Nieren entnommen und für weitere Analysen präpariert. Beide Gruppen sind im Vergleich zu C57BL/6N Mäusen aufgetragen. (A) Exemplarische histologische Nierenschnitte mit PAS-Färbung von allen vier Gruppen (Pfeile = Kristalle). (B) Semi- quantitative Beurteilung der Nierenschädigung anhand histologischer Nierenschnittfärbung. Nekrose, Verlust des Bürstensaums, Dilatation der Nierentubuli sowie tubuläre Cast Formation wurden hierfür anhand einer Skala von 0 bis 5 bewertet (0: 0%, 1: <10%, 2: 11 bis 25%, 3: 26 bis 45%, 4: 46 bis 75%, 5: >76%) (Kontrollgruppe n=10, Interventionsgruppe n=10, aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (2-way- ANOVA, $p < 0.01$ (**), $p \geq 0.05$ (n.s. = nicht signifikant)).

Als Nächstes wurde der Effekt von p53 auf die renale Entzündungsreaktion bei der Adeninkristall-induzierten Nephropathie untersucht. Wie in Abbildung 27A gezeigt, waren die intrarenalen mRNA Expressionswerte der proinflammatorischen Zytokine *Tnf- α* und *Il-6* sowohl in p53 k/o als auch BL6/N Mäusen nach Adenin-Diät im Vergleich zur Standarddiät (Kontrolle) an Tag 49 signifikant erhöht. Während kein Unterschied bei der mRNA Expression von *Tnf- α* zwischen p53 k/o und BL6/N Mäusen nach Adenin-Diät zu beobachten war (Abbildung 27A), waren die mRNA Expressionswerte von *Il-6* signifikant in den p53 k/o Mäusen im Vergleich zu den BL6/N Mäusen nach Adenin-Diät an Tag 49 erhöht (Abbildung 27A). Die immunhistochemische Färbung für Ly6B2 (Abbildung 27B) verdeutlichte die starke Infiltration von Leukozyten (Monozyten und Neutrophile) innerhalb der Nieren beider Mauslinien nach Adenin-Diät. Interessant zu beobachten war ein signifikanter Anstieg von Leukozyten im gesamten Nierengewebe der p53 k/o Tiere im Vergleich zum BL6/N Wildtyp nach Adenin-Diät mittels semi-quantitativer Auswertung der Nierenschnitte (Abbildung 27C). Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die p53-Defizienz in Leukozyten vermutlich zur erhöhten Entzündung und vermehrten Leukozyteninfiltration bei der Adeninkristall-induzierten Nephropathie beiträgt.

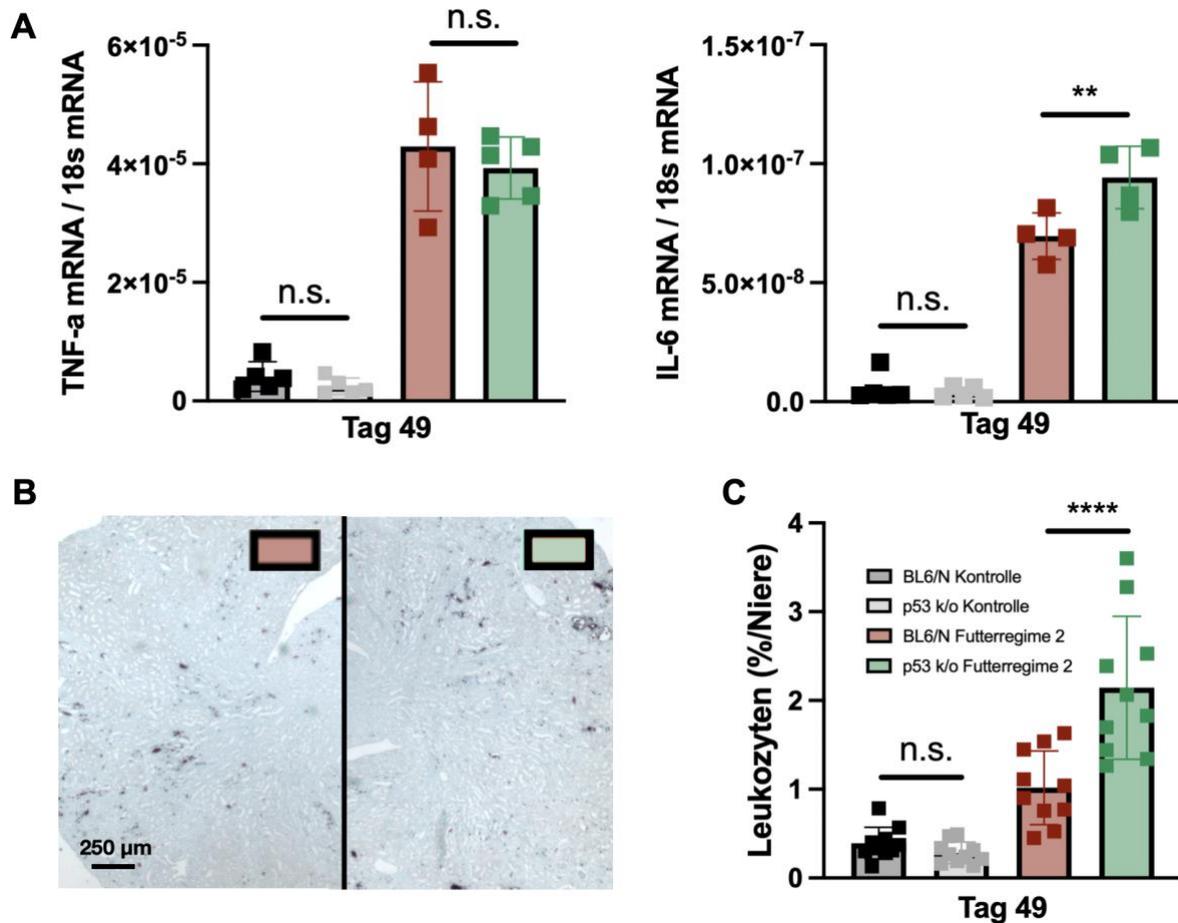
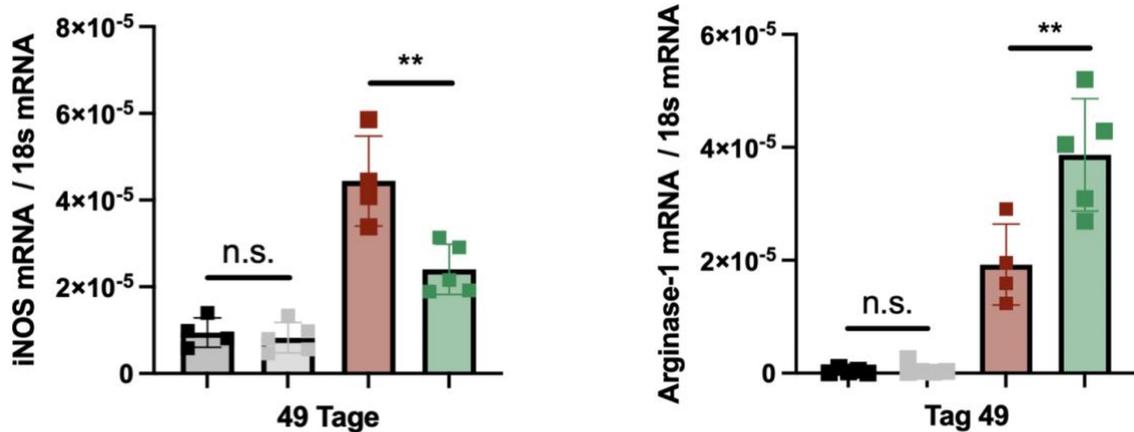


Abbildung 27: p53-Defizienz in Leukozyten verstärkt die Entzündungsreaktion während der Adenin-Kristall-induzierten Nephropathie. Männliche LsyMCre:p53flox/flox (p53 k/o) Mäuse und C57BL/6N (BL6/N) Wildtypiere wurden mit Adenin-angereicherter Nahrung bzw. Standardnahrung gefüttert und an Tag 49 euthanasiert. Anschließend wurden die Nieren entnommen und für weitere Analysen vorbereitet. Beide Gruppen sind im Vergleich zu C57BL/6N Mäusen aufgetragen. (A) Quantitative Analyse der mRNA Expression von *Tnf-α* und *Il-6* mittels RT-qPCR (Kontrollgruppe n=5, Interventionsgruppe n=4, zweite Versuchsreihe (nicht abgebildet) mit gleichem Effekt). (B) Beispielhafte histologische Schnittbilder von Nieren mit immunohistochemischer Leukozyten Färbung mit dem Antikörper Ly6B2. (C) Quantifizierung der Leukozyten in Nierenschnitten mittels ImageJ (Kontrollgruppe n=10, Interventionsgruppe n=10, aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (2-way-ANOVA, p < 0.01 (**), p < 0.0001 (****), p >= 0.05 (n.s. = nicht signifikant)).

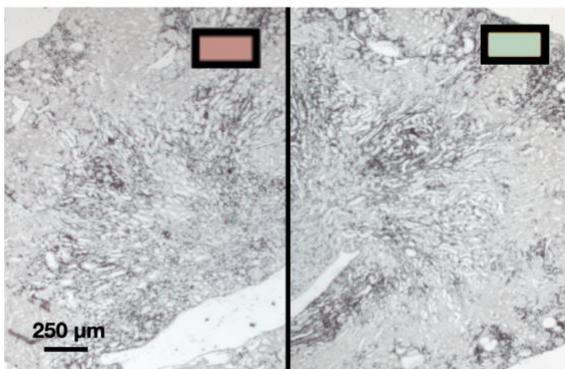
Um zu untersuchen, ob die Ausschaltung von p53 in myeloischen Zellen einen Einfluss auf Makrophagen und deren Phänotypausbildung bei der Adeninkristall-induzierten Nephropathie hat, wurden sowohl die mRNA Expression von *iNos* und *Arg1* mittels RT-qPCR ermittelt als auch Nierenschnitte mit dem Makrophagen Marker ERHR₃ gefärbt. Die mRNA Expressionswerte von *iNos* und *Arg1* waren signifikant in beiden Mauslinien (p53 k/o und BL6/N) nach Adenin-Diät im Vergleich zur Standarddiät (Kontrolle) erhöht (Abbildung 28A).

In p53 k/o Mäusen waren die mRNA Expressionswerte von *iNos* signifikant reduziert (Abbildung 28A), hingegen die von *Arg1* signifikant erhöht im Vergleich zu BL6/N Mäusen nach Adenin-Diät (Abbildung 28A). Die immunhistologische Analyse zeigte eine signifikante Zunahme von infiltrierenden ERHR3-positiven Makrophagen ins Nierengewebe nach Adenin-Diät gegenüber der Standarddiät (Kontrolle) in beiden Mauslinien (Abbildung 28B und 28C). Hervorzuheben ist, dass signifikant mehr infiltrierende Makrophagen in den Nieren von p53 k/o Mäusen im Vergleich zu BL6/N Mäusen detektiert wurden (Abbildung 28B und 28C). Diese Resultate liefern erste Hinweise dafür, dass die Anwesenheit von p53 in myeloischen Zellen/Leukozyten die Infiltration von Makrophagen inhibiert. Zudem induziert p53 möglicherweise bei der Adeninkristall-induzierten CKD die Differenzierung der Makrophagen in einen proinflammatorischen M₁-ähnlichen Phänotyp während die Bildung des M₂-ähnlichen Phänotypes nicht gefördert oder unterdrückt wird.

A



B



C

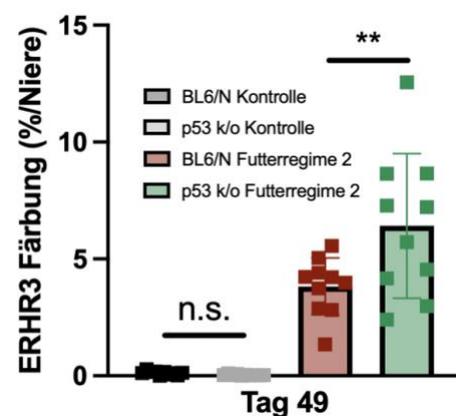


Abbildung 28: Eine Adenin-angereicherte Futterdiät verursacht eine verstärkte renale Infiltration von Makrophagen in p53-defizienten Mäusen. (A) Quantitative Analyse der mRNA Expression von *iNos* und *Arg1* mittels RT-qPCR (Interventionsgruppe n=4, Kontrollgruppe n=5, zweite Versuchsreihe (nicht abgebildet) mit gleichem Effekt). (B) Exemplarische histologische Nierenschnitte mit immunohistochemischer Färbung des

Markers ERHR₃ in LsyMCre:p53flox/flox (p53 k/o) Mäusen und C57BL6/N (BL6/N) Wildtyp Mäusen. (C) Quantifizierung der immunhistochemischen ERHR₃ Färbung mittels ImageJ (Kontrollgruppe n=10, Interventionsgruppe n=10, aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (2-way-ANOVA, p < 0.01 (**), p >= 0.05 (n.s. = nicht signifikant)).

Schließlich wurde zur Untersuchung der renalen Fibrose in allen Mausgruppen die mRNA Expression von *Fibronectin-1* mittels RT-qPCR quantifiziert. Bei den p53 k/o Tieren war im Vergleich zu den BL6/N Wildtypmäusen nach Adenin-Diät eine deutlich und signifikant weniger erhöhte Zunahme der mRNA Expression von *Fibronectin-1* zu beobachten (Abbildung 29A). Die histologische Untersuchung von Picro-Sirius Red-gefärbten Nierenschnitten lies allerdings sowohl bei den p53 k/o als auch BL6/N Tieren einen fibrotischen Umbau des Nierengewebes nach Adenin-Diät erkennen (Abbildung 29B); verglichen mit BL6/N Tieren war bei p53 k/o Tieren kein signifikanter Unterschied nach quantitativer Auswertung der Nierenschnitte erkennbar (Daten nicht gezeigt).

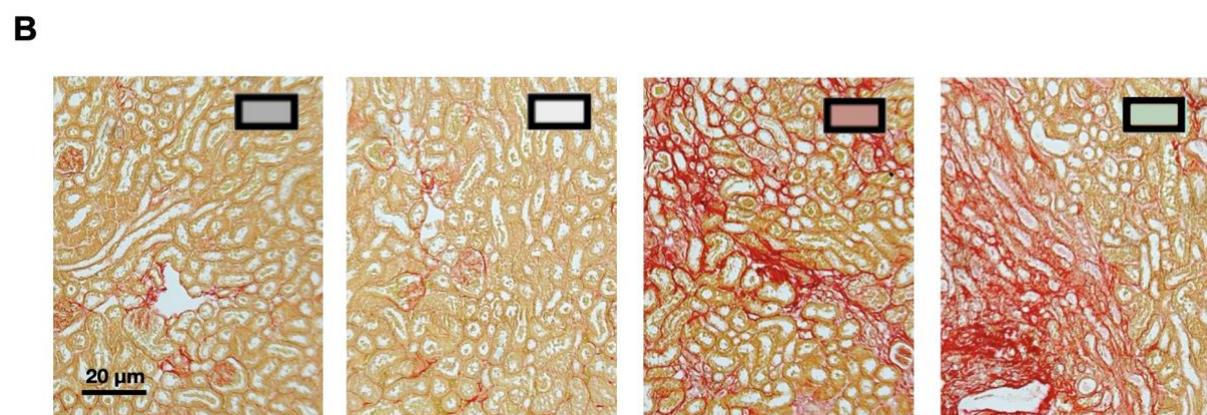
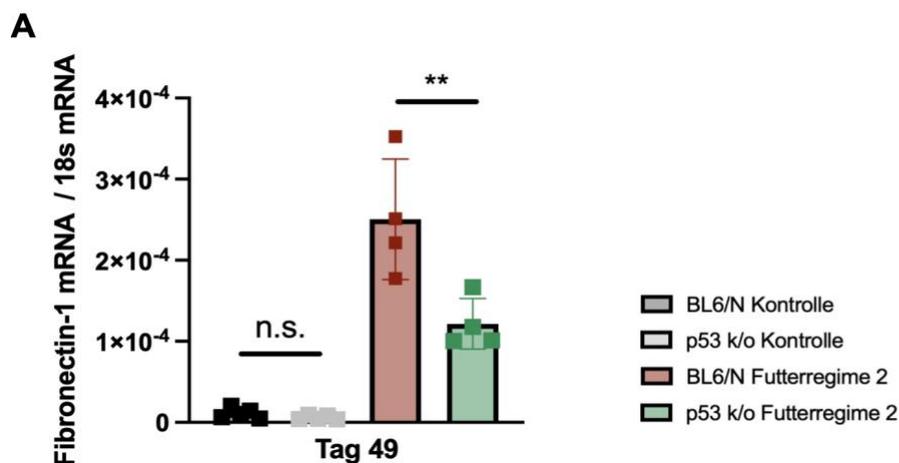


Abbildung 29: p53 hat einen geringen Einfluss auf den fibrotischen Umbau bei der Adenin-Kristall-induzierten CKD. Männliche LsyMCre:p53flox/flox (p53 k/o) Mäuse und C57BL6/N (BL6/N) Wildtypiere wurden mit Adenin-angereicherter Nahrung bzw. Standardnahrung gefüttert und an Tag 49

euthanasiert. Die Nieren wurden entnommen und für weitere Auswertungen aufbereitet. (A) Quantitative Analyse der mRNA Expression von *Fibronectin-1* mittels RT-qPCR (Kontrollgruppe n=5, Interventionsgruppe n=4, zweite Versuchsreihe (nicht abgebildet) mit gleichem Effekt). (B) Exemplarische histologische Nierenschnitte mit Picro-Sirius Red Färbung. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert +/- SEM dar (2-way-ANOVA, $p < 0.01$ (**), $p \geq 0.05$ (n.s. = nicht signifikant)).

5 Diskussion

5.1 Überblick

Die APRT-Defizienz ist eine seltene autosomal-rezessive genetische Störung, bei der das Enzym APRT, welches die Umwandlung von Adenin in AMP katalysiert, defekt ist (siehe 1.2.3) [45] und somit Adenin zu 2,8-DHA oxidiert wird. Da 2,8-DHA eine geringe Löslichkeit aufweist, kann es zum Ausfallen von Kristallen im Urin kommen, die letztlich eine Urolithiasis und Kristall-induzierte Nephropathie begünstigen [43, 44]. Die Diagnose des APRT-Mangels erfolgt häufig erst spät im Erwachsenenalter, so dass die betroffenen Patienten schwere Nierenschäden, eine fortschreitende CKD und häufig sogar Nierenversagen im Endstadium entwickeln. Eine frühzeitige Diagnose ist somit von entscheidender Bedeutung, da eine medikamentöse Therapie mit Allopurinol den Gen- und Enzymdefekt wirksam verhindern kann [56]. Aufgrund des bisherigen Mangels von *in vitro* Zellkultursystemen mit Adenin- bzw. 2,8-DHA-Kristallen und eines robusten Mausmodelles der 2,8-DHA-Nephropathie, sollten in dieser Arbeit zum besseren Verständnis der menschlichen APRT-Defizienz drei Ziele verfolgt werden.

Im ersten Teilprojekt meiner Arbeit wurde der Einfluss von Adeninkristallen auf *in vitro* kultivierte Makrophagen in Bezug auf deren Immunaktivierung und Phänotyp-Differenzierung untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein *in vitro* Zellkultursystem aus primären, Knochenmark-isolierten Monozyten etabliert; mithilfe von M-CSF wurden Monozyten zu Makrophagen erfolgreich ausdifferenziert und anschließend mit selbst kristallisierten bzw. kommerziell erworbenen Adeninkristallen für unterschiedliche Zeiten im Vergleich zu LPS stimuliert, um die Wirkung auf Immunantwort und Zytotoxizität der Makrophagen zu analysieren. Im Fokus stand die Analyse der Expression von verschiedenen Zytokinen und spezifischen Markern von aktivierten Makrophagen durch qRT-PCR und ELISA. Es wurde außerdem die Wirkung der Adeninkristalle auf die Zytotoxizität und die Zellzyklusphasen der Makrophagen mittels durchflusszytometrischer Analysen untersucht, wobei der mögliche Einfluss von p53 auf den Zellzyklus untersucht wurde. Diese Studien erbrachten insgesamt erste Hinweise, dass Adeninkristalle eine proinflammatorische Reaktion induzieren und eine Differenzierung sowohl in proinflammatorische M₁-ähnliche als auch alternativ aktivierte M₂-ähnliche Makrophagen möglicherweise begünstigen. Die Exposition von Adeninkristallen führte außerdem zu einer verminderten Zellintegrität der Makrophagen und einer Veränderung der Zellzyklusregulation. Die Rolle von p53 in der

Zellzyklusregulation konnte trotz erfolgreicher Inhibierung durch Pifithrin- α im Rahmen dieser Studie noch nicht abschließend beantwortet werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Im zweiten Hauptprojekt meiner Dissertationsarbeit war das Ziel, ein experimentelles Mausmodell für eine 2,8-DHA Kristall-induzierte Nephropathie durch eine mit Adenin-angereicherte Ernährung zu etablieren, um langfristig ein besseres Verständnis der für die APRT-Defizienz zugrunde liegenden Krankheitsmechanismen zu gewinnen. Dazu wurden über den Zeitraum von 49 Tagen drei verschiedene, mit Adenin angereicherte Futterregime vergleichend bei sechs Wochen alten Mäusen getestet, um die Diät zu identifizieren, die zu einem moderaten, aber kontinuierlichen GFR-Abfall und einer gemäßigten Anzahl von Kristallablagerungen im Nierenkortex und der Medulla führt. Die dabei identifizierte Adenin-Diät, die tatsächlich erste Belege für die Entwicklung einer chronischen Nephropathie lieferte, wurde anschließend erneut durchgeführt unter Hinzunahme weiterer Analysen. Hierbei wurden auch Nierenfunktionsparameter wie Plasmaspiegel von Kreatinin und Harnstoff untersucht, sowie eine detailliertere histologische Analyse der Nierenmorphologie und der renalen Infiltration von Leukozyten und Thrombozyten durchgeführt. Außerdem wurden Serum- und Differentialblutanalysen sowie durchflusszytometrische und immunhistologische Analysen von Immunzellen im Blut (Neutrophile) und Nierengewebe (Makrophagen) als Indikatoren für die systemische und renale Entzündung durchgeführt. Schließlich wurde der fibrotische Umbau der Niere charakterisiert. Unter den drei getesteten Diäten erwies sich bei sechs Wochen alten Mäusen eine Fütterung mit abwechselnd 0,2% bzw. 0,15% Adenin in 14-tägigen Zeitblöcken als die beste Methode zur Induktion einer chronischen Nephropathie. Dieses Futterregime führte zu einem moderaten, aber trotzdem kontinuierlichen Abfall der Nierenfunktion, gemessen an der sinkenden GFR sowie dem zunehmenden Plasmaspiegel von Kreatinin und Harnstoff. Zudem konnte eine veränderte Nierenmorphologie, die spezifische Ablagerung von Kristallen im Nierenkortex und Medulla und eine Infiltration von Leukozyten und Thrombozyten spezifisch in das Nierengewebe nachgewiesen werden, was insgesamt klar auf eine renale Entzündung hindeutete. Molekularbiologische Analysen zeigten, dass am Ende der Diät insbesondere pro-entzündliche M₁-ähnliche Makrophagen im geschädigten Nierengewebe vorhanden waren; M₂-ähnliche Makrophagen konnten ebenso nachgewiesen werden, allerdings weniger stark ausgeprägt. Die renale Infiltration durch verschiedene Makrophagen-Subpopulationen

wurde begleitet durch eine stark zunehmende *Fibronectin-1* Expression. Weitere Hinweise auf eine interstitielle Fibrose lieferten zudem eine Reihe von histologischen Analysen. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass die hier entwickelte Adenin-Diät eine chronische Kristall-induzierte Nephropathie verursachte und als experimentelles Tiermodell zur Charakterisierung der humanen APRT-Defizienz genutzt werden kann.

Basierend auf der erfolgreichen Etablierung des Mausmodells der Adeninkristall-induzierten chronischen Nephropathie, war das dritte Ziel dieser Arbeit, die Rolle von p53 in myeloischen Zellen im Verlauf der chronischen Nierenerkrankung zu analysieren. Dazu wurde eine transgene, Zell-spezifische Mauslinie verwendet, bei der p53 konstitutiv in Leukozyten ausgeschaltet ist. Die Adenin-angereicherte Diät wurde folglich mit transgenen p53 k/o Mäusen im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt, erneut parallel mit jeweils identischen Mausgruppen, die Normalfutter erhielten. Die zentrale Frage bestand darin, welche Funktion p53 in Leukozyten während der Induktion und Etablierung der Adeninkristall-induzierten CKD einnimmt. Im Verlauf der Diät wurden an mehreren Tagen die Nierenfunktionsparameter GFR, Serumharnstoff und Kreatinin bestimmt. Darüber hinaus wurden am Ende der Diät (Tag 49) eine detailliertere histologische Analyse der Nierenmorphologie sowie eine Bestimmung der renalen Entzündung und des fibrotischen Umbaus durchgeführt. Tiere mit Leukozyten-spezifischer p53-Defizienz im Vergleich zu Wildtyp-Tieren wiesen bereits während der frühen Phase der Adenin-Diät eine signifikant reduzierte Nierenfunktion auf. Eine Verschlechterung der Nierenfunktion bei p53 k/o Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen setzte sich im Verlauf der Diät fort, insbesondere im Fall der Parameter Serumkreatinin und Harnstoff; im Fall der GFR wurden die Unterschiede allerdings geringer. Am Ende der Versuchsreihe an Tag 49 konnte im Vergleich zu beiden Mausgruppen mit Normaldiät erneut eine signifikante morphologische Nierenschädigung und ein fibrotischer Umbau des Nierengewebes festgestellt werden, der den chronischen Charakter der Nierenerkrankung -induziert durch Adeninkristalle- unterstrich. Das Fehlen von p53 in Leukozyten wirkte sich allerdings nicht gravierend auf die terminale morphologische Schädigung, sondern überraschenderweise eher positiv auf das Ausmaß der Fibrose im Nierengewebe aus. Hinsichtlich des möglichen Einflusses von p53 auf die renale Entzündungsreaktion bei Adeninkristall-induzierter Nephropathie wurde festgestellt, dass der p53 k/o im Vergleich zum Wildtyp zu einer signifikant erhöhten Expression von IL-6 und einer gesteigerten Leukozyteninfiltration der Nieren führte. Dies deutet darauf hin, dass eine

p53-Defizienz in Leukozyten möglicherweise zu einer verstärkten Inflammation infolge der Bildung von Adeninkristall-Ablagerungen führt. Die immunhistologische Analyse unterstützte diesen Befund, da eine signifikant erhöhte Infiltration von ERHR3-positiven Makrophagen in den Nieren von p53 k/o Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden konnte. Außerdem war in p53 k/o Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren die *iNos* Expression signifikant reduziert, während die von *Arg1* signifikant erhöht war. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass durch p53 die Infiltration von Makrophagen in die geschädigten Nieren möglicherweise unterdrückt und die Differenzierung von Makrophagen in einen proinflammatorischen M1-ähnlichen Phänotyp moduliert wird. Die Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass p53 in Leukozyten möglicherweise eine schützende, protektive Rolle bei einer Adeninkristall-induzierten Nephropathie vermittelt.

5.1.1 Adeninkristalle induzieren eine Entzündungsreaktion und die Differenzierung von proinflammatorischen M1-ähnlichen als auch alternativ aktivierten M2-ähnlichen Makrophagen *in vitro*

Vorherige Arbeiten aus unserer Abteilung hatten gezeigt, dass eine Vielzahl von Kristallen, Partikeln und Aggregaten, die in der Umwelt und durch Stoffwechselprozesse entstehen, inklusive Kalziumphosphat, Kalziumoxalat, Cholesterin, Silika, Asbest und Harnsäurekristalle, nach Inkubation mit *in vitro* kultivierten Zellen wie bspw. Nierenzellen, Neutrophilen, und aus Knochenmark differenzierten dendritischen Zellen und Makrophagen die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-1 β , TNF- α , IL-6 und IL-18 triggern. Zur Freisetzung dieser proinflammatorischen Zytokine müssen die Kristalle phagozytiert werden, was wiederum die Zellaktivierung des NLRP3-Inflammasoms und die Freisetzung extrazellulärer DNA, Proteine und Proteasen (NETs/METs) induziert (siehe 1.3.2) [131-134]. Kristalline Partikel induzierten diese Prozesse in dosisabhängiger Weise *in vitro* ([132-134]. Nach Exposition beispielsweise von aktivierten Knochenmarks-differenzierten dendritischen Zellen mit Kalziumoxalat über einen Zeitraum von sechs Stunden konnte die Freisetzung von IL-1 β in dosisabhängiger Art und Weise nachgewiesen werden, allerdings nur, wenn die Zellen mit LPS, TNF- α , IL-1 α oder Histonen vorstimuliert wurden [132], da dendritische Zellen sowie Makrophagen ein Priming-Signal für die Freisetzung von Zytokinen benötigen. Die Konzentration von Kalziumoxalat, welche zur stärksten Freisetzung von IL-1 β

fürhte, lag in dieser Studie bei 300 mg/ml; deutlich abweichende Konzentrationen (30 bzw. 1000 mg/ml) stimulierten dagegen nur noch suboptimal [132].

In der vorliegenden Arbeit konnten bereits erste Hinweise dafür gewonnen werden, dass es *in vitro* nach Priming von Knochenmark-differenzierten Makrophagen mit LPS und anschließender dreistündiger Exposition mit zwei verschiedenen Adeninkristall-Präparationen zur signifikant erhöhten mRNA Expression der proinflammatorischen Zytokine *Tnf- α* und *Il-6* kommt; im Fall von IL-6 konnte die Aktivierung auch auf Proteinebene nach Sekretion ins Kulturmedium nachgewiesen werden. Im Vergleich zu LPS (Positivkontrolle) waren die mRNA Expressionswerte von *Tnf- α* und *Il-6* nach Stimulation mit Adeninkristallen niedriger. Die mRNA Expression der M2-ähnlichen Makrophagen-spezifischen Gene *Cd206* und *Arg1* wurde nach Stimulation mit Adeninkristallen ebenfalls induziert, im Fall von *Arg1* signifikant. Eine Zunahme der mRNA Expression von *iNos*, eines Schlüsselenzyms, das unter Stressbedingungen große Mengen von Stickstoffmonoxid synthetisiert, war nach Adeninkristall-Stimulation im Vergleich zur Medium-Kontrolle nicht erhöht, jedoch nach Stimulation mit LPS. Eine längere Inkubationszeit der Makrophagen mit Adeninkristallen von acht bzw. 18 Stunden erhöhte die *Il-6* bzw. *Arg1* mRNA Expressionswerte im Vergleich zur dreistündigen Stimulation. Die Induktion des NLRP3-Inflammasomkomplexes durch Kristalle spielt bei der Freisetzung von IL-1 β eine entscheidende Rolle. Meine Daten zeigen, dass die Expression der Inflammasom-Komponente *Asc* nach Stimulation mit Adeninkristallen im Vergleich zur Medium-Kontrolle erhöht war. Dies ist im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen proinflammatorischen Effekten von kristallinen Partikeln auf Nierenzellen und Immunzellen, wie z.B. Makrophagen (siehe 1.3) [23, 133-135]. Das heißt, dass Kristalle proinflammatorische Eigenschaften aufweisen und eine Entzündungsreaktion begünstigen. Im Gegensatz dazu weisen verschiedene lösliche Metabolite, beispielsweise Harnsäure, anti-entzündliche und anti-oxidative Eigenschaften auf. Kürzlich wurde gezeigt, dass die lösliche Harnsäure die proinflammatorischen Funktionen von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen inhibiert [136-138] und anti-oxidativ wirkt [137].

Kristalle induzieren nicht nur die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren bei Immun- und nicht-Immunzellen, sondern wirken auch zytotoxisch auf Zellen, Mechanismen, die zur Nekroinflammation beitragen [23, 68, 69]. Die zytotoxische Wirkung von Adeninkristallen auf Makrophagen, gemessen an zellulärer Freisetzung von LDH, konnte hier nachgewiesen

werden. Ob Adeninkristalle einen apoptotischen und/oder nekrotischen Zelltod in Makrophagen induzieren ist bisher unklar und benötigt weitere Analysen. Da es bei der menschlichen APRT-Defizienz zur Ausbildung und Akkumulierung von 2,8-DHA-Kristallen kommt, muss zukünftig auch die Wirkung dieser Kristalle auf die Funktionen und Reaktionen von Makrophagen in ähnlicher Weise untersucht werden; diese kommerziell-erhältliche Substanz besitzt im Vergleich zu Adenin andere chemische Eigenschaften, wie beispielsweise Löslichkeitsprodukt und pKs-Wert.

Es ist bekannt, dass p53 eine Rolle bei der Pathogenese von Nierenerkrankungen spielt und speziell die Differenzierung, den Zellzyklus und Funktionen von Makrophagen beeinflusst (siehe 1.4.3) [104, 109]. Um den Effekt von Adeninkristallen auf den Zellzyklus der Makrophagen zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die ersten Daten deuten darauf hin, dass Adeninkristalle keinen Einfluss auf die G₀/G₁- und die S-Phase des Zellzyklus der Makrophagen im Vergleich zur Medium-Kontrolle besitzen, allerdings erhöhte sich die Anzahl der Kristall-aktivierten Makrophagen in der G₂/M-Phase. Die Inhibierung von p53 mittels Pifithrin- α reduzierte dagegen die Anzahl der Makrophagen in dieser Zellzyklusphase. Nach meinem jetzigen Kenntnisstand gibt es bisher keine Arbeiten, die am Modell von *in vitro* kultivierten Makrophagen den Einfluss von Kristallen auf den Zellzyklus und die Rolle von p53 dabei adressiert haben. Bei Virus- bzw. Bakterien-infizierten Makrophagen ist dagegen mehr bekannt, beispielsweise, dass p53 durch seine regulatorische Rolle im Zellzyklus dazu beitragen kann, die Replikation der infektiösen Erreger zu begrenzen. Die genaue Rolle von p53 kann allerdings je nach Erregerspezies und dem spezifischen Kontext variieren [139]. Weitere Forschung ist daher erforderlich, um die genauen Effekte von Adenin und 2,8-DHA auf *in vitro* kultivierte Makrophagen und die Rolle von p53 im Detail zu entschlüsseln.

5.1.2 Die Bildung renaler Adeninkristalle induziert eine chronische Niereninsuffizienz

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wurde ein Mausmodell zur Adeninkristall-induzierten chronischen Nephropathie etabliert. Hierfür wurde sechs Wochen alten Mäusen abwechselnd ein 0,2% bzw. 0,15% Adenin-angereichertes Futter in Zeitabschnitten von jeweils 14 Tagen verabreicht (Futterregime 2). Die Gabe des Adenin-angereicherten Futters begünstigte die Bildung und Ablagerung von Adeninkristallen in der Niere, was wiederum zu tubulären Schäden, chronischer Entzündung und interstitieller Fibrose führte. Im Vergleich dazu steht

eine experimentelle Studie, bei der 10-12 Wochen bzw. 60 Wochen alte Mäuse mit einer 0,2% Adenin-angereicherten Diät für 21 Tage gefüttert wurden, um eine Adeninkristall-induzierte Nephropathie zu induzieren [91]. Allerdings zeigten meine Vorversuche, dass die Fütterung von nur sechs Wochen alten Mäusen mit einer kontinuierlichen Gabe von 0.2% Adenin (Futterregime 1) zu einer starken Abnahme der GFR von 100% auf 16% innerhalb der ersten 21 Tage führte und die Versuchsreihe aufgrund der starken Abnahme der Nierenfunktion somit abgebrochen werden musste. Aus diesem Grund wurde das alternierende Futterregime 2 verwendet. Hier nahm die GFR, wie beabsichtigt, moderat jedoch kontinuierlich auf ca. 29% der Anfangswerte im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Somit konnte die Diät über einen deutlich längeren Zeitraum von 49 Tagen verabreicht werden. Obwohl das Mausmodell von Klinkhammer et al. aufgrund der deutlich kürzeren Gesamtlaufzeit (21 Tage) für die experimentelle Durchführung praktischer ist, wurde die GFR als primärer klinischer Endpunkt nicht bestimmt und es bleibt unklar, ob die Tiere nach kontinuierlicher Gabe von 0.2% Adenin möglicherweise doch eine starke Nierenfunktionseinschränkung aufwiesen. Zudem sei zu erwähnen, dass das hier entwickelte Mausmodell eher die Situation einer genetisch-bedingten APRT-Defizienz widerspiegelt, bei der es explizit in einem langsamen, chronischen Prozess zur Entwicklung einer Kristallopathie kommt.

Charakteristisch für Kristall-induzierte Nephropathien ist die Bildung und Ablagerung von Kristallen in den Tubuli der Niere (siehe 1.2 und 1.3, u.a.) [23, 24, 140]. Kleine Kristalle werden von Tubulusepithelzellen und Immunzellen phagozytiert, was die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und den Prozess der Nekrose begünstigt, Mechanismen, die zur Nekroinflammation beitragen (siehe 1.3.2) [23]. Auch in dem hier etablierten Mausmodell wurden Ablagerungen von Adeninkristallen anhand von PAS-gefärbten Nierenschnitten am Ende der Adenin-Diät im Kortex und der Medulla nachgewiesen, durch Polarisationsmikroskopie ebenso detektierbar. Nach weiterer Vergrößerung fanden sich die Kristalle überwiegend im Tubulussystem. Auch im Interstitium, wohin Kristallablagerungen durch Extratubulationen gelangen, konnten diese infolge der Adenin-Diät vereinzelt nachgewiesen werden. Granulome konnten histologisch vermutlich aufgrund der Verwendung von Standardpräparationen nicht identifiziert werden, da sie lediglich in unfixierten Cryo-Schnitten nachweisbar sind [39, 140]. Infolge der von Klinkhammer verwendeten Adenin-Diät wurden Granulome im Interstitium bei Ratten indessen histologisch identifiziert, bestehend aus vielkernigen Riesenzellen [91]. Bei Harnsäure-

induzierten Kristallgranulomen ist bekannt, dass diese sich erst spät entwickeln, dann aber zum Fortschreiten der CKD beitragen, weil Harnsäurekristalle in den Nieren eine M₁-ähnliche Makrophagen-bezogene interstitielle Entzündung und Fibrose auslösen [39].

Die chronische Nierenschädigung wurde in dieser Arbeit außerdem durch RT-PCR anhand der Marker *KIM-1* und *Ngal* nachgewiesen. Generell können Kristalle Immun- und nicht-Immunzellen aktivieren und somit zur Nekroinflammation beitragen, so auch Adeninkristalle: unsere Analyse konnte nachweisen, dass neben der erhöhten mRNA Expression von *Tnf-α* und *Il-6* auch die Anzahl von Ly6B₂-positiven infiltrierenden Leukozyten und Makrophagen nach Gabe der Adenin-Diät signifikant anstieg. Makrophagen können sowohl in pro-entzündliche M₁-ähnliche Makrophagen als auch M₂-ähnliche Makrophagen differenzieren [82]. Die Daten dieser Arbeit zeigten, dass überwiegend M₁-ähnliche Makrophagen im Interstitium vorhanden waren im Vergleich zu M₂-ähnlichen Makrophagen. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Studien, die ebenfalls nachwiesen, dass Adenin-, Kalziumoxalat- und Harnsäurekristalle einen proinflammatorischen M₁-ähnlichen Makrophagenphänotyp begünstigen und somit zur chronischen Entzündung bei Kristall-induzierten Nephropathien beitragen [39, 91, 141]. Man weiß außerdem, dass Kalziumoxalatkristalle zur Induktion und Aggregation der Oberflächenrezeptoren CD44 und der TNF-Rezeptoren Tnfr₁ und Tnfr₂ führt. Diese Rezeptoren sind für Zellaktivierung und Phagozytose der Kalziumoxalatkristalle notwendig, was letztlich zum nekrotischen Zelltod der Tubulusepithelzellen führt [63, 64]. Auch im Mausmodell der 2,8-DHA-Kristall-induzierten Nephropathie konnte gezeigt werden, dass die oben genannten Rezeptoren induziert werden, aber nur die Deletion von Tnfr₁ Auswirkungen auf die Manifestation der Kristall-induzierten Nephropathie hat [91].

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die hier entwickelte alternierende Adenin-angereicherte Diät die Bildung und Ablagerung von Adeninkristallen begünstigt und zu einer chronischen Kristall-induzierten Nephropathie beiträgt, welche mit Tubulusschädigung, Entzündung, Differenzierung von Makrophagen und interstitieller Fibrose einhergeht. Meine Ergebnisse stehen daher im Einklang mit bereits veröffentlichten Arbeiten [91] und spiegeln insbesondere den langsamen Entstehungsprozess der für die APRT-Defizienz charakteristischen Nephropathie wider (siehe 1.2.3).

5.1.3 Leukozyten-spezifische Defizienz von p53 verschlechtert die Folgen der Adeninkristall-induzierten Nephropathie

Nachdem das Mausmodell der Adeninkristall-induzierten Nephropathie charakterisiert wurde, sollte im dritten Ziel dieser Arbeit die Rolle von p53 in myeloischen Zellen bei der Adeninkristall-induzierten Nephropathie genauer untersucht werden. Es ist bekannt, dass MDM2 als zentraler negativer Regulator von p53 eine wichtige Funktion bei der Zellhomöostase [109] und während einer akuten Nierenschädigung spielt. Zum einen fördert MDM2 das Absterben von Podozyten [105] und zum anderen steuert es durch proteasomalen p53 Abbau dessen mögliche Funktion bei Entzündungsprozessen in geschädigten Glomeruli [106]. Beim AKI verschlimmert der MDM2-vermittelte p53-Abbau die anfängliche Schädigungsphase, fördert allerdings während des Heilungsprozesses die Geweberegeneration [107, 113]. Außerdem ist bekannt, dass infolge einer genetischen Ausschaltung oder Inhibierung von p53 durch Pifithrin- α die Reparatur eines geschädigten Nierengewebes nach AKI beeinflusst werden kann (siehe 1.4.3). Insbesondere der enge Zusammenhang zwischen Makrophagen-vermittelten Entzündungsprozessen, insbesondere in der Niere, und einer Aktivierung von p53 wurden bisher intensiv analysiert (siehe 1.4.3).

Bei chronischen Nierenerkrankungen sowie bei Kristall-induzierten Nephropathien wie beispielsweise der 2,8-DHA-Defizienz wurde die Rolle von p53 allerdings erst wenig untersucht. Um dies genauer zu adressieren, wurden in dieser Arbeit Leukozyten-spezifische p53 Knockout Mäuse (p53 k/o) bei der Adenin-Diät verwendet. Die Daten zeigten, dass Tiere mit Leukozyten-spezifischer p53-Defizienz im Vergleich zu Wildtyptieren besonders während der frühen akuten aber auch in der chronischen Phase der Adenin-Diät eine signifikant reduzierte Nierenfunktion aufwiesen. Gründe für die noch weiter beeinträchtigte Nierenfunktion bei den p53 k/o Mäusen waren stark ausgeprägte Atrophie, Dilatation und Nekrosen in den distalen Tubuli sowie Inflammation und interstitielle Fibrose. Bei Tieren mit p53 k/o war im Vergleich zum Wildtyp außerdem eine signifikant erhöhte mRNA Expression von *Il-6* sowie die vermehrte Anzahl von infiltrierenden Leukozyten (Neutrophile, Monozyten und Makrophagen) im Nierengewebe nach Adenin-Diät zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass p53 einen Einfluss auf die Funktionen von Tubulusepithelzellen und das Migrationsverhalten von Immunzellen hat und auf die durch Adeninkristalle geschädigten Nieren möglicherweise renoprotektiv wirkt. Zudem scheint die p53-Defizienz die

Differenzierung von Makrophagen in einen proinflammatorischen M₁-ähnlichen Phänotyp zu unterdrücken (verminderte *iNos* mRNA Expression) (allerdings in Diskrepanz zur erhöhten *Il-6* Expression), hingegen einen anti-entzündlichen M₂-ähnlichen Phänotyp (*Arg1*, *Cd206*) zu begünstigen. Möglicherweise wird dies durch einen in Makrophagen p53-vermittelten Zellzyklusarrest beim G₂/M-Übergang und/oder Apoptose kontrolliert, wofür es erste Hinweise durch unsere *in vitro* Experimente gibt (siehe 5.1.1). Andere Studien zeigten ebenso, dass eine p53-Deletion in Makrophagen die Freisetzung entzündlicher Mediatoren begünstigen und somit die chronische Entzündung und eine Adenom-Bildung verstärken kann. Eine leichte p53-Aktivierung dagegen mildert die Entzündung durch Unterdrückung einer alternativen M₂-Makrophagen-Polarisierung ab, so dass diese Mäuse gegenüber der Entstehung und Invasion von Darmtumoren resistent sind (s.u.) [120].

Schließlich konnte in dieser Arbeit infolge der Adeninfütterung im Vergleich zur Normaldiät bei beiden Mausgruppen eine signifikante morphologische Nierenschädigung und ein ähnlich ausgeprägter fibrotischer Umbau des Nierengewebes nach Anfärbung mit Picro-Sirius Red nachgewiesen werden. Bei p53 *k/o* Mäusen war die Induktion der *Fibronectin-1* mRNA allerdings deutlich schwächer als bei Wildtyp. Diese ersten Ergebnisse ähneln Befunden aus unserer Arbeitsgruppe, beispielsweise dass infolge einer AKI der MDM₂-vermittelte p53-Abbau das apoptotische Absterben von Podozyten fördert und bei tubulären Verletzungen in einem Mausmodell für postischämisches AKI die anfängliche Schädigungsphase verschlimmert, während im Heilungsprozess die Geweberegeneration gefördert wird [105, 107]. Es existieren ähnliche, aber auch widersprüchliche Ergebnisse, beispielsweise dass durch zeitlich bzw. örtlich gesteuerte p53 Ausschaltung die Entstehung einer Nierenfibrose abgemildert werden kann [112, 113], während es durch andere Methoden der p53 Ausschaltung zu einer erhöhten Nierenfibrose kommt [114, 115]. Dies verdeutlicht, dass die Folgen einer p53 Ausschaltung bzw. Aktivierung bei Prozessen der transkriptionellen Umprogrammierung unterschiedlich sein können und durch komplexe Reaktionen im jeweiligen Gewebekontext der entzündungsbedingten Erkrankungen unterschiedlich gesteuert werden [120, 121]. Weitere detaillierte Studien sind daher notwendig, um die Rolle von p53 speziell im Kontext der 2,8-DHA-induzierten chronischen Nephropathie langfristig zu entschlüsseln.

Zusammenfassend hat diese Dissertation dazu beigetragen, ein besseres Verständnis der Auswirkungen von Adeninkristallen *in vivo* durch Etablierung eines experimentellen Mausmodells für 2,8-DHA-induzierte CKD und *in vitro* auf Makrophagen zu entwickeln. Die Ergebnisse -auch hinsichtlich der potentiellen Rolle von p53- stellen somit wichtige, neue experimentelle Grundlagen für die weitere Erforschung der menschlichen APRT-Defizienz und Entwicklung zukünftiger Therapieansätze dar.

5.2 Limitationen der Studie

Die *in vitro* Experimente mit Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen in Zellkultur sind wichtig und aufschlussreich, um gezielte Fragen zur Immunantwort, Phänotyp-Differenzierung und generellen Zellreaktionen wie beispielsweise Nekrose nach Exposition mit Adenin - und zukünftig auch mit 2,8-DHA-Kristallen - zu adressieren. Sie können allerdings aufgrund der in lebenden Organismen wesentlich komplexeren, weil verknüpften Prozesse, insbesondere in Säugetieren, nur winzige Teilaspekte entschlüsseln, die rein auf zellulärer Ebene der Makrophagen ablaufen. Somit können *in vitro* Versuche mit Adenin- und später mit 2,8-Dihydroxyadenin-Kristallen nur Teilinformationen der Immunantwort auf Ebene der Makrophagenreaktion und -polarisierung liefern, die anschließend in Tiermodellen und vor allem in Patientenstudien verifiziert werden müssen.

Die zweite Limitation ist das hier entwickelte Mausmodell. Es stellt zwar eine essentielle Grundlage für die Erforschung der Pathomechanismen der menschlichen APRT-Defizienz und die Entwicklung von potentiellen Therapieansätzen dar, jedoch ist die Aussagekraft der erzielten Resultate auf das hier gewählte Mausmodell beschränkt und bedarf der anschließenden Korrelation, Analyse und Überprüfung in erkrankten Patienten. Konkret bedeutet dies, dass wir mit der Entwicklung unseres robusten Mausmodells der chronischen 2,8-DHA-Nephropathie lediglich einen ersten Schritt in diese Richtung erzielt haben, indem wir eine Adenin-Diät identifizieren konnten, die tatsächlich erste Belege für die Entwicklung einer sich langsam entwickelnden, d.h. chronischen Kristallonephropathie lieferte, die ähnliche nierenspezifische Krankheitsbilder vergleichbar mit der APRT-Defizienz verursachte und somit die Relevanz des Tiermodells für die menschliche Erkrankung in Aussicht stellt. Im nächsten Schritt bedarf es der Identifizierung von Rezeptoren sowie von Signal -und Immunmodulatoren, die für die entsprechende Internalisierung bzw. Reaktion auf die entstehenden Kristallablagerungen verantwortlich sind und durch Medikamente

möglicherweise gezielt moduliert und reguliert werden können. Erste Hinweise auf die tatsächliche Vergleichbarkeit von Maus- und Rattenmodell und menschlicher APRT-Defizienz erbrachte bereits eine ähnliche Studie, in der vergleichend gezeigt wurde, dass die durch Adenin-Fütterung gebildeten 2,8-DHA-Kristalle unabhängig von Tierspezies (Maus, Ratte), Alter und - zumindest in Bezug auf Nierenfunktion - auch vom Geschlecht eine fortschreitende Nierenerkrankung auslösen. In dieser Studie konnte im Mausmodell auch bereits gezeigt werden, dass Mäuse mit Deletion des Rezeptormoleküls *Tnfr1*, nicht jedoch von *Tnfr2* und *Cd44*, vor der 2,8-DHA-Nephropathie geschützt waren [91].

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde ein innovatives Mausmodell entwickelt, das durch eine mit Adenin angereicherte Ernährung bei jungen, sechs Wochen alten Mäusen eine chronische Nephropathie innerhalb von 49 Tagen induzierte, die durch massive renale Kristallablagerungen, tubuläre Verletzungen, Entzündungen und Fibrose gekennzeichnet war. Es konnten insbesondere proentzündliche M₁-ähnliche Makrophagen im geschädigten Nierengewebe detektiert werden, während M₂-ähnliche Makrophagen zwar nachweisbar waren, allerdings deutlich weniger ausgeprägt. Ähnlich wie bei der chronischen Entstehung von Harnsäure-induzierten Kristallgranulomen, die zum Fortschreiten einer chronischen Erkrankung entscheidend beitragen und in den Nieren ebenso eine M₁-ähnliche Makrophagen-bezogene interstitielle Entzündung und Fibrose auslösen [39], konnte auch infolge der hier beschriebenen Adenin-Diät in PAS-gefärbten Schnitten und unter dem Polarisationsmikroskop mittelgroße Kristallablagerungen im Kortex als auch in der Medulla nachgewiesen werden. Die Kristalle, die meist im Tubulussystem, aber auch im Interstitium auftreten, gelangen in Letzteres durch den Prozess der Extratubulation. Hier werden sie vermutlich durch eine granulomatöse Entzündung abgebaut, wie auch in einem ähnlichen Tiermodell bestätigt und vertiefend beschrieben [91]. Der Nachweis für die Ausscheidung von 2,8-DHA-Kristallen im Urin der Tiere in Folge unserer Adenin-Diät fehlt noch, und muss zukünftig noch erbracht werden. Auch die Frage, wann die für die 2,8-DHA-Nephropathie charakteristischen Krankheitsmerkmale und Symptome im Mausmodell auftreten, sollte in zukünftigen Studien durch zusätzliche Analysen im Verlauf der Diät wie bei Klinkhammer et al. [91] adressiert werden.

Wurde die hier entwickelte, 49-tägige Adenin-Diät bei Tieren mit Leukozyten-spezifischer p53-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt, zeigte sich früh im Diätverlauf eine signifikant reduzierte Nierenfunktion, erhöhte IL-6 Expression und verstärkte Leukozyten-Infiltration, während die terminale morphologische Nierenschädigung und das Ausmaß der Fibrose in transgenen p53 k/o Mäusen ähnlich oder sogar vermindert war (signifikant reduzierte *Fibronectin-1* Expression im Vergleich zum Wildtyp). Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich p53 in Leukozyten insgesamt renoprotektiv auswirkt, indem es das Migrationsverhalten von Immunzellen, die Polarisierung der Makrophagen und die Funktionen der Tubulusepithelzellen direkt oder indirekt beeinflusst. Wir konnten außerdem erste Hinweise dafür gewinnen, dass Adeninkristalle -ähnlich wie andere Kristalle und Partikel- *in vitro* die Freisetzung von proinflammatorische Zytokinen aus Makrophagen induzieren, die Differenzierung sowohl in proinflammatorische M1-ähnliche als auch alternativ aktivierte M2-ähnliche Makrophagen begünstigen und die Zellintegrität der Makrophagen reduzieren und somit potentiell nekrotisch wirksam sind. Der Nachweis der Signifikanz fehlt allerdings noch, vermutlich aufgrund zu weniger Messwerte, und muss durch weitere Wiederholungs- und Optimierungsversuche, auch unter Einbeziehung der physiologisch relevanten 2,8-DHA Kristalle, zukünftig noch erbracht werden. Hinweise, dass sich Adeninkristalle auch auf die Zellzykluskontrolle der Makrophagen auswirken, konnten in ersten Experimenten erbracht werden; die Ergebnisse deuten hier auf eine potentielle Erhöhung der Kristall-aktivierten Makrophagen in der G₂/M Zellzyklusphase. Nach erfolgreicher Inhibierung von p53 durch Pifithrin- α reduzierte sich dagegen die Anzahl der Makrophagen in dieser Phase des Zellzyklus. Diese Ergebnisse müssen allerdings durch weitere Studien statistisch belegt und vertieft werden.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit durch Etablierung des Mausmodells der 2,8-DHA-Nephropathie und *in vitro* Experimente mit Adeninkristallen neue Erkenntnisse zur weiteren Charakterisierung der APRT-Defizienz erbracht werden. Unsere Ergebnisse und die der Klinkhammer-Studie [91] zeigen, dass einige zelluläre und pathologische Prozesse für alle Kristalltypen überlappen, es aber möglicherweise auch spezifische molekulare Mechanismen gibt, die u.a. von physikalischen und biochemischen Charakteristika der Kristalle abhängen. So konnte durch die Klinkhammer-Studie TNFR₁ als potentielles therapeutisches Zielmolekül bei der 2,8-DHA-Nephropathie identifiziert werden [91]. Zukünftig könnten

daher bereits existierende TNF/TNFR-Inhibitoren klinisch getestet werden, ähnlich wie der TNFR-Inhibitor R-7050, der sich bei Kalziumoxalat-Nephropathie renoprotektiv auswirkte [64]. Man könnte auch spezifische Antikörper gegen 2,8-DHA generieren, und diese nach Passiv-Immunisierung in unserem etablierten Mausmodell mit Adenin-Diät insbesondere in der frühen und mittleren Phase zu testen, wenn erste Symptome der Nephropathie auftreten. Eine weitere Möglichkeit bestände in der Entwicklung eines spezifischen synthetischen Bindungspartners von 2,8-DHA, um das Adenin-Derivat früh nach Entstehung und vor massiver Auskristallisierung abzufangen. Dieser Wirkstoff könnte ebenfalls als potentiell Therapeutikum in dem von uns entwickelten Mausmodell getestet werden, das zur Prüfung der Wirksamkeit von therapeutischen Maßnahmen hervorragend geeignet ist.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Richtlinien der KDIGO in Abhängigkeit von GFR und Albuminurie	2
Abbildung 2: Stoffwechselweg für die Verwertung von Adenin beim Menschen bei fehlender APRT-Aktivität.	8
Abbildung 3: Kritische Zellen und Signalwege, die bei fortschreitender chronischer Nierenerkrankung (CKD) aktiviert werden.	12
Abbildung 4: M1/M2-Makrophagen-Gleichgewicht in Abhängigkeit vom Fortschreiten der chronischen Nierenerkrankung (CKD).	14
Abbildung 5: Mechanismen der kristall-induzierten Nephropathie mit Granulombildung.	17
Abbildung 6: Adenin-Futterregime der Mausmodell-Etablierung.	41
Abbildung 7: Messung der glomerulären Filtrationsrate.	44
Abbildung 8: Gating-Strategie für die Zytometrieanalysen von Makrophagen in der Niere.	63
Abbildung 9: In <i>chemico</i> hergestellte Adeninkristalle.	67
Abbildung 10: Adeninkristalle aktivieren Makrophagen in Zellkultur.	69
Abbildung 11: Ein mit Adenin übersättigtes Zellkulturmedium führt zur Induktion der Expression von <i>Arg1</i> und <i>Il-6</i> in Makrophagen in Zellkultur.	70
Abbildung 12: Adeninkristalle induzieren ein zytotoxisches und pro-entzündliches Makrophagen Milieu.	72
Abbildung 13: Einfluss des Adenin-supplementierten Zellkulturmediums auf den Zellzyklus von kultivierten Makrophagen und mögliche Beteiligung des Tumorsuppressors p53.	74
Abbildung 14: Etablierung eines Mausmodells mit Kristall-induzierter chronischer Niereninsuffizienz mittels Adenin-angereicherte Futterdiät.	76
Abbildung 15: Adenin-angereicherte Futterdiät führt zu Kristall-induzierter chronischer Niereninsuffizienz in C57BL/6N Mäusen.	79
Abbildung 16: Die Adenin-Futterdiät führt zu Veränderung von Serumparametern.	81
Abbildung 17: Die Adenin-Futterdiät induziert eine Zunahme der Leukozyten, Thrombozyten und Monozyten.	82

Abbildung 18: Population von Neutrophilen im Blut verändert sich infolge einer Adenin-angereicherter Futterdiät.	83
Abbildung 19: Adenin-angereicherte Futterdiät führt zu veränderter Zusammensetzung der Erythrozyten, welche auf eine chronische Niereninsuffizienz hindeutet.	85
Abbildung 20: Adenin-angereicherte Diät führt zu einer chronischen Nierenschädigung in C57BL/6N Mäusen.	87
Abbildung 21: Adenin-angereicherte Futterdiät verursacht eine Entzündungsreaktion innerhalb der Niere.	89
Abbildung 22: Eine Adenin-angereicherte Futterdiät verursacht die renale Infiltration von Makrophagen.	90
Abbildung 23: Infiltration von Immunzellen und Makrophagen im Nierengewebe infolge Adenin-angereicherter Futterdiät.	92
Abbildung 24: Gesteigerte Fibrose in den Nieren der Mäuse mit Adeninkristall-induzierter CKD.	94
Abbildung 25: p53-defiziente Mäuse weisen eine schlechtere Nierenfunktion nach Adenin-Diät auf.	97
Abbildung 26: Adenin-angereicherte Diät führt zu einer vergleichbaren Nierenschädigung in p53- defizienten Mäusen.	99
Abbildung 27: p53-Defizienz in Leukozyten verstärkt die Entzündungsreaktion während der Adenin-Kristall-induzierten Nephropathie.	101
Abbildung 28: Eine Adenin-angereicherte Futterdiät verursacht eine verstärkte renale Infiltration von Makrophagen in p53-defizienten Mäusen.	103
Abbildung 29: p53 hat einen geringen Einfluss auf den fibrotischen Umbau bei der Adenin-Kristall-induzierten CKD.	104
 <i>Tabellenverzeichnis</i>	
Tabelle 1: Primer	38
Tabelle 2: Mastermix für die reverse Transkription von mRNA in cDNA	48
Tabelle 3: Thermocycler-Programm zum Umschreiben von mRNA in cDNA	48
Tabelle 4: qPCR Mastermix	50
Tabelle 5: Primäre und sekundäre Antikörper	55
Tabelle 6: PAS Score	55

Tabelle 7: Zusammensetzung der Antikörper zur Identifizierung
der Zellpopulationen

62

Tabelle 8: Zellkulturstimuli

66

Literaturverzeichnis

1. Levey, A.S. and J. Coresh, *Chronic kidney disease*. Lancet, 2012. **379**(9811): p. 165-80.
2. Zoccali, C., et al., *The systemic nature of CKD*. Nat Rev Nephrol, 2017. **13**(6): p. 344-358.
3. Levin, A., et al., *Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy*. Lancet, 2017. **390**(10105): p. 1888-1917.
4. Stolpe, S., et al., *High Unawareness of Chronic Kidney Disease in Germany*. Int J Environ Res Public Health, 2021. **18**(22).
5. Doria, A., et al., *Serum Urate Lowering with Allopurinol and Kidney Function in Type 1 Diabetes*. N Engl J Med, 2020. **382**(26): p. 2493-2503.
6. Couser, W.G., et al., *The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases*. Kidney Int, 2011. **80**(12): p. 1258-70.
7. Webster, A.C., et al., *Chronic Kidney Disease*. Lancet, 2017. **389**(10075): p. 1238-1252.
8. Judd, E. and D.A. Calhoun, *Management of hypertension in CKD: beyond the guidelines*. Adv Chronic Kidney Dis, 2015. **22**(2): p. 116-22.
9. Kearney, P.M., et al., *Global burden of hypertension: analysis of worldwide data*. Lancet, 2005. **365**(9455): p. 217-23.
10. Tozawa, M., et al., *Blood pressure predicts risk of developing end-stage renal disease in men and women*. Hypertension, 2003. **41**(6): p. 1341-5.
11. Lash, J.P., et al., *Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study: baseline characteristics and associations with kidney function*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(8): p. 1302-11.
12. Kuma, A. and A. Kato, *Lifestyle-Related Risk Factors for the Incidence and Progression of Chronic Kidney Disease in the Healthy Young and Middle-Aged Population*. Nutrients, 2022. **14**(18).
13. Maric-Bilkan, C., *Obesity and diabetic kidney disease*. Med Clin North Am, 2013. **97**(1): p. 59-74.
14. Camara, N.O., et al., *Kidney disease and obesity: epidemiology, mechanisms and treatment*. Nat Rev Nephrol, 2017. **13**(3): p. 181-190.
15. Chawla, L.S., et al., *Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes*. N Engl J Med, 2014. **371**(1): p. 58-66.
16. Venkatachalam, M.A., et al., *Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(8): p. 1765-76.
17. He, L., et al., *AKI on CKD: heightened injury, suppressed repair, and the underlying mechanisms*. Kidney Int, 2017. **92**(5): p. 1071-1083.
18. Coca, S.G., S. Singanamala, and C.R. Parikh, *Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis*. Kidney Int, 2012. **81**(5): p. 442-8.
19. Legouis, D., et al., *Rapid Occurrence of Chronic Kidney Disease in Patients Experiencing Reversible Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery*. Anesthesiology, 2017. **126**(1): p. 39-46.
20. James, M.T., et al., *A Meta-analysis of the Association of Estimated GFR, Albuminuria, Diabetes Mellitus, and Hypertension With Acute Kidney Injury*. Am J Kidney Dis, 2015. **66**(4): p. 602-12.
21. Chung, C.U., et al., *Acute kidney injury after open ventral hernia repair: an analysis of the 2005-2012 ACS-NSQIP datasets*. Hernia, 2016. **20**(1): p. 131-8.
22. Mulay, S.R. and H.J. Anders, *Crystallopathies*. N Engl J Med, 2016. **374**(25): p. 2465-76.

23. Mulay, S.R. and H.J. Anders, *Crystal nephropathies: mechanisms of crystal-induced kidney injury*. Nat Rev Nephrol, 2017. **13**(4): p. 226-240.
24. Mulay, S.R., et al., *Novel Insights into Crystal-Induced Kidney Injury*. Kidney Dis (Basel), 2018. **4**(2): p. 49-57.
25. Scolari, F. and P. Ravani, *Atheroembolic renal disease*. Lancet, 2010. **375**(9726): p. 1650-60.
26. Kanzaki, G., et al., *Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease and Related Diseases*. J Nippon Med Sch, 2019. **86**(1): p. 2-9.
27. Franklin, B.S., M.S. Mangan, and E. Latz, *Crystal Formation in Inflammation*. Annu Rev Immunol, 2016. **34**: p. 173-202.
28. Hara, M., et al., *Atazanavir nephrotoxicity*. Clin Kidney J, 2015. **8**(2): p. 137-42.
29. Aggarwal, K.P., et al., *Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 292953.
30. Micanovic, R., et al., *Uromodulin (Tamm-Horsfall protein): guardian of urinary and systemic homeostasis*. Nephrol Dial Transplant, 2020. **35**(1): p. 33-43.
31. Selvam, R. and P. Kalaiselvi, *Studies on calcium oxalate binding proteins: effect of lipid peroxidation*. Nephron, 2001. **88**(2): p. 163-7.
32. Govindaraj, A. and R. Selvam, *Increased calcium oxalate crystal nucleation and aggregation by peroxidized protein of human kidney stone matrix and renal cells*. Urol Res, 2001. **29**(3): p. 194-8.
33. Shavit, L., P. Jaeger, and R.J. Unwin, *What is nephrocalcinosis?* Kidney Int, 2015. **88**(1): p. 35-43.
34. Dickson, F.J. and J.A. Sayer, *Nephrocalcinosis: A Review of Monogenic Causes and Insights They Provide into This Heterogeneous Condition*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(1).
35. Reginato, A.M., et al., *The genetics of hyperuricaemia and gout*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(10): p. 610-21.
36. Sato, Y., et al., *The case for uric acid-lowering treatment in patients with hyperuricaemia and CKD*. Nat Rev Nephrol, 2019. **15**(12): p. 767-775.
37. Steiger, S., Q. Ma, and H.J. Anders, *The case for evidence-based medicine for the association between hyperuricaemia and CKD*. Nat Rev Nephrol, 2020. **16**(7): p. 422.
38. Moe, O.W., *Posing the question again: does chronic uric acid nephropathy exist?* J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(3): p. 395-7.
39. Sellmayr, M., et al., *Only Hyperuricemia with Crystalluria, but not Asymptomatic Hyperuricemia, Drives Progression of Chronic Kidney Disease*. J Am Soc Nephrol, 2020. **31**(12): p. 2773-2792.
40. Anders, H.J., Q. Li, and S. Steiger, *Asymptomatic hyperuricaemia in chronic kidney disease: mechanisms and clinical implications*. Clin Kidney J, 2023. **16**(6): p. 928-938.
41. Bjornstad, P., et al., *Role of bicarbonate supplementation on urine uric acid crystals and diabetic tubulopathy in adults with type 1 diabetes*. Diabetes Obes Metab, 2018. **20**(7): p. 1776-1780.
42. Heinrich, P.C., Müller, M., Graeve, L., Koch, H.-G., *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, 2022.
43. Deng, L., et al., *2,8-Dihydroxyadenine urolithiasis in a patient with considerable residual adenine phosphoribosyltransferase activity in cell extracts but with mutations in both copies of APRT*. Mol Genet Metab, 2001. **72**(3): p. 260-4.
44. Hesse, A., et al., *2,8-Dihydroxyadeninuria: laboratory diagnosis and therapy control*. Urol Int, 1988. **43**(3): p. 174-8.

45. Simmonds, H.A., et al., *The identification of 2,8-dihydroxyadenine, a new component of urinary stones*. *Biochem J*, 1976. **157**(2): p. 485-7.
46. Runolfsson, H.L., et al., *Kidney Disease in Adenine Phosphoribosyltransferase Deficiency*. *Am J Kidney Dis*, 2016. **67**(3): p. 431-8.
47. Bollee, G., et al., *Adenine phosphoribosyltransferase deficiency*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2012. **7**(9): p. 1521-7.
48. Broderick, T.P., et al., *Comparative anatomy of the human APRT gene and enzyme: nucleotide sequence divergence and conservation of a nonrandom CpG dinucleotide arrangement*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(10): p. 3349-53.
49. Bollée, G., et al., *Phenotype and genotype characterization of adenine phosphoribosyltransferase deficiency*. *J Am Soc Nephrol*, 2010. **21**(4): p. 679-88.
50. Doppler, W., et al., *Characterization of the biochemical basis of a complete deficiency of the adenine phosphoribosyl transferase (APRT)*. *Hum Genet*, 1981. **57**(4): p. 404-10.
51. Edvardsson, V., et al., *Clinical features and genotype of adenine phosphoribosyltransferase deficiency in iceland*. *Am J Kidney Dis*, 2001. **38**(3): p. 473-80.
52. Kamatani, N., et al., *Genetic and clinical studies on 19 families with adenine phosphoribosyltransferase deficiencies*. *Hum Genet*, 1987. **75**(2): p. 163-8.
53. Runolfsson, H.L., et al., *Urinary 2,8-dihydroxyadenine excretion in patients with adenine phosphoribosyltransferase deficiency, carriers and healthy control subjects*. *Mol Genet Metab*, 2019. **128**(1-2): p. 144-150.
54. Benedetto, B., et al., *Adenine phosphoribosyltransferase deficiency and renal allograft dysfunction*. *Am J Kidney Dis*, 2001. **37**(5): p. E37.
55. Glicklich, D., et al., *2,8-dihydroxyadenine urolithiasis: report of a case first diagnosed after renal transplant*. *Q J Med*, 1988. **68**(258): p. 785-93.
56. Bouzidi, H., B. Lacour, and M. Daudon, *[2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis: from diagnosis to therapy]*. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2007. **65**(6): p. 585-92.
57. Oliveira, B., et al., *Genetic, pathophysiological, and clinical aspects of nephrocalcinosis*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016. **311**(6): p. F1243-F1252.
58. Noda, S., *On mechanism of urate kidney stone formation*. *Scan Electron Microsc*, 1984(Pt 4): p. 1801-8.
59. Mandel, N., *Crystal-membrane interaction in kidney stone disease*. *J Am Soc Nephrol*, 1994. **5**(5 Suppl 1): p. S37-45.
60. Ayoub, I., et al., *Revisiting medullary tophi: a link between uric acid and progressive chronic kidney disease?* *Clin Nephrol*, 2016. **85**(2): p. 109-13.
61. Vervaet, B.A., et al., *An active renal crystal clearance mechanism in rat and man*. *Kidney Int*, 2009. **75**(1): p. 41-51.
62. Lieske, J.C., S. Deganello, and F.G. Toback, *Cell-crystal interactions and kidney stone formation*. *Nephron*, 1999. **81 Suppl 1**: p. 8-17.
63. Asselman, M., et al., *Calcium oxalate crystal adherence to hyaluronan-, osteopontin-, and CD44-expressing injured/regenerating tubular epithelial cells in rat kidneys*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(12): p. 3155-66.
64. Mulay, S.R., et al., *Hyperoxaluria Requires TNF Receptors to Initiate Crystal Adhesion and Kidney Stone Disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2017. **28**(3): p. 761-768.
65. Tan, M. and W. Epstein, *Polymer formation during the degradation of human light chain and Bence-Jones proteins by an extract of the lysosomal fraction of normal human kidney*. *Immunochemistry*, 1972. **9**(1): p. 9-16.

66. Liu, Z., et al., *Calcium phosphate nanoparticles primarily induce cell necrosis through lysosomal rupture: the origination of material cytotoxicity*. *J Mater Chem B*, 2014. **2**(22): p. 3480-3489.
67. Huang, D., H. Zhou, and J. Gao, *Nanoparticles modulate autophagic effect in a dispersity-dependent manner*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 14361.
68. Linkermann, A., et al., *Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(11): p. 759-67.
69. Newton, K. and G. Manning, *Necroptosis and Inflammation*. *Annu Rev Biochem*, 2016. **85**: p. 743-63.
70. Rock, K.L., et al., *The sterile inflammatory response*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 321-42.
71. Allam, R., et al., *Extracellular histones in tissue injury and inflammation*. *J Mol Med (Berl)*, 2014. **92**(5): p. 465-72.
72. Palazon-Riquelme, P. and G. Lopez-Castejon, *The inflammasomes, immune guardians at defence barriers*. *Immunology*, 2018. **155**(3): p. 320-330.
73. Ramos-Junior, E.S. and A.C. Morandini, *Gasdermin: A new player to the inflammasome game*. *Biomed J*, 2017. **40**(6): p. 313-316.
74. Humphreys, B.D., *Mechanisms of Renal Fibrosis*. *Annu Rev Physiol*, 2018. **80**: p. 309-326.
75. Nath, K.A., *Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage*. *Am J Kidney Dis*, 1992. **20**(1): p. 1-17.
76. Maarouf, O.H., Y. Ikeda, and B.D. Humphreys, *Wnt signaling in kidney tubulointerstitium during disease*. *Histol Histopathol*, 2015. **30**(2): p. 163-71.
77. Genovese, F., et al., *The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis?* *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2014. **7**(1): p. 4.
78. Fine, L.G., C. Orphanides, and J.T. Norman, *Progressive renal disease: the chronic hypoxia hypothesis*. *Kidney Int Suppl*, 1998. **65**: p. S74-8.
79. Sturmlechner, I., et al., *Cellular senescence in renal ageing and disease*. *Nat Rev Nephrol*, 2017. **13**(2): p. 77-89.
80. Ricardo, S.D., H. van Goor, and A.A. Eddy, *Macrophage diversity in renal injury and repair*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(11): p. 3522-30.
81. Cao, Q., D.C. Harris, and Y. Wang, *Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis*. *Physiology (Bethesda)*, 2015. **30**(3): p. 183-94.
82. Steiger, S., J. Lichtnekert, and H.-J. Anders, *Chapter 5 - Kidney—Inflammation and remodeling*, in *Macrophages in the Human Body*, N.O. Saraiva Camara and T.T. Braga, Editors. 2022, Academic Press. p. 107-137.
83. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. *Science*, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
84. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(12): p. 958-69.
85. Guiteras, R., M. Flaquer, and J.M. Cruzado, *Macrophage in chronic kidney disease*. *Clin Kidney J*, 2016. **9**(6): p. 765-771.
86. Wang, Y. and D.C. Harris, *Macrophages in renal disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(1): p. 21-7.
87. Meng, X.M., D.J. Nikolic-Paterson, and H.Y. Lan, *Inflammatory processes in renal fibrosis*. *Nat Rev Nephrol*, 2014. **10**(9): p. 493-503.
88. Kinsey, G.R., *Macrophage dynamics in AKI to CKD progression*. *J Am Soc Nephrol*, 2014. **25**(2): p. 209-11.

89. Anders, H.J. and M. Ryu, *Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis*. *Kidney Int*, 2011. **80**(9): p. 915-925.
90. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(3): p. 787-95.
91. Klinkhammer, B.M., et al., *Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Injury in 2,8-Dihydroxyadenine Nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 2020. **31**(4): p. 799-816.
92. Taguchi, K., et al., *Colony-stimulating factor-1 signaling suppresses renal crystal formation*. *J Am Soc Nephrol*, 2014. **25**(8): p. 1680-97.
93. Helming, L. and S. Gordon, *Molecular mediators of macrophage fusion*. *Trends Cell Biol*, 2009. **19**(10): p. 514-22.
94. Marakalala, M.J., et al., *Inflammatory signaling in human tuberculosis granulomas is spatially organized*. *Nat Med*, 2016. **22**(5): p. 531-8.
95. Levine, A.J. and M. Oren, *The first 30 years of p53: growing ever more complex*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(10): p. 749-58.
96. Kruiswijk, F., C.F. Labuschagne, and K.H. Vousden, *p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015. **16**(7): p. 393-405.
97. Tang, Q., et al., *Mutant p53 on the Path to Metastasis*. *Trends Cancer*, 2020. **6**(1): p. 62-73.
98. Bensaad, K. and K.H. Vousden, *Savior and slayer: the two faces of p53*. *Nat Med*, 2005. **11**(12): p. 1278-9.
99. Giono, L.E. and J.J. Manfredi, *The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints*. *J Cell Physiol*, 2006. **209**(1): p. 13-20.
100. Zilfou, J.T. and S.W. Lowe, *Tumor suppressive functions of p53*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. **1**(5): p. a001883.
101. Reuter, S., et al., *Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?* *Free Radic Biol Med*, 2010. **49**(11): p. 1603-16.
102. Harper, J.W., et al., *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 805-16.
103. Jin, S., et al., *GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity*. *Oncogene*, 2002. **21**(57): p. 8696-704.
104. Thomasova, D. and H.J. Anders, *Cell cycle control in the kidney*. *Nephrol Dial Transplant*, 2015. **30**(10): p. 1622-30.
105. Mulay, S.R., et al., *Podocyte loss involves MDM2-driven mitotic catastrophe*. *J Pathol*, 2013. **230**(3): p. 322-35.
106. Mulay, S.R., et al., *Murine Double Minute-2 Inhibition Ameliorates Established Crescentic Glomerulonephritis*. *Am J Pathol*, 2016. **186**(6): p. 1442-53.
107. Mulay, S.R., et al., *MDM2 (murine double minute-2) links inflammation and tubular cell healing during acute kidney injury in mice*. *Kidney Int*, 2012. **81**(12): p. 1199-211.
108. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(8): p. 594-604.
109. Thomasova, D., et al., *MDM2 prevents spontaneous tubular epithelial cell death and acute kidney injury*. *Cell Death Dis*, 2016. **7**(11): p. e2482.
110. McNicholas, B.A. and M.D. Griffin, *Double-edged sword: a p53 regulator mediates both harmful and beneficial effects in experimental acute kidney injury*. *Kidney Int*, 2012. **81**(12): p. 1161-4.

111. Basile, D.P., et al., *Progression after AKI: Understanding Maladaptive Repair Processes to Predict and Identify Therapeutic Treatments*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(3): p. 687-97.
112. Higgins, S.P., et al., *TGF-beta1/p53 signaling in renal fibrogenesis*. Cell Signal, 2018. **43**: p. 1-10.
113. Ying, Y., et al., *Targeted deletion of p53 in the proximal tubule prevents ischemic renal injury*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(12): p. 2707-16.
114. Dagher, P.C., et al., *The p53 inhibitor pifithrin-alpha can stimulate fibrosis in a rat model of ischemic acute kidney injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **302**(2): p. F284-91.
115. Sutton, T.A., et al., *p53 is renoprotective after ischemic kidney injury by reducing inflammation*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(1): p. 113-24.
116. Tang, C., et al., *P53 in kidney injury and repair: Mechanism and therapeutic potentials*. Pharmacol Ther, 2019. **195**: p. 5-12.
117. Li, L., et al., *A unique role for p53 in the regulation of M2 macrophage polarization*. Cell Death Differ, 2015. **22**(7): p. 1081-93.
118. Komarova, E.A., et al., *p53 is a suppressor of inflammatory response in mice*. FASEB J, 2005. **19**(8): p. 1030-2.
119. Overstreet, J.M., et al., *Emerging role of tumor suppressor p53 in acute and chronic kidney diseases*. Cell Mol Life Sci, 2022. **79**(9): p. 474.
120. He, X.Y., et al., *p53 in the Myeloid Lineage Modulates an Inflammatory Microenvironment Limiting Initiation and Invasion of Intestinal Tumors*. Cell Rep, 2015. **13**(5): p. 888-97.
121. Lowe, J.M., et al., *p53 and NF-kappaB coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages*. Cancer Res, 2014. **74**(8): p. 2182-92.
122. Percie du Sert, N., et al., *The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research*. PLoS Biol, 2020. **18**(7): p. e3000410.
123. Schreiber, A., et al., *Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **303**(5): p. F783-8.
124. Marschner, J.A., *Die Rolle von Pentraxin 3 bei entzündlichen Nierenerkrankungen*, in *Medical Faculty of Ludwig-Maximilians-University Munich*. 2019, Ludwig-Maximilians-University Munich: Munich, Germany.
125. Steiger, S., et al., *Anti-Transforming Growth Factor beta IgG Elicits a Dual Effect on Calcium Oxalate Crystallization and Progressive Nephrocalcinosis-Related Chronic Kidney Disease*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 619.
126. Steiger, S., *Cell Cycle Basics*. 2017.
127. Agarwal, S., et al., *Differential expression of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes*. J Dent Res, 1995. **74**(4): p. 1057-65.
128. Joyce, E., et al., *Tubulointerstitial nephritis: diagnosis, treatment, and monitoring*. Pediatr Nephrol, 2017. **32**(4): p. 577-587.
129. Moschen, A.R., et al., *Lipocalin-2: A Master Mediator of Intestinal and Metabolic Inflammation*. Trends Endocrinol Metab, 2017. **28**(5): p. 388-397.
130. !!! INVALID CITATION !!! [106].
131. Martinon, F., et al., *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 237-41.
132. Mulay, S.R., et al., *Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1beta secretion*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 236-46.

133. Honarpisheh, M., et al., *Phagocytosis of environmental or metabolic crystalline particles induces cytotoxicity by triggering necroptosis across a broad range of particle size and shape*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 15523.
134. Desai, J., et al., *Particles of different sizes and shapes induce neutrophil necroptosis followed by the release of neutrophil extracellular trap-like chromatin*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 15003.
135. Martinez-Reyes, C.P., et al., *Uric Acid Has Direct Proinflammatory Effects on Human Macrophages by Increasing Proinflammatory Mediators and Bacterial Phagocytosis Probably via URAT1*. Biomolecules, 2020. **10**(4).
136. Ma, Q., et al., *Soluble uric acid inhibits beta2 integrin-mediated neutrophil recruitment in innate immunity*. Blood, 2022. **139**(23): p. 3402-3417.
137. Gnemmi, V., et al., *Asymptomatic Hyperuricemia Promotes Recovery from Ischemic Organ Injury by Modulating the Phenotype of Macrophages*. Cells, 2022. **11**(4).
138. Ma, Q., et al., *Soluble Uric Acid Is an Intrinsic Negative Regulator of Monocyte Activation in Monosodium Urate Crystal-Induced Tissue Inflammation*. J Immunol, 2020. **205**(3): p. 789-800.
139. Hafner, A., et al., *The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(4): p. 199-210.
140. Mulay, S.R., et al., *A guide to crystal-related and nano- or microparticle-related tissue responses*. FEBS J, 2020. **287**(5): p. 818-832.
141. Anders, H.J., et al., *The macrophage phenotype and inflammasome component NLRP3 contributes to nephrocalcinosis-related chronic kidney disease independent from IL-1-mediated tissue injury*. Kidney Int, 2018. **93**(3): p. 656-669.

Danksagung

Ich möchte meine Dankbarkeit gegenüber all jenen ausdrücken, die mich auf meinem Weg zur Promotion unterstützt und begleitet haben. Besonderer Dank gilt:

Frau PD Dr. Stefanie Steiger, deren fachkundige Führung und wertschätzende Betreuung wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Ihre klare Vermittlung komplexer Konzepte hat mein wissenschaftliches Verständnis und meine Forschungsfähigkeiten entscheidend gefördert. Ihr Engagement und ihre Hingabe, gepaart mit ständiger Unterstützung und Aufmerksamkeit für alle Belange – sowohl fachlicher als auch persönlicher Natur – während der gesamten Projektphase, waren von unschätzbarem Wert und eine Quelle der Inspiration.

Frau Qiuyue Ma, Frau Shi Chongxu und Herrn Markus Sellmayr, sowie dem gesamten Team des Kidney Immunology Laboratory, für ihre geduldige Unterweisung in neuen Methodiken und Geräten, die kollegiale Unterstützung, unvergessliche Momente und die gemeinsam geteilten Erfahrungen innerhalb und außerhalb des Labors.

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

Meiner Mutter und meinem Vater, deren Geduld, großartige Unterstützung und stetiger Rückhalt mir nicht nur während meiner Promotion, sondern durch mein ganzes Leben hindurch eine Quelle der Kraft, des Vertrauens und der Inspiration waren.