

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

**Die Rolle des Transforming Growth Factor β (TGF β) bei der
chronischen Oxalatnephropathie**

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

vorgelegt von
Julia Felicitas Rodler

aus
München

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Stefanie Steiger
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Alexander Dietrich
Prof. Dr. Clemens Cohen

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Maciej Lech

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2025

Eidesstattliche Versicherung

Von Julia Felicitas Rodler

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

Die Rolle des Transforming Growth Factor β (TGF β) bei der chronischen Oxalatnephropathie

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:

- Priv.-Doz. Dr. Stefanie Steiger, Nephrologisches Institut, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, LMU Klinikum München. Sämtliche Versuche dieser Arbeit fanden unter der Leitung und Aufsicht von PD Dr. Steiger statt.
- Prof. Dr. Tobias Bäuerle und Jutta Jordan, Preclinical Imaging Platform Erlangen, Institut für Radiologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Die Kooperationspartner aus Erlangen fertigten die MRT-Bilder der Versuchstiere post mortem an.
- Claudia Böhlend, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, LMU Klinikum München. Sie führte mich in grundlegende Techniken und Arbeitsschritte biochemischer Versuche ein und half bei der Durchführung der Durchflussszytometrie.
- Janina Mandelbaum und Dan Draganovici, Abteilung für Nephrologie/Klinische Biochemie, LMU Klinikum München. Sie fertigten die histologischen Schnitte an und führten die Genotypisierung der Versuchstiere durch.

München, 18.01.2026

Julia Felicitas Rodler

Ort, Datum

Julia Felicitas Rodler

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2016 bis Januar 2018 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.

Aus dem Projekt hervorgegangene Veröffentlichungen:

Steiger S, Grill JE, Ma Q, Bäuerle T, Jordan J, Smolle M, Böhland C, Lech M, Anders HJ. Anti-Transforming Growth Factor beta IgG Elicits a Dual Effect on Calcium Oxalate Crystallization and Progressive Nephrocalcinosis-Related Chronic Kidney Disease. *Front Immunol.* 2018 Mar 29;9:619.

Gewidmet meinen Eltern

in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
Summary	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Das chronische Nierenversagen	8
1.1.1 Definition und Klassifikation des chronischen Nierenversagens	8
1.1.2 Morbidität und Mortalität des chronischen Nierenversagens	9
1.1.3 Therapie des chronischen Nierenversagens	11
1.2 Kristallopathien	13
1.2.1 Organmanifestationen von Kristallopathien	13
1.2.2 Pathomechanismen der Kristallisation	14
1.2.3 Kristallinduzierte Nephropathien	15
1.2.4 Klassifikation der Oxalatnephropathie	21
1.2.5 Pathomechanismen der kristall-induzierten Organschädigung	24
1.3 Die renale Fibrose	25
1.3.1 Die renale Fibrose und das CNV – Ursache oder Assoziation?	25
1.3.2 TGF β – Masterregulator der Fibrose	26
1.4 Zielsetzung der Arbeit und Hypothese	28
2 Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Tiermodell	31
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	31
2.1.3 Geräte und Software	35
2.2 Methoden	36
2.2.1 In chemico Methoden	36
2.2.2 Tierexperimentelle Versuche	37
2.2.3 RNA-Expressionsanalysen	46
2.2.4 Durchflusszytometrie	48
2.2.5 Histologische Färbungen	51
2.2.6 Magnetresonanztomographie	55
2.2.7 Statistik	55
3 Ergebnisse	56
3.1 Effekte der IgG – Antikörper auf die Kristallformation in chemico	56
3.2 Effekte der IgG – Antikörper auf die Kristallformation in vivo	59
3.2.1 Effekte der antikörperbasierten anti-TGF β Therapie auf die Kristallformation in vivo	59
3.2.2 Effekte der IgG-Antikörpertherapie auf den Serumoxalatspiegel	62
3.2.3 Effekte der IgG-Antikörpertherapie auf die Expression von Adhäsionsmolekülen	63
3.3 Effekte der anti – TGF β Therapie auf die β -Oxidation	64
3.4 Effekte der anti – TGF β Therapie auf die Entzündungsreaktion	65
3.4.1 Inhibition der TGF β – Signalwege durch den 1D11 - Antikörper	65
3.4.2 Effekte der anti – TGF β auf die Expression proinflammatorischer Zytokine	67
3.4.3 Einfluss der anti – TGF β Therapie auf die Makrophagendifferenzierung	68
3.5 Effekte der anti – TGF β Therapie auf die Fibrogenese	71
3.5.1 Inhibition der Expression profibrotischer Zytokine	71

3.5.2	Effekte der anti – TGF β Therapie auf die renale extrazelluläre Matrix.....	72
3.5.3	Effekte der anti – TGF β Therapie auf die Makrophagendifferenzierung	75
3.6	Effekte der anti – TGF β Therapie auf die Nierenfunktion.....	76
3.6.1	Effekte der anti – TGF β Therapie auf die mRNA Expression tubulärer Schädigungsmarker	77
3.6.2	Effekte der anti – TGF β Therapie auf das Ausmaß der tubulären Schädigung	78
3.6.3	Effekte der anti – TGF β Therapie auf die Nierenretentionsparameter.....	79
3.6.4	Effekte der anti – TGF β Therapie auf die glomeruläre Filtrationsrate	81
3.7	Effekte der anti – TGF β Therapie bei verzögertem Beginn.....	84
4	Diskussion.....	86
4.1	Die antikörperbasierte anti – TGF β Therapie inhibiert die renale Kristallformation.....	87
4.2	Die Fibrogenese und deren kontroverser Effekt auf die Nierenfunktion	89
4.3	Der Einfluss von TGF β auf die Makrophagendifferenzierung	94
4.4	Inhibition von TGF β verhindert den Verlust der β -Oxidation	100
4.5	Limitationen der Arbeit	101
5	Literaturverzeichnis.....	103
6	Danksagung	116
7	Lebenslauf.....	117
8	Publikationsliste	118
9	Übereinstimmungserklärung	119

Zusammenfassung

Renale Ablagerungen von Kalziumoxalatkristallen im Tubuluslumen induzieren eine Inflamationsreaktion und Fibrosierung, was letztendlich einen irreversiblen Verlust von Nephronen zur Folge hat. Die renale Kristallformation ist ein komplexer, multifaktorieller Prozess. Neben Faktoren wie der Konzentration der Ionen oder des pHs interagieren zahlreiche Proteine bei der Kristallbildung. In dieser Arbeit wählten wir das murine Modell der chronischen Oxalatnephropathie, wobei den Mäusen über ein spezielles Futter zwei Wochen Oxalat zugeführt wurde. Infolgedessen entwickelten die Versuchstiere eine schwere Nephrokalzinose mit einem progressiven chronischen Nierenversagen.

Wir postulierten, dass der anti-TGF β Antikörper 1D11 sowohl die Kristallformation beeinflusst als auch über immunmodulatorische und anti-fibrotische Effekte das renale Outcome im Mausmodell der chronischen Oxalatnephropathie verbessert. Sowohl in vivo als auch in vitro konnte durch die Gabe des anti-TGF β Antikörpers 1D11 und dessen Isotypenkontrolle 13C4 die Kristallformation signifikant reduziert werden. Darüber hinaus zeigten MRT-Aufnahmen und histologische Silber- sowie alpha-SMA-Färbungen, dass die renale Fibrogenese signifikant inhibiert werden konnte. Dieser Effekt war assoziiert mit einer Verschiebung der Makrophagenpopulation von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen (CD45+, F4/80+, CD11b+, CX3CR1+, CD206-) und pro-fibrotischen M2a-Makrophagen (CD45+, F4/80+, CD11b+, CX3CR1+, CD206+, TGF β +) hinzu einem dominierenden anti-inflammatorischen M2c-Makrophagen Phänotyp (CD45+, F4/80+, CD11b+, CX3CR1+, CD206+, TGF β -). Die Messung der glomerulären Filtrationsrate zu Beginn und am Ende der Studie zeigte, dass die präemptive Gabe des anti-TGF Antikörpers 1D11 den Abfall der GFR ($m = -8,9$ vs. $-14,5$ $\mu\text{l/min/100g KG/Tag}$, $\Delta = 38.3\%$) deutlich verlangsamte, so war die gemessene GFR in der Interventionsgruppe mit dem 1D11-AK ca. dreimal so hoch wie in der Gruppe, welche ausschließlich die oxalatreiche Diät erhalten hatte (120.4 vs. 42.6 $\mu\text{l/min/100 gKG}$, $\Delta = 64.6\%$). Bei einem verzögerten Beginn der Therapie konnte allerdings kein protektiver Effekt auf die Nierenfunktion erzielt werden. Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass die antikörperbasierte anti-TGF β Therapie sowohl die Kristallformation als auch die interstitielle Fibrose vermindert und somit das Fortschreiten des chronischen Nierenversagens verlangsamt werden kann. Entscheidend jedoch ist ein früher Beginn der Therapie.

Summary

Depositions of calcium oxalate crystals induce an inflammatory reaction and fibrosis, ultimately resulting in an irreversible loss of nephrons. Renal crystal formation is a complex, multifactorial process. In addition to factors such as ion concentration and pH, numerous proteins interact during crystal formation. In this study, we utilized the murine model of chronic oxalate nephropathy, where mice were administered oxalate for two weeks via a specialized diet. As a result, the experimental animals developed severe nephrocalcinosis with progressive chronic renal failure.

We postulated that the anti-TGF β antibody 1D11 influences both, crystal formation and renal outcome in the murine model of chronic oxalate nephropathy through its immunomodulatory and anti-fibrotic effects. We demonstrated that the anti-TGF β antibody and its isotype control IgG inhibited crystal formation in vitro and reduced renal crystal deposition by 72% in the mouse model. Additionally, MRI imaging as well as histological silver and alpha-SMA staining revealed a significant inhibition of renal fibrogenesis. This effect was associated with a shift in the macrophage population from pro-inflammatory M1 macrophages (CD45+, F4/80+, CD11b+, CX3CR1+, CD206-) and pro-fibrotic M2a macrophages (CD45+, F4/80+, CD11b+, CX3CR1+, CD206+, TGF β +) towards a dominant anti-inflammatory M2c macrophage phenotype (CD45+, F4/80+, CD11b+, CX3CR1+, CD206+, TGF β -). Measurement of glomerular filtration rate (GFR) at the beginning and end of the study revealed that preemptive administration of the anti-TGF antibody 1D11 significantly slowed the decline in GFR (mean change = -8.9 vs. -14.5 μ l/min/100g BW/day, Δ = 38.3%). The measured GFR in the intervention group with 1D11 antibody was approximately three times higher than in the group receiving only the oxalate-rich diet (120.4 vs. 42.6 μ l/min/100g BW, Δ = 64.6%). However, a delayed initiation of anti-TGF β therapy with the 1D11 antibody did not yield a protective effect on renal function. The anti-TGF β antibody 1D11 reduces both crystal formation and interstitial fibrosis, thereby slowing the progression of chronic renal failure. Importantly, an early initiation of the therapy is crucial.

Abkürzungsverzeichnis

ACox 1	Acyl-coenzyme A oxidase 1
ANOVA	Analysis of Variance
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BUN	Blut-Harnstoff-Stickstoff
cDNA	Complementary DNA
CKD	Chronic kidney disease
CKD-MBD	Chronic Kidney Disease – Mineral und Bone Disorder
Co-Smads	Common-mediator Smads
COD	Calziumoxalat-Dihydrat-Kristalle
COM klein	Calziumoxalat-Monohydrat-Kristalle
COM groß	Calziumoxalat-Monohydrat-Kristallduplets oder Triplets
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
dd H2O	doppelt destilliertes Wasser
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESRD	End-stage renal disease
FGF-23	Fibroblast Growth Factor 23
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GDF	Growth Differentiation Factor
I-Smads	Inhibitory-Smads
JNK	c-Jun-N-terminale kinase
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcome
KIM-1	Kidney-Injury-Molecule-1
LTBP	Latent TGF β binding Protein
LAP	Latency Associated Peptide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PTLD	Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung
Ppar α	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
Pgc1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
R-Smads	Receptor-activated Smads
RT	Raumtemperatur
SGLT2	Sodium-glucose linked transporter 2
SBE	Smad-binding element
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinases2
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TGFR1/2	TGF β Rezeptor 1/2
PH	Primäre Hyperoxalurie

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Klassifikation des chronischen Nierenversagens KDIGO.....	9
Abbildung 2	Formen der kristall-induzierten Nephropathien.....	15
Abbildung 3	Der Oxalatstoffwechsel im Hepatozyten.....	22
Abbildung 4	Kalziumoxalatkristallformen.....	36
Abbildung 5	Mausmodell der chronischen Oxalatnephropathie.....	40
Abbildung 6	Transkutane GFR-Messung.....	42
Abbildung 7	Modelle zur Berechnung der GFR.....	43
Abbildung 8	Gating-Strategie zur Phänotypisierung der Makrophagenpopulation.....	49
Abbildung 9	Identifikation der diversen Kristallformen via Durchflusszytometrie.....	51
Abbildung 10	Inhibition der Kalziumoxalatkristallformation durch IgG1-Antikörper in chemico.....	57
Abbildung 11	Bindung von freiem Oxalat durch IgG1-Antikörper.....	58
Abbildung 12	Morphologische Veränderungen im Modell der chronischen Oxalatnephropathie.....	60
Abbildung 13	Reduktion der renalen Kalziumdeposition durch IgG-Antikörper <i>in vivo</i>	61
Abbildung 14	Reduktion des Serumoxalatspiegel durch IgG-Antikörper <i>in vivo</i>	62
Abbildung 15	Effekt der anti-TGF β Therapie auf die Expression von Adhäsionsmolekülen.....	63
Abbildung 16	Inhibition der TGF β Signalwege schützt vor metabolischer Reprogrammierung.....	64
Abbildung 17	Systemische Inhibition der TGF β – Signalwege durch den 1D11 Antikörper.....	65
Abbildung 18	Inhibition der TGF β – Signalwege in der Niere durch den 1D11 Antikörper	66
Abbildung 19	Inhibition der Entzündungsmediatoren durch die anti-TGF β Therapie <i>in vivo</i>	67
Abbildung 20	Inhibition der Differenzierung zu M1-Makrophagen durch die anti-TGF β Therapie....	69
Abbildung 21	Inhibition der Expression pro-fibrotischer Marker durch die anti-TGF β Therapie.....	72
Abbildung 22	Reduktion der renalen extrazellulärer Matrix durch die anti-TGF β Therapie.....	73
Abbildung 23	Reduktion der renalen Expansion extrazellulärer Matrix durch die anti-TGF β Therapie in der Kernspintomographie.....	74
Abbildung 24	Modulation der Makrophagendifferenzierung hinzu einem protektiven anti- inflammatorischen M2c-Makrophagen Phänotyp durch die anti-TGF β Therapie.....	76
Abbildung 25	Reduktion der mRNA-Expression der tubulären Schädigungsmarker KIM-1 und Timp-2 durch die anti-TGF β Therapie	77
Abbildung 26	Inhibition des Ausmaßes der tubulären Schädigung im Modell der chronischen Oxalatnephropathie durch die anti-TGF β Therapie.....	79
Abbildung 27	Verbesserung der Nierenfunktion im Modell der chronischen Oxalatnephropathie durch die anti-TGF β Therapie.....	80

Abbildung 28	Verlangsamung des Verlusts der glomerulären Filtrationsrate durch die anti-TGF β Therapie im Modell der chronischen Oxalatnephropathie.....	82
Abbildung 29	Kein protektiver Effekt auf die Nierenfunktion durch die anti-TGF β Therapie bei einem verzögertem Therapiebeginn.....	84
Tabelle 1	Eingesetzte murine Primersequenzen.....	33
Tabelle 2	Auflistung der Bestandteile des verwendeten Futters.....	38
Tabelle 3	Quantifizierung des Tubulusschadens.....	54

1 Einleitung

1.1 Das chronische Nierenversagen

Das chronische Nierenversagen ist mit einer geschätzten Prävalenz von 7-12% der Gesamtbevölkerung eine weit verbreitete Erkrankung ¹. In den meisten Fällen ist das chronische Nierenversagen irreversibel und mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Begleiterkrankungen assoziiert. Die Morbidität und Mortalität für die betroffenen Patienten ist deutlich erhöht ². Das chronische Nierenversagen stellt somit für den betroffenen Patienten und das Gesundheitssystem eine große Belastung dar.

1.1.1 Definition und Klassifikation des chronischen Nierenversagens

Gemäß der Guidelines der *Kidney Disease: Improving Global Outcome* (KDIGO) 2012 wird das chronische Nierenversagen (engl. *chronic kidney disease CKD*) als „*Abweichung der Funktion oder Struktur der Niere definiert, welche negative Auswirkungen auf den Gesundheitszustand des Patienten zeigt und mindestens 3 Monate andauert*“ definiert ³. Im Jahre 2012 wurde von der KDIGO eine neue Klassifikation eingeführt, welche folgende 3 Kategorien umfasst: 1) die zu Grunde liegende Pathologie des chronischen Nierenversagens (CNV), 2) die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und das Ausmaß der 3) Albuminurie. Diese drei Kategorien wurden gewählt, da sie entscheidend für die Prognose des weiteren Verlaufs des CNV sind ³. Hierbei wird die Abnahme der exkretorischen Funktion in fünf GFR-Stadien G 1-5 und das Ausmaß der Albuminurie in 3 Schweregrade unterteilt (siehe Abbildung 1). Durch Gegenüberstellung der Schweregrade der GFR und der Albuminurie konnte eine 2D-Matrix erstellt werden, mithilfe derer das Risiko eines terminalen Nierenversagens oder das Auftreten von weiteren Komplikationen abgeschätzt werden kann (siehe Abbildung 1) ¹.

Der Begriff der terminalen Niereninsuffizienz (engl. *end-stage kidney disease, ESKD*) ist nicht einheitlich definiert, allerdings ist damit meist die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie gemeint. Eine alleinige Definition über die GFR wird nicht empfohlen, da nicht alle Patienten mit einer GFR < 15 ml/min/1,73m² dialysepflichtig sind ¹.

			Kategorien der persistierenden Albuminurie			
			A1 Normal bis leicht erhöht <30mg/g <3 mg/mmol	A2 Moderat erhöht 30-300mg/g 3-30mg/mmol	A3 Stark erhöht >300mg/g >30mg/mmol	
GFR Kategorien (ml/min/1.73m ²)	G1 Normal oder hoch	>90				<div>Niedriges Risiko</div> <div>Moderat erhöhtes Risiko</div> <div>Hohes Risiko</div> <div>Sehr hohes Risiko</div>
	G2 Leicht eingeschränkt	60-89				
	G3a leicht bis moderat eingeschränkt	45-59				
	G3b moderat bis stark eingeschränkt	30-44				
	G4 stark eingeschränkt	15-29				
	G5 Nierenversagen	<15				

Abbildung 1: Klassifikation des chronischen Nierenversagens KDIGO. Links aufgelistet die verbliebene glomeruläre Filtrationsrate und horizontal das Ausmaß der Albuminurie. Farblich hinterlegt ist das Risiko des Patienten eine schwerwiegende Komplikation, wie ein terminales Nierenversagen, eine kardiovaskuläre Erkrankung, ein akutes Nierenversagen zu erleiden oder zu versterben. Abbildung adaptiert nach der „KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease“⁴.

1.1.2 Morbidität und Mortalität des chronischen Nierenversagens

Weltweit wird die Prävalenz des chronischen Nierenversagens auf ca. 7-12% geschätzt und stellt somit eine große Herausforderung im globalen Gesundheitswesen dar¹. In Deutschland wird die Prävalenz mit bis zu 17,3%, nach *Brück et.al* sogar deutlich höher eingeschätzt⁵. Aufgrund der schwerwiegenden Komplikationen ist es weltweit die 16-häufigste Todesursache².

Die Niere erfüllt eine Vielzahl lebensnotweniger Aufgaben im menschlichen Organismus. Neben der Ausscheidung von toxischen Metaboliten und Abbauprodukten ist sie auch maßgeblich an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie des Säure-Basen-Haushaltes und des Blutdruckes beteiligt. Darüber hinaus stimuliert sie durch die Produktion von Erythropoetin die Erythropoese. Dementsprechend führt ein Funktionsverlust der Niere zu schwerwiegenden Komplikationen und Folgeschäden³.

Die klinischen Symptome sind vielfältig und reichen von Ödembildung, Dyspnoe, Störung der Urinausscheidung wie Polyurie, Hämaturie oder Proteinurie bis hin zu kognitiven Einschränkungen, Erbrechen, Geschmacksstörungen, Krämpfen oder Pruritus³. Zu Beginn sind jedoch viele Patienten asymptomatisch, sodass eine CNV oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt wird. Hierbei kann bereits ein schwerwiegender irreversibler

Nierenschaden entstanden sein, wobei eine kausale Therapie dann oft nicht mehr möglich ist ⁶. Störungen des Natrium- und Wasserhaushaltes manifestieren sich oft als Hypervolämie, welche sich klinisch durch periphere Ödeme, Dyspnoe oder eine arterielle Hypertonie zeigt ¹. Die arterielle Hypertonie kann sowohl zum Entstehen eines chronischen Nierenversagens beitragen als auch als Komplikation auftreten. Bei den meisten Patienten ist letzteres der Fall ⁷. Die arterielle Hypertonie ist ein entscheidender Risikofaktor für die Entstehung einer Herz-Kreislaufkrankung sowie deren Therapie und somit entscheidend für die Prognose des Patienten ⁸.

Vor über 170 Jahren wurde erstmals von Richard Bright ein Zusammenhang zwischen dem CNV und der renalen Anämie entdeckt. Seitdem sind zahlreiche Pathomechanismen für die Entstehung der Anämie im Rahmen des CNV entdeckt worden: Zum einen wird die Erythropoese durch eine verminderte Produktion von Erythropoetin in der Niere, als auch durch Urämie-induzierte Inhibitoren gehemmt. Zum anderen ist bei einem CNV der Eisen-Haushalt gestört, da durch Heparin die Aufnahme von Eisen aus dem Darm und die Freisetzung aus dem Retikuloendotheliales System inhibiert wird ⁹. Neben diesen beiden Mechanismen der verminderten Erythropoese zeigen die Erythrozyten bei CKD-Patienten zudem eine verkürzte Lebensdauer ¹⁰. Klinische Symptome sind ein blasser Hautkolorit, Schwindel, Kopfschmerzen und eine verminderte körperliche Belastbarkeit ⁹.

Patienten mit einem chronischem Nierenversagen Grad G3A - G5D haben ein deutlich erhöhtes Frakturrisiko. Dies ist auf Veränderungen des Knochenstoffwechsels und des Kalzium-Phosphat-Haushaltes zurückzuführen, welche im Englischen unter dem Begriff *Chronic Kidney Disease – Mineral und Bone Disorder* (CKD-MBD) zusammen gefasst werden ¹¹. Die Regelkreise sind komplex, Gegenstand aktueller Forschung und werden im Folgendem nur ausschnittsweise beschrieben. In den proximalen Tubuluszellen der Niere wird 25-Hydroxyvitamin D₃ (Calcidiol) durch die 1 α -Hydroxylase in die aktive Form, das 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) umgewandelt. Bei Verlust der Nephrone kommt es zu einem Mangel an Vitamin D mit folgender Hypokalziämie und letztendlich zu einem sekundärem Hyperparathyreodismus, der wiederum zu einer vermehrten Osteoklastenaktivität bzw. Knochenabbau führt ¹². Klinisch kann sich dies mit einem erhöhten Frakturrisiko, Knochenschmerzen und bei Kindern in Wachstumsstörungen äußern ¹. Während die Serum-Kalziumspiegel beim niereninsuffizienten Patienten normal, erniedrigt oder erhöht sein können ist das Phosphat in fortgeschrittenen Stadien erhöht. Eine Hyperphosphatämie

wiederum führt zu einer vermehrten Ausschüttung von *Fibroblast Growth Factor* (FGF)-23, einem Hormon, welches die Phosphatexkretion fördert und die Calcitriolbildung inhibiert. Sowohl die Hyperphosphatämie als auch erhöhte FGF-23 Spiegel sind mit einem erhöhten kardiovaskulärem Risiko und einer erhöhten Mortalität assoziiert ¹³. Eine weitere Manifestation der CKD-MBD ist die Entstehung von extraskelettalen Kalzifikationen ¹⁴.

Das Risiko von Patienten mit einem CNV eine koronare Herzerkrankung zu entwickeln ist um ca. 40 % erhöht und ab einer GFR von $< 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ist die Wahrscheinlichkeit an einem kardiovaskulären Event zu versterben mit 57% deutlich erhöht ¹⁵. Die kardiovaskulären Komplikationen tragen mit einem Anteil von 30-50% der CNV-assoziierten Todesfälle am häufigsten zur Mortalität des CNV bei ¹⁶. Die Entstehung von Komplikationen aus dem Formenkreis der Herz-Kreislaufferkrankungen bei CNV-Patienten kann u.a. durch die erhöhte Prävalenz von arteriellen Hypertonien, Dyslipidämien, Hyperurikämien, Hyperglykämien sowie dem Auftreten einer systemischen Inflammation und oxidativem Stress erklärt werden¹. Klinische Zeichen einer kardiovaskulären Komplikation sind beispielsweise kardiovaskuläre Kalzifikationen oder linksventrikuläre Hypertrophien ¹⁴.

Bei Rückgang der Nierenfunktion kommt es zur Akkumulation von Abbauprodukten des Stoffwechsels wie Harnstoff, β_2 -Mikroglobulin, Aminen, Guanidinen und vielen weiteren Metaboliten. Im Endstadium des chronischen Nierenversagens können diese Metabolite zum Krankheitsbild der Urämie führen. Die Symptome sind vielfältig und reichen von neurologischen Symptomen wie Lethargie, Schlafstörungen, Verwirrtheit, peripherer Neuropathie, epileptischen Anfällen, Muskelkrämpfen bis hin zu Erbrechen, Kachexie oder einer vermehrten Blutungsneigung. Unbehandelt und bei ausbleibender Verbesserung der Nierenfunktion führt die Urämie zum Tod ¹⁷.

1.1.3 Therapie des chronischen Nierenversagens

Bei Auftreten eines chronischen Nierenversagens ist es bereits zu einem Verlust von Nephronen gekommen. Postnatal können kaum mehr neue Nephrone gebildet werden, was bedeutet, dass der entstandene Funktionsverlust irreversibel ist ¹⁸. Die Therapie ist somit darauf beschränkt, einen weiteren Verlust von Nephronen durch Behandlung oder Vermeidung der Ursache zu verhindern und damit Komplikationen und Folgeschäden zu minimieren. Die kausale Therapie des chronischen Nierenversagens richtet sich nach der jeweiligen Ätiologie und ist je nach zu Grunde liegender Pathologie oder Stadium

gegebenenfalls nicht möglich. Essenziell für den Erfolg jeder Therapie ist eine frühe Diagnosestellung, da die Niere nur eine sehr geringe Regenerationskapazität besitzt und weiterer Schaden unbedingt verhindert werden muss ¹⁹⁻²¹. Zwar kann durch Hyperfiltration der übrigen Nephrone die Nierenfunktion für eine gewisse Zeit aufrechterhalten werden, jedoch führt diese Überbelastung langfristig durch Hypertrophie und Fibrose zu einer weiteren strukturellen Schädigung der Nephrone ¹.

Bei metabolischen Grunderkrankungen wie dem Diabetes mellitus, die sekundär zu einer chronischen Nierenschädigung (diabetische Nephropathie) führen, gilt es primär die Grunderkrankung möglichst gut zu kontrollieren. Mit *Sodium-glucose linked transporter 2* (SGLT2) - Hemmern konnte erstmals in der Therapie der diabetischen Nephropathie ein Durchbruch in der Therapie des chronischen Nierenversagens erzielt werden ²². Neuere Studien zeigten, dass SGLT2-Hemmer auch bei weiteren nicht-diabetischen Glomerulonephritiden wie beispielsweise der IgA-Nephritis, der membranösen Glomerulonephritis oder der fokal segmentalen Glomerulosklerose das Fortschreiten des CNV und die Mortalität effektiv vermindern ²³.

Bei Nephropathien, denen eine dysregulierte Immunreaktion als Ursache der Schädigung zu Grunde liegt, können gegebenenfalls immunsuppressive Medikamente eingesetzt werden. Nicht selten kann der Progress des chronischen Nierenversagens jedoch nur unzureichend gebremst werden, beziehungsweise die Medikation ist mit systemischen Nebenwirkungen verbunden. Bei fortgeschrittenen Stadien müssen zudem die Komplikationen und Folgeschäden behandelt werden. Hier kommen zum Beispiel Antihypertensiva, Diuretika, Hormonsubstitutionen, orales Bikarbonat oder Phosphatbinder zum Einsatz ¹. Kommt es zur terminalen Niereninsuffizienz muss eine Nierenersatztherapie wie die Dialyse oder eine Nierentransplantation initiiert werden. Die Dialyse ist ein sehr kostenintensives und komplikationsreiches Verfahren, welches mit einem hohen Verlust an Lebensqualität und einer hohen Mortalität einhergeht. Die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit liegt bei 40-50% und ist damit beispielsweise geringer als beim kolorektalen Karzinom Stadium II oder III ^{24,25}. Die Nierentransplantation sollte unter Berücksichtigung der Komorbiditäten und der Lebenserwartung immer in Erwägung gezogen werden, allerdings ist die Verfügbarkeit von Spenderorganen deutlich begrenzt. Die Wartezeit für eine postmortale Nierenspende beträgt in Deutschland durchschnittlich 6 Jahre. Jährlich können in Deutschland 2000 Nieren transplantiert werden, dem gegenüber stehen jedoch 7500 Patienten die auf eine Niere

warten ²⁶. Nach Transplantation muss der Patient intensiv überwacht werden um eine mögliche Abstoßungsreaktion, Infektionen, oder Komplikationen wie eine Amyloidose, eine Dyslipidämie, eine arterielle Hypertonie, oder die Entstehung von malignen Erkrankungen wie der Posttransplantations-Lymphoproliferativen Erkrankung (PTLD) frühzeitig zu erkennen ²⁷. Trotz aller medizinischer Bemühungen beträgt die mediane kumulative Lebensdauer einer postmortalen Nierenspende 9 Jahre und die einer Lebendspende 12 Jahre ²⁷.

1.2 Kristallopathien

In der Vergangenheit wurde der Begriff Kristallopathie hauptsächlich im Zusammenhang mit kristallinduzierten Arthropathien wie der Gicht oder der Chondrokalzinose verwendet ²⁸. *Anders et.al.* setzt in einer Publikation im New England Journal of Medicine den Begriff der Kristallopathie in einen komplett neuen Kontext. In dieser Arbeit wird der Begriff für Erkrankungen verwendet, deren Organschäden durch Kristalle oder Mikropartikel induziert wurden ²⁹. Begründet wird diese neue, innovative Begriffsbildung durch die wissenschaftlichen Erkenntnisse der letzten Jahre, welche gezeigt haben, dass diesen Krankheiten gemeinsame Pathomechanismen zu Grunde liegen ²⁹.

1.2.1 Organmanifestationen von Kristallopathien

Je nachdem wo sich Kristalle bilden oder von extern Partikel in den Körper eindringen, können sie in einer Vielzahl von Organen Schäden verursachen ²⁹. Gelangt beispielsweise Quarzstaub, welcher Quarzkristalle enthält, über die Atemwege zur Lunge, führt dies akut zu einer Entzündung und bei chronischen Exposition zum Krankheitsbild der Silikose ³⁰. Komplikationen dieser Erkrankung sind die Entstehung einer COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung, engl. Chronic obstructive pulmonary disease), eines Bronchialkarzinoms oder aufgrund der supprimierten Immunabwehr die Reaktivierung oder Neuinfektion mit Tuberkulose ³⁰. Neben Quarzkristallen gibt es zahlreiche weitere Partikel wie Feinstaub, Tabakrauch, Asbest oder Kohle-Partikel, welche zu einer Lungenschädigung führen können ²⁸. Ebenso klinisch relevant ist die Manifestation im kardiovaskulären System. So kommt es bei der Atherosklerose, einer der führenden Todesursachen weltweit, zur Ablagerung von Cholesterol- und Hydroxyapatit-Kristallen in der Lamina interna arterieller Gefäße ³¹. Eine sehr häufige Entität mit einer

geschätzten Prävalenz von 15-20% in Deutschland, stellt die Choledocholithiasis dar. Aufgrund optimaler Kristallisationsbedingungen kommt es im Bereich der extrahepatischen Gallengänge durch Zusammenschluss vieler einzelner Kristalle zur Bildung von großen Konkrementen. Ein Fünftel dieser Patienten entwickelt akute Komplikationen wie eine Cholezystitis oder Pankreatitis durch Obstruktion dieser Konkreme³². In dieser Arbeit, werden vorrangig die kristallinduzierten Nephropathien thematisiert, welche eine häufige nephrologische Pathologie darstellen³³.

1.2.2 Pathomechanismen der Kristallisation

Bei der Mehrheit der Kristallopathien entstehen die Kristalle im Körper und gelangen nicht durch die Umwelt in den Körper, daher sind die Mechanismen der Kristallbildung äußerst relevant für die Entwicklung neuer Therapieansätze²⁹. Aus der klassischen thermodynamischen Betrachtungsweise ist die Kristallisation ein physikalischer Vorgang, bei dem sich Moleküle oder Ionen in einer geordneten Struktur zusammenfügen und somit einen Kristall bilden. Ein Kristall kann physikalisch als Feststoff beschrieben werden, dessen Atome, Ionen oder Moleküle in einem dreidimensionalen, wiederkehrenden Muster angeordnet sind. Die Kristallisation kann orientierend in zwei Prozesse unterteilt werden: Zunächst kommt es zur Keimbildung, der kleinsten Einheit des Kristalls. Nach der Keimbildung kommt es zum Kristallwachstum, hier lagern sich an der Oberfläche des Keims weitere Teilchen an, welche in das Kristallgitter inkorporiert werden³⁴.

Dieses Modell trifft aber für Kristallisationsvorgänge in der Natur nur selten zu. Untersucht man biologische Kristallformen wie beispielweise Zähne, Knochen oder Muschelschalen, so zeigt sich, dass deren Entstehung nicht durch das Modell der klassischen Kristallisation erklärt werden kann³⁵.

In den letzten Jahrzehnten konnten zahlreiche neue Kristallisationsmechanismen aufgedeckt werden, welche unter der Lehre der nichtklassischen Kristallisation zusammengefasst werden³⁵. Eine zentrale neue Erkenntnis dieser Lehre ist, dass Kristalle nicht nur durch die Anlagerung von einzelnen Molekülen wachsen, sondern dass sich zunächst Mesokristalle, also kleine Untereinheiten bilden. Ein wichtiger Kristallisationsprozess in der Natur ist zudem die Bildung von Kristallen aus übersättigten Lösungen, wie bei der Entstehung von Kalziumoxalatkristallen

³⁶. Neben der Konzentration der Salze ist die Kristallformation von vielen weiteren Faktoren wie dem pH-Wert, der Temperatur oder die Kristallisation inhibierende Proteine wie Nephrokalzin, Osteopontin oder Uromodulin abhängig ^{37,38}.

1.2.3 Kristallinduzierte Nephropathien

Nach *Mulay et al.* können die kristall-induzierten Nephropathien je nach Lokalisation der Kristallablagerung in folgende drei Kategorien eingeteilt werden: Typ 1) Renovaskuläre Kristallopathie, Typ 2) Tubuläre Kristallopathie, und Typ 3) Urolithiasis (siehe Abbildung 2) ³⁹.

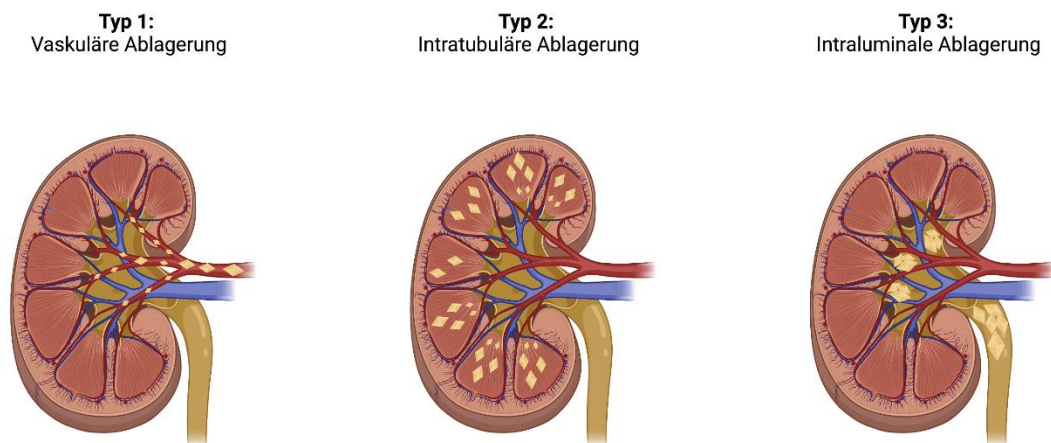


Abbildung 2: Formen der kristall-induzierten Nephropathien. Beim Typ 1 führen Kristallembolien oder chronische Ischämien durch atherosklerotische Arterien zu renalen Ischämien. Im Rahmen des Typs 2 kommt es durch intratubuläre Kristallablagerungen zur Tubulusnekrose. Der Typ 3 ist gekennzeichnet durch Kristallformationen im Bereich des Nierenbeckens oder der ableitenden Harnwege, welche renale Koliken oder eine chronische obstruktive Nephropathie zur Folge haben können. Die Abbildung wurde mit BioRender Software generiert und adaptiert nach Mulay et al ³⁹.

1.2.3.1 Renovaskuläre Kristallopathien

Aufgrund ihrer hohen Blutversorgung und ihrer zentralen Rolle bei der Regulation des Blutdrucks ist die Niere und deren Funktion abhängig von der Integrität der zuführenden arteriellen Gefäße. Im Rahmen der Atherosklerose entstehen durch Plaques Stenosen im Bereich der zuführenden arteriellen Gefäße, welche zu einer chronischen Ischämie und langfristig zur Entwicklung eines chronischen Nierenversagens führen ⁴⁰. Bei der Entstehung der atherosklerotischen Plaques spielen Cholesterol-Kristalle eine zentrale Rolle bei der Progression der Erkrankung, weshalb die Atherosklerose hier aufgeführt wird ⁴¹. Eine seltene,

aber schwerwiegende und schwer zu diagnostizierende Komplikation der Atherosklerose stellt das Cholesterinembolie-Syndrom dar. Hierbei werden durch eine Plaqueruptur, Cholesterolkristalle freigesetzt, welche peripher mikroembolische Infarkte auslösen. Auslöser sind in den meisten Fällen endovaskuläre oder gefäßchirurgische Eingriffe ^{42,43}, seltener kommt es spontan oder in zeitlichem Zusammenhang mit der Gabe von Thrombolytika ⁴⁴ oder Antikoagulantien ⁴⁵ zur Plaqueruptur. Quelle der rupturierten Plaques ist meist die Aorta, sodass sich Cholesterinembolien meist in der Niere, der Haut, im Gastrointestinaltrakt, im Bereich der oberen und unteren Extremität, als auch im Auge und im Gehirn manifestieren ^{43,46}. Ein charakteristisches klinisches Zeichen ist beispielweise das „Blue Toe“-Syndrom. Hierbei entstehen durch Mikroembolien der die Zehen versorgenden Gefäße, livide Verfärbungen einzelner Zehen, wobei die Fußpulse erhalten sind und der Rest des Fußes meist keine Minderversorgung aufweist ⁴⁶. Als Folge von Infarkten im Bereich des Nierenkortex und des Nierenmarks, entwickeln ca. 25-50% der Patienten ein akutes Nierenversagen ⁴⁷. *In vivo* Modelle haben gezeigt, dass Cholesterolkristalle die Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten in die Niere induzieren, gefolgt von einer Makrophagen-Stimulation, welche die Bildung von Riesenzellgranulomen triggern können. Dies führt langfristig zu einer narbigen Obliteration des Gefäßes und nachfolgend zum irreversiblen Verlust des Nierenparenchyms ^{48,49}. Die therapeutischen Optionen sind auf supportive Maßnahmen und auf eine sekundäre Prävention, wie beispielweise die Gabe von Statinen, welchen eine plaquestabilisierende Wirkung zugesagt wird, limitiert ⁵⁰. Auch bei Ausschöpfung dieser Maßnahmen weist das Cholesterinembolie-Syndrom eine hohe Letalität auf. Eine prospektive Studie von Scolari et al. zeigte, dass zwei Jahre nach Diagnosestellung, 33% der Patienten dialysepflichtig wurden, 28% verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraums ⁵¹.

1.2.3.2 Tubuläre Kristallopathie

Nach Mulay und Anders ist die tubuläre Kristallopathie definiert über die Ausfällung von Mineralien, Proteinen und Toxinen im Tubulussystems eines Nephrons. Im Tubulussystem wird der Primärharn konzentriert und modifiziert, sodass eine hohe Konzentration an Molekülen und Ionen erreicht wird, was wiederum maßgeblich die Ausfällung von Kristallen begünstigt ³⁹. Kristallablagerung im Tubulussystem können im Wesentlichen folgenden 4 Kategorien zugeordnet werden: 1) Dysproteinämie-assoziierte Kristall-induzierte Nephropathien, 2) Toxische Kristall-induzierte Nephropathien, 3) Tubuläre Kristallopathien als Folge von Stoffwechselerkrankungen, und 4) Nephrokalzinosen ⁵².

1) Dysproteinämie-assoz. Kristall-induzierte Nephropathie

Die häufigste Pathologie dieser Kategorie ist die Cast-Nephropathie, auch bekannt unter dem Begriff Myelomniere. Hierbei kommt es im Rahmen eines Multiplen Myeloms durch entartete Plasmazellen zu einer übermäßigen Produktion von Ig-Leichtketten, welche mit dem Primärhahn filtriert werden. Wird die Resorptionskapazität im proximalen Tubulus überschritten, kann es durch Risikofaktoren wie einer Dehydratation zur Ausfällung von Ig-Leichtketten in Form von Eiweißzylindern (*engl. Casts*) im distalen Tubulus kommen ^{53,54}. Durch eine direkte Toxizität der Leichtketten im distalen Tubulus, als auch durch eine Obstruktion der *Casts* im distalen Tubulus kann sich dies klinisch in einem akuten Nierenversagen manifestieren ⁵⁵. Die *Casts* können mikroskopisch sowohl amorph als auch kristallin zur Darstellung kommen. Insbesondere bei den kristallinen Formen finden sich meist umgebende Neutrophile Granulozyten und Riesenzellgranulome ⁵². Die Therapie der Cast-Nephropathie beruht im Wesentlichen auf zwei Säulen: 1) die Hemmung der Produktion der Ig-Leichtketten mithilfe einer aggressiven Chemotherapie des Multiplen Myeloms und 2) eine intravenöse Flüssigkeitstherapie zur Verringerung der Konzentration der Leichtketten im Tubuluslumen ^{56,57}. Eine Dialyse wird nur bei Zutreffen der allgemein üblichen Indikationen begonnen. Es besteht zudem die Möglichkeit der Plasmapherese und der HCO-Hämodialyse, welche bei schweren Verläufen in Erwägung gezogen werden können ^{58,59}. Bei 50 – 80% erholt sich die Nierenfunktion, jedoch verbleibt eine große Anzahl der Patienten dialysepflichtig ⁶⁰. Zudem ist eine persistierende Niereninsuffizienz nach Therapie mit einer deutlich erhöhten Mortalität assoziiert ⁶¹.

Eine seltene Nephropathie aus diesem Formenkreis ist das monoklonale Ig-Leichtketten-assoziierte Fanconi Syndrom. Bei dieser monoklonalen Gammopathie sind in den proximalen Tubuluszellen Einschlüsse von Immunglobulin-Ketten in Form von nadelförmigen Kristallen nachweisbar. Klinische Manifestationen sind zunächst Folgen der proximalen Tubulopathie wie eine Hypokaliämie, Hypourikämie, Glukosurie oder eine renale proximale tubuläre Azidose. Langfristig kommt es zum chronischen Nierenversagen ⁶².

2) Toxisch Kristall-induzierte Nephropathie

Einige schlecht wasserlösliche Medikamente oder deren Metabolite können bei hohen Konzentrationen im Urin zur Ausfällung von Kristallen im Tubuluslumen führen. Einige bekannte Beispiele sind: Aciclovir, Methotrexat, Indinavir, Sulfadiazine, Ciprofloxacin ⁶³⁻⁶⁵.

Meist entwickeln Patienten innerhalb der ersten 7 Tage nach Start der Medikation ein akutes Nierenversagen. Risikofaktoren sind eine Volumendepletion, eine vorbestehende Niereninsuffizienz oder Schwankungen des Urin-pHs. Entscheidend ist ein frühes Erkennen und unverzüglicher Start von supportiven Maßnahmen wie eine intravenöse Flüssigkeitsgabe, ggf. die Gabe von Schleifendiuretika, wenn möglich ein Absetzen des Medikaments und in einigen Fällen eine Alkalisierung des Urins mittels Bicarbonat ^{63,66}

3) Tubuläre Kristallopathien als Folge von Stoffwechselerkrankungen

Tubuläre Kristallopathien entstehen auch im Rahmen von angeborenen und erworbenen Stoffwechselerkrankungen, welche die Ausfällung von Kristallen innerhalb des Tubulussystems begünstigen. Einer der häufigsten Vertreter dieser Gruppe ist die Urat-Nephropathie ⁶⁷. Die Harnsäure ist ein Abbauprodukt von Purinen, dem molekularem Grundbaustein der beiden organischen Nukleinbasen Adenin und Guanin ⁶⁸. Übersteigt im Falle einer Hyperurikämie die Harnsäure ihr Löslichkeitsprodukt, so kommt es zur Ausfällung von Uratkristallen und folglich zum Krankheitsbild der Gicht. Die häufigsten Manifestationsorte sind die Gelenke, insbesondere das Großzehengrundgelenk ⁶⁸. Da die Harnsäure zu 80% renal ausgeschieden wird, kommt es in wenigen Fällen auch renal zur Bildung von Uratkristallen. Dies kann sich klinisch sowohl als akute als auch chronische Uratnephropathie, sowie als Urat-Nephrolithiasis manifestieren ^{67,69}. Akute Uratnephropathien werden v.a. im Rahmen eines massiven Zelluntergangs wie beispielsweise bei einem Tumorlysesyndrom oder dem Polytrauma beobachtet. Hierbei kommt es zum oligo- oder anurischem Nierenversagen mit Kristallablagerungen in den Sammelrohren ⁷⁰. Eine akute Uratnephropathie kann durch eine intravenöse Flüssigkeitsgabe und die Gabe von Allopurinol (Xanthinoxidase) oder ggf. Rasburicase (rekombinante Uratoxidase) behandelt werden ⁶⁹. Bei chronischer symptomatischer Hyperurikämie kann es, begünstigt durch einen sauren Urin-pH, zur Entstehung einer chronischen Uratnephropathie kommen. Histologisch korreliert dies mit einem fibrotischen Umbau der Medulla und Kristallablagerungen in den Sammelrohren. Charakteristischerweise sind die Uratkristallablagerungen umgeben von einer granulomatösen Formation, bestehend aus mehrkernigen Riesenzellen (= stimulierte, dicht zusammengelagerte Makrophagen) oder lymphozytären Infiltraten ⁷¹. Eine kausale Therapie existiert nicht. Ob durch aktives Management der Hyperurikämie das Risiko der Entwicklung einer chronischen Uratnephropathie reduziert werden kann, ist umstritten ⁷².

Die Cystinose ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit. Durch diverse Mutationen im CTNS-Gen kommt es zum Funktionsverlust von Cystinosin, einem lysosomalen Membranprotein, welches Cystin aus den Lysosomen transportiert ⁷³. Folglich kommt es zur Akkumulation von Cystin in verschiedenen Organen wie beispielsweise den Augen, der Leber, der Schilddrüse oder dem Pankreas, wobei die Niere meist am schwersten betroffen ist ⁷⁴. Je nach Alter bei Erstmanifestation kann zwischen drei Unterformen unterschieden werden: 1) die infantile (oder nephropathische) Cystinose, 2) die juvenile Form und die 3) adulte-benigne (oder okuläre) Form. Bei der häufigsten Form, der infantilen Cystinose, kommt es zwischen dem 3. und 6. Lebensmonat durch Schäden im proximalen Tubulus klinisch zu einem Fanconi-Syndrom mit schweren Störungen des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes ⁷⁴. Histopathologisch sind Kristallablagerungen sowohl intrazellulär in Podozyten, Mesangiumzellen, interstitiellen Makrophagen, als auch in Tubuluszellen und im Tubuluslumen nachweisbar ⁷⁵. Ohne eine Therapie werden die betroffenen Kinder bis zum 10. Lebensjahr dialysepflichtig und benötigen langfristig eine Nierentransplantation ⁷⁶. Durch die Therapie mit Cysteamin kann die Progression zum terminalen Nierenversagen deutlich verlangsamt werden. Cysteamin bildet einen Komplex mit Cystein, welcher über einen anderen Transporter aus dem Lysosom ausgeschleust und so die intrazelluläre Cystein-Konzentration vermindert ⁷⁷. Kurative Therapieoptionen existieren bislang nicht.

4) Nephrokalzinosen

Der Begriff Nephrokalzinose beschreibt die Ablagerung von Kalziumsalzen im Nierenparenchym ⁷⁸. Kalziumphosphat und Kalziumoxalat sind hierbei die beiden häufigsten Salze des Kalziums, die als kristalline Ablagerungen im Nierenparenchym zu finden sind. Verursacht werden renale Kalziumphosphatablagerungen meist durch eine Hyperkalzämie/Hyperkalziurie oder seltener eine Hyperphosphatämie/Hyperphosphaturie ⁵². Eine Hyperkalzämie kann Folge einer Überdosierung von Medikamenten wie Thiaziden, Lithium, Tamoxifen oder einer Vitamin-D Intoxikation sein ⁷⁹⁻⁸². Darüber hinaus werden Hyperkalzämien bei verschiedenen Erkrankungen beobachtet, die zu einer Dysregulation des Kalziumhaushaltes führen. Hierzu gehören beispielsweise der Hyperparathyreoidismus, paraneoplastische Syndrome sowie Osteolysen im Rahmen von Malignomen, als auch granulomatöse Erkrankungen wie die Sarkoidose ⁸³⁻⁸⁵. Eine normokalzämische Hyperkalziurie

findet man u.a. bei der renalen tubulären Azidose Typ I, der Markschwammniere, der neonatalen Nephrokalzinose, dem Bartter-Syndrom oder nach Gabe von Schleifendiuretika⁸⁶. Zu einer Hyperphosphatämie kommt es u.a. beim Tumorlysesyndrom oder bei einer Rhabdomyolyse^{86,87}. In der Vergangenheit wurden Nephrokalzinosen auch nach Einnahme von Abführmitteln mit einem hohen Natriumphosphat-Gehalt, welche zur Darmreinigung vor einer Darmspiegelung eingesetzt wurden, beobachtet⁸⁸. Durch die hohe Phosphat-Belastung der Lösungen und die Hypovolämie, ausgelöst durch die induzierten Diarrhöen, kommt es zu hohen Konzentrationen von Kalzium- und Phosphat-Ionen im distalen Tubulus, was wiederum die Ausfällung von Kalziumphosphat-Kristallen begünstigt⁸⁸. Viele Patienten zeigten im Verlauf ein persistierendes chronisches Nierenversagen, weshalb die Lösungen nicht mehr eingesetzt werden⁸⁸. Das therapeutische Management beinhaltet die Behandlung der zugrunde liegenden Erkrankung, eine konsequente tägliche orale Flüssigkeitszufuhr von > 2 Litern pro Tag und im Falle einer Hyperkalziurie kann durch eine orale Zitrat-Supplementation die Löslichkeit von Kalzium im Urin erhöht werden^{89,90}. Die Ätiologie und Pathophysiologie der Oxalatnephropathie wird im folgenden Kapitel behandelt.

1.2.3.3 Urolithiasis

Mit einer Prävalenz von ca. 4,7% zählt die Urolithiasis zu einer der häufigsten Diagnosen in Deutschland⁹¹. Die Urolithiasis ist definiert durch die Bildung von Harnsteinen im Bereich der ableitenden Harnwege. Je nach Lokalisation der Harnsteine kann weiter zwischen der Nephrolithiasis (Niere), der Ureterolithiasis (Ureter) und der Zystolithiasis (Blase) unterschieden werden⁹¹. Klassischerweise manifestiert sich die Urolithiasis mit kolikartigen Flankenschmerzen, welche sich rasch nach erfolgreicher Steinentfernung zurückbilden⁹¹. Die Hälfte der Patienten erleidet innerhalb der folgenden Jahre ein Rezidiv, womit in wenigen Fällen ein erhöhtes Risiko ein chronisches Nierenversagens zu entwickeln, einhergeht⁹². Besonders gefährdet sind Patienten mit einem sog. „Staghorn calculi“, hierbei handelt es sich um große, weitläufige Harnsteine im Nierenbecken. Meist verursachen sie initial keine Symptome, weshalb sie lange unentdeckt bleiben und durch eine chronische Obstruktion langfristig zum klinischen Bild der chronischen irreversiblen obstruktiven Nephropathie führen können⁹³. Einer der Grundvoraussetzungen für die Bildung von Harnsteinen sind hohe Konzentration an lithogenen Verbindungen, wie beispielweise Kalziumoxalat, Kalziumphosphat, Harnsäure, Ammoniummagnesiumphosphat, Zystin oder Xanthin, bei gleichzeitigem Mangel an Kristallisationsinhibitoren⁹⁴⁻⁹⁷. Zudem fungieren Epitheldefekte und

intratubuläre Kalzifikationen wie Randall-Plaques als Nischen für das Kristallwachstum ⁹⁸. Bei 35-65% der Patienten ist eine gehäufte Familiarität der Urolithiasis eruierbar, was früh eine genetische Prädisposition vermuten ließ ⁹⁹. Bislang ist eine Vielzahl an monogenetischen Erkrankungen bekannt, welche zu einer Überproduktion an lithogenen Metaboliten oder Defekten in Ionentransportern im Tubulussystem führen ⁹⁴. Darüber hinaus konnten in den letzten Jahren, im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien, zahlreiche polygenetische Dispositionen identifiziert werden ¹⁰⁰. Während in der Akuttherapie eine Vielzahl an konservativen und chirurgischen Techniken zur Steinentfernung angewandt werden können, sind die Möglichkeiten zur Sekundärprophylaxe meist auf allgemeine Maßnahmen, wie eine reichliche Flüssigkeitszufuhr, eine kochsalz- und oxalatarme Diät und in speziellen Fällen eine Ansäuerung oder Alkalisierung des Urins, limitiert ¹⁰¹.

1.2.4 Klassifikation der Oxalatnephropathie

Die Oxalatnephropathie ist eine seltene Krankheitsentität, allerdings wird die Erkrankung oft übersehen und erst nach schwerer irreversibler Nierenschädigung diagnostiziert. Einzelne Publikationen berichten sogar von Patienten, die erst nach stattgehabter Nierentransplantation und erneuter Verschlechterung der Nierenfunktion richtig diagnostiziert wurden ¹⁰²⁻¹⁰⁶. Eine frühzeitige Diagnose und wenn möglich präventive Maßnahmen sind daher von großer klinischer Relevanz, da ein großer Anteil der Patienten im Verlauf ein terminales Nierenversagen entwickelt ^{104,107-109}. Kalziumoxalatkristallablagerung im Tubulussystem oder seltener im Interstitium sind Folge einer Hyperoxalurie, welche wiederum erworben (sekundäre) oder genetisch (primär) bedingt sein kann ¹¹⁰. Bei Erwachsenen stellt die sekundäre Hyperoxalurie die häufigste Ursache einer Oxalatnephropathie dar. Eine sekundäre Hyperoxalurie kann aus einer exzessiven Zufuhr von oxalatreichen Lebensmitteln oder in seltenen Fällen eine Intoxikation mit Vorläufermetaboliten wie Vitamin C und Ethylenglycol, als auch einer Fettmalabsorption resultieren ^{107,111-113}. Normalerweise bildet Oxalat im Darm Komplexe mit Kalzium, welche über den Stuhl ausgeschieden werden. Bei einer Fettmalabsorption liegen mehr freie Fettsäuren im Darmlumen vor, welche nun das Kalzium binden, sodass Oxalat vermehrt in freier Form vorliegt und folglich über das Colonepithel absorbiert und anschließend über die Niere sezerniert wird ¹¹⁴⁻¹¹⁶. Seltener kann auch ein Mangel an Oxalobacter formigenes, bei

einem Großteil der Bevölkerung Teil des physiologischen Mikrobioms, eine Hyperoxalurie begünstigen. Physiologischerweise baut *Oxalobacter formigenes* Oxalat im Darm zu Format und CO₂ ab und senkt somit die Oxalataufnahme im Dickdarm. Nach langwieriger Antibiotika-Gabe, bei Patientin mit Morbus Crohn oder einem Kurzdarmsyndrom kann das Bakterium oft nicht mehr nachgewiesen werden¹¹⁷⁻¹¹⁹. Die Primäre Hyperoxalurie (PH) bezeichnet eine sehr seltene Gruppe autosomal-rezessiver Erkrankungen, die hepatisch zu einer Überproduktion von Oxalat führen. Je nachdem welches Enzym betroffen ist, kann zwischen der PH Typ 1, 2 und 3 unterschieden werden¹²⁰. Die häufigste Form stellt die PH vom Typ 1 dar, die Inzidenz wird in Europa auf ca. 1:120 000 Lebendgeburten geschätzt^{105,121}. Der PH Typ 1 liegt ein Defekt in der leberspezifischen peroxismalen Alanin-Glyoxalat-Aminotransferase (AGT) zu Grunde. Hierbei kommt es zur Akkumulation des Substrats Glyoxalat, welches wiederum zu Glykolat und Oxalat abgebaut wird^{122,123} (siehe Abbildung 3). Bei der PH Typ 2 besteht ein Defekt in der *Glyoxylate Reductase-Hydroxypyruvat Reduktase* (GRHPR), was wie bei der PH Typ 1 in einer Akkumulation von Glyoxalat resultiert und welches letztendlich über die

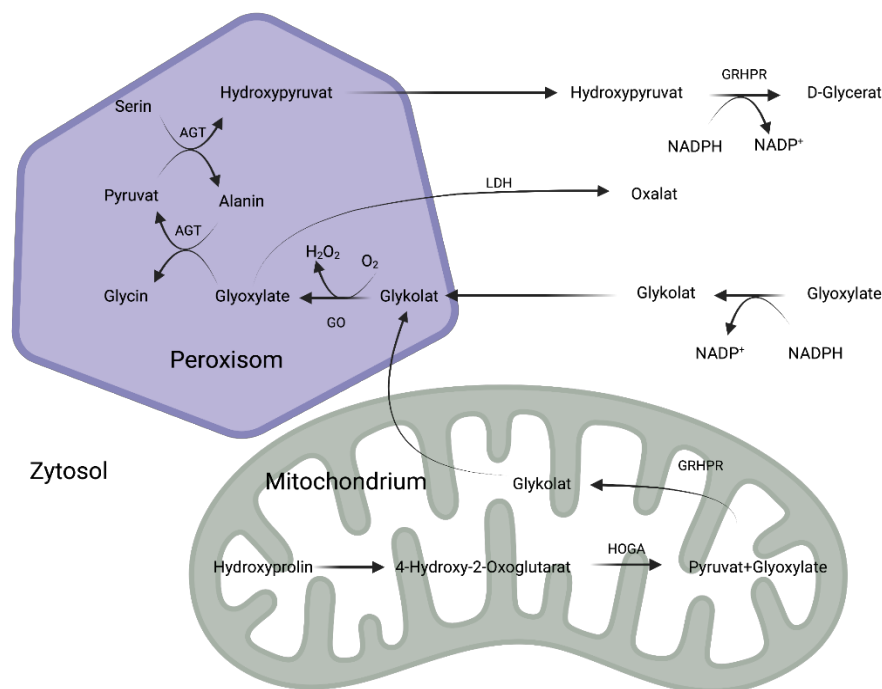


Abbildung 3: Der Oxalatstoffwechsel im Hepatozyten. Glyoxylat gilt als direktes Vorläufermolekül und wird durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Oxalat oxidiert. Der PH Typ 1 liegt ein Defekt in der Alanine-Glyoxalat-Aminotransferase (AGT) zu Grunde, womit weniger Glyoxylat zu Pyruvat und Glycin umgesetzt wird. Die Glykolat Oxidase (GO) katalysiert die Oxidation von Glykolat zu Glyoxylat und stellt damit ein effektives therapeutisches Target dar. Bei der PH Typ 2 liegt ein Mangel der Glyoxylat Reduktase-Hydroxypyruvat Reduktase (GRHPR) vor, wodurch mehr Glyoxylat akkumuliert. Die PH Typ 3 ist bedingt durch eine defekte 4-Hydroxy-2-Oxoglutarat Aldolase (HOGA). Die HOGA ist ein Schlüsselenzym beim Abbau von Kollagen über Hydroxyprolin zu Glyoxylat. Abbildung nach Cochat *et al.*¹²⁰.

Laktatdehydrogenase zu Oxalat abgebaut wird ¹²⁴. Die PH Typ3 wird durch Defekte in der mitochondrial lokalisierten 4-Hydroxy-2-Oxoglutarat-Aldolase (HOGA) verursacht, wobei der biochemische Mechanismus bislang nicht aufgedeckt werden konnte ¹²⁵. HOGA katalysiert die Reaktion von 4-Hydroxy-2-Oxoglutarate zu Pyruvat und Glyoxylat, einem Zwischenschritt beim Abbau von Kollagen im Mitochondrium (siehe Abbildung 3). Intuitiv wäre bei einem Defekt in diesem Enzym eine verminderte Produktion von Glyoxylat und somit eine verminderte Oxalatproduktion zu erwarten. Das Gegenteil ist jedoch der Fall, eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch den Enzymdefekt die Reaktion nicht inhibiert, sondern aktiviert wird. Eine alternative Hypothese ist eine mögliche Hemmung der mitochondrialen GRPHE ¹²⁶⁻¹²⁸.

Das klinische Spektrum der Primären Hyperoxalurie ist sehr breit, das mögliche Manifestationsalter liegt zwischen der Perinatalperiode und dem 6. Lebensjahrzent, wobei die Mehrheit der Patienten im Kindesalter erkranken ¹⁰⁴. Die PH Typ 1 und 2 zeigen meist einen schweren progressiven Verlauf zum terminalen Nierenversagen, während bei der PH vom Typ 3 die Nierenfunktion meist erhalten bleibt. ^{129,130}. Bei der PH Typ 1 und 2 werden neben der Niere viele weitere Organe durch die Oxalatablagerungen geschädigt, wie beispielsweise das kardiovaskuläre System, die Knochen, Gelenke, die Retina, das Knochenmark oder zentrale Nervensystem ¹³¹⁻¹³⁴. Die einzig kurative Therapie bot bis zur Zulassung von Lumasiran die kombinierte Leber-Nieren-Transplantation, wenngleich sie viele Risiken und schwere Komplikationen birgt ¹³⁵. Im November 2020 wurde die Therapie der primären Hyperoxalurie vom Typ 1 durch die Zulassung von Lumasiran revolutioniert. Lumasiran ist ein RNAi-Therapeutikum, welches in der Leber über RNA-Interferenzen zum Abbau der mRNA der Glykolatoxidase führt. Die Glykolatoxidase oxidiert Glykolsäure zu Glyoxylat, welches dann weiter zu Oxalat abgebaut wird. Durch den Mangel an Glykolatoxidase wird weniger Glyoxylat produziert, welches als Substrat für die Bildung von Oxalat benötigt wird. Folglich sinkt der Oxalat-Spiegel im Blut und die daraus resultierende Organschädigung durch Kalziumoxalatablagerungen kann verhindert werden. Die Phase-III-Studie zeigte, dass sich bei der Mehrheit der Patienten der Oxalatspiegel im Serum nach 6 Monaten Therapie nahezu normalisierte ¹³⁶.

Bei den anderen beiden genetisch bedingten Formen der Hyperoxalurie Typ 2 und Typ 3 sowie der sekundären Hyperoxalurie greift dieser Mechanismus nicht effizient. Für die anderen

Formen der Oxalatnephropathie stehen lediglich supportive Maßnahmen als therapeutische Option zur Verfügung. Essenziell ist eine tägliche Flüssigkeitsaufnahme von 2-3 Litern/m² Körperoberfläche, im Säuglingsalter kann dies eine perkutane Gastrostomie erfordern. Zur Alkalisierung und Inhibition der Kristallisation können Kalium- oder Natriumcitrat verabreicht werden ^{137,138}.

1.2.5 Pathomechanismen der kristall-induzierten Organschädigung

Folgendes Kapitel soll einen Einblick in die kristall-induzierten molekularen Mechanismen geben, welche zur Schädigung des betroffenen Organs führen. Kristalle werden von Immunzellen und Parenchymzellen als potentiell Pathogen erkannt, wodurch sowohl Zelltod als auch eine Entzündungsreaktion ausgelöst werden können. Forschungsarbeiten der letzten Jahre zeigten, dass Kristalle über RIPK3/MLKL-vermittelte Signalkaskaden, Nekroptose induzieren können ¹³⁹. Die Nekroptose ist eine Unterform der regulierten Form des Zelltods. Während bei der Apoptose, die Zelle durch Caspasenaktivierung systematisch zu phagozytischen Apoptosekörperchen abgebaut wird, kommt es bei der Nekrose zur Membranruptur. Hierbei werden Moleküle wie beispielweise Histone, DNA, RNA oder das High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) unkontrolliert in den Extrazellulärraum freigesetzt ¹⁴⁰. Diese Moleküle fungieren als sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) und initiieren über Bindung an *pattern-recognition receptors* (PRPs) eine Entzündungsreaktion ^{141,142}. Hierbei werden Zytokine wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor-alpha freigesetzt, welche wiederum eine Form der regulierten Zellnekrose auslösen können. Diese sich selbstverstärkenden Mechanismen zwischen Nekrose und Inflammation werden unter dem Begriff „Nekroinflammation“ zusammengefasst ¹⁴³. Die genauen Signaltransduktionswege, die letztendlich o.g. Mechanismen auslösen, sind Gegenstand aktueller Forschung. Ein zentraler Mechanismus stellt die Phagozytose der Kristalle durch Phagozyten wie Makrophagen dar. Es konnte gezeigt werden, dass Kristalle von Oberflächenrezeptoren von Makrophagen als Pathogen erkannt werden. Ein Eliminationsweg ist die Phagozytose desselben ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Hierbei umschließt die phagozytische Zelle die Kristalle mit ihrer Zellmembran und schnürt ein Vesikel, genannt Phagosom, ab. Dieses wiederum verschmilzt mit Lysosomen, welche die nötigen Enzyme zum Abbau bereitstellen ^{147,148}. Bei einigen Kristallen zeigt die lytische Aktivität der lysosomalen Enzyme keine Wirkung, was wiederum zur Destabilisation des

Lysosoms und damit zur Ruptur dergleichen führt. Die freigesetzten Proteasen, wie beispielsweise Cathepsin S, können zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran führen und damit die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies triggern^{149,150}. Einerseits können Cathepsin S und *reactive oxygen species* (ROS) eine NLRP3-Inflammasom-abhängige Entzündungsreaktion mit Freisetzung von IL-1 β /IL-18 vermitteln¹⁵¹. Andererseits wird durch die proteolytische Freisetzung von RIPK1 die Phosphorylierung von RIPK3 induziert und daraufhin folgend die Formation des sog. Nekrosoms bestehend aus RIPK3 und den *mixed lineage kinase domain-like* (MLKL)-Oligomeren. Das Nekrosom seinerseits führt zum Verlust der Membranintegrität sowohl der Plasmamembran als auch der Kernmembran und somit letztendlich zur Nekroptose¹⁵²⁻¹⁵⁵.

1.3 Die renale Fibrose

Als Fibrose bezeichnet man eine pathologische, exzessive Ansammlung von extrazellulärer Matrix (EZM) und Bindegewebszellen¹⁵⁶. Die Mehrheit aller Organe wie beispielsweise die Leber, die Lunge oder der Darm zeigen bei einer fortschreitenden Fibrose einen Funktionsverlust, so auch die Niere. Diese Assoziation lässt einen kausalen Zusammenhang vermuten und ist Grundlage einer langjährigen Erforschung antifibrotischer Therapien^{157,158}.

1.3.1 Die renale Fibrose und das CNV – Ursache oder Assoziation?

Eine chronische Niereninsuffizienz korreliert histopathologisch nahezu immer mit einer fortschreitenden Fibrose^{159,160}. Inwieweit es sich hierbei um einen kausalen Zusammenhang handelt, kann aktuell noch nicht abschließend beantwortet werden. Möglicherweise sind die Fibrose und ein Rückgang der GFR, Folge von übergeordneten Faktoren ohne dabei in einem direkten Zusammenhang zueinander zu stehen¹⁶¹. Die führende Hypothese in den Fachgesellschaften postuliert eine überwiegend schädliche Wirkung der Fibrose^{162,163}. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die renale Fibrose zu einem weiteren Verlust von Nephronen führt. Pathophysiologisch wird vermutet, dass die Narbenbildung strukturelle Schäden verursacht, u.a. durch eine renale Minderperfusion und einer Verdrängung der potenziell heilenden Nierenregeneration^{162,163}. Auf der anderen Seite könnte das fibrotische Gewebe

auch eine mechanisch stabilisierende Wirkung vermitteln¹⁶⁴. Für die Erforschung weiterer Therapieoptionen des CNV ist es essentiell herauszufinden, inwiefern sich eine Modulation der Fibrogenese direkt auf die GFR auswirkt. Die Anzahl der Studien, welche die GFR als Endpunkt wählten ist limitiert¹⁶⁵. Boor *et al.* zeigte *in vivo* im Rattenmodell der anti-Thy1.1-Glomerulonephritis, dass eine CR002-vermittelte platelet-derived growth factor (PDGF)-D-Inhibition der Fibrogenese zwar signifikant die tubulointerstitielle Fibrose vermindert, bei Abschluss der Studie unterschieden sich die Kreatininwerte der Interventionsgruppe allerdings nicht von der Kontrollgruppe¹⁶⁶. In Kollagen4A3-defizienten Mäusen, einem Tiermodell des Alport-Syndroms, konnte durch die wöchentliche Injektion von mesenchymalen Stammzellen (MSC) eine signifikante Reduktion der interstitiellen Fibrose erzielt werden. Hinweise für eine Differenzierung in renale Parenchymzellen ergaben sich nicht. Auf die Nierenfunktion und das Überleben hatten die Intervention hingegen keinen Einfluss¹⁶⁷. Als vielversprechende Therapieoption gilt Pirfenidon, ein antifibrotisches, antiinflammatorisches Medikament, welches bereits erfolgreich bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose eingesetzt wird¹⁶⁸. Sowohl im Mausmodell als auch in einer Fallkohorte von 21 Patienten mit fokaler segmentaler Glomerulosklerose konnte Pirfenidon den Rückgang der GFR verlangsamen^{169,170}. Zusammenfassend kann eine renale Fibrose als Folge eines Nephronenverlusts sowohl protektiv als auch schädlich sein, entscheidend hierfür ist u.a. der zugrunde liegende Pathomechanismus der Nierenschädigung.

1.3.2 TGFβ – Masterregulator der Fibrose

1983 wurde erstmals *transforming growth factor-beta 1* (TGFβ 1), das erste Protein der großen TGFβ Superfamilie, aus humanen Thrombozyten extrahiert und charakterisiert¹⁷¹. Zu der Gruppe der TGFβ Superfamilie gehört eine Vielzahl an Zytokinen, welche wiederum in mehrere Untergruppen klassifiziert werden können. Hierzu gehören neben den TGFβs, die *bone morphogenetic proteins* (BMPs), die *growth differentiation factors* (GDFs), als auch die Aktivine, Inhibine und viele weitere Proteine¹⁷². TGFβ ist ein pleiotropes Zytokin, welches an der Regulation von zahlreichen biologischen Prozessen wie der Zellproliferation, der Apoptose, der Zelldifferenzierung, der Immuntoleranz und Immunantwort sowie maßgeblich der Gewebsfibrose beteiligt ist. In der Nephrologie gewann TGFβ vor allem als zentraler Regulator der renalen Fibrose an Bedeutung^{173,174}.

Bei der Synthese von TGF β wird zunächst ein Präkursor-Protein produziert, welches dann nach posttranslationaler Modifikation in seiner inaktiven Form dem TGF β /LAP-/LTBP-Komplex sezerniert wird. Der Komplex besteht u.a. aus dem TGF β -Homodimer, welches nicht-kovalent an das zuvor abgespaltene Propeptid dem *Latency Associated Peptide* (LAP) gebunden ist. Dieses wiederum ist über Disulfidbrücken an das *latent TGF β binding Protein* (LTBP) gebunden¹⁷⁵. In dieser Form kann TGF β nicht mit den TGF β -Rezeptoren interagieren und ist somit inaktiv. Aktiviert wird TGF β durch eine Vielzahl an Proteasen (bspw. Plasmin, *Matrix Metalloproteinase 2* (MMP2)), nicht-protelolytischen Proteinen (bspw. Thrombospondin, Intergine), oder durch Umweltfaktoren wie einem sauren pH.

Nach Freisetzung bindet das aktive TGF β -Homodimer an den TGF β -Rezeptor 2 (TGFR2), wodurch eine Konformationsänderung induziert und der TGF β -Rezeptor 1 (TGFR1) rekrutiert wird. Bei beiden Rezeptoren handelt es sich um Transmembranproteine, welche sich aus einer Cystein-reichen extrazellulären Domäne, einer transmembranen Region und einer C-terminalen intrazellulären Domäne inklusive einer Serin/Threonin-Kinase zusammensetzen. Der TGFR1 wird bei Aktivierung von TGF β durch TGFR2 phosphoryliert, welcher daraufhin wiederum die sogenannten SMAD-Proteine aktiviert und phosphoryliert, womit die Signalkaskade in den Nukleus fortgesetzt werden kann¹⁷⁶. Neben TGFR1 und TGFR2 ist eine dritte Isoform der TGF β Rezeptor 3 bekannt. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen Transmembranrezeptor, allerdings besitzt dieser im Gegensatz zu TGFR1/2 keine enzymatische Aktivität. TGFR3 besitzt eine hohe Affinität zu allen drei TGF β -Formen und wurde initial als TGF β -Ko-Rezeptor identifiziert, der die Ligandenaffinität zwischen TGFR2 und TGF β erhöht. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass sich die Signalwirkung von TGFR3 weitaus komplexer darstellt. So kann beispielsweise die extrazelluläre Domäne abgespalten werden und als Antagonist von TGF β fungieren. Zudem wird eine Signaltransduktion über nicht-kanonische Signaltransduktionswege vermutet^{177,178}.

Die intrazellulären Signaltransduktionswege sind vielfältig, wobei zwischen den klassischen kanonischen und den nicht-kanonischen TGF β -Signaltransduktionswegen unterschieden wird. Als kanonische TGF β -Signaltransduktionswege werden die SMAD-abhängigen Signalkaskaden bezeichnet¹⁷⁹. Diese beginnen mit der Aktivierung von TGFR1/2, wobei sich jeweils zwei TGFR1 und zwei TGFR2-Proteine zu einem tetrameren Komplex zusammenlagern. Durch die Liganden-induzierte Konformationsänderung kommt es zur Phosphorylierung von TGFR1

durch TGF β 2, wodurch eine Interaktion und Phosphorylierung der zytoplasmatischen Proteine Smad2 und 3 induziert wird¹⁷⁸. Smad2/3 bilden daraufhin einen Komplex mit Smad4, welcher in den Zellkern transloziert und die Expression zahlreicher Gene reguliert¹⁷⁸. Smad 3 fungiert dabei als Transkriptionsfaktor, indem es an spezifische palindromische DNA-Sequenzen, sogenannte *Smad-bindings elements* (SBEs), bindet. Smad 2 und Smad 4 besitzen selbst keine direkten DNA-Bindungsstelle und agieren als Kofaktoren von Smad3. Die Bindung zwischen den Smad-Proteinen und dem SBE ist relativ schwach, sodass meist weitere Transkriptionsfaktoren zur Induktion der Genexpression benötigt werden¹⁸⁰. In Interaktion mit weiteren Korepressoren können Smads allerdings auch die Genexpression inhibieren. Neben den *Receptor-activated Smads* (R-Smads - Smad1,2,3, 5,8) und den *Common-mediator Smads* (Co-Smads – Smad4) konnten auch *Inhibitory-Smads* (I-Smads – Smad6,7) identifiziert werden¹⁷⁹. Smad7 stellt einen negativen Rückkopplungsmechanismus der TGF β /Smad-Signalkaskade dar, indem es u.a. die Bindung von Smad2/3 an TGF β 1 inhibiert¹⁷². Kompliziert werden die eben genannten Signalkaskaden durch eine Interaktion mit zahlreichen Kofaktoren, welche eine Zell- und Kontext-spezifische Genexpression ermöglichen. Darüber hinaus bedient sich TGF β neben den klassischen kanonischen Signaltransduktionswegen einer Vielzahl an weiteren Smad-unabhängigen Signalwegen um seine Funktionen auszuüben¹⁷⁹. So interagiert TGF β u.a. mit Kinasen der MAPK-Familie (*engl. Mitogen activated protein kinase*) wie der p38-MAPK, der *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) oder der *c-Jun-N-terminal kinase* (JNK). Weitere kommunizierende Regelmechanismen sind beispielsweise die Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswege, die transmembranen EGF-Rezeptoren (*engl. Epidermal growth factor receptor*) oder der auch als Tumorsuppressor bekannte Transkriptionsfaktor p53¹⁷⁹.

1.4 Zielsetzung der Arbeit und Hypothese

Bei den Kristallopathien handelt es sich um eine große, heterogene Gruppe an Erkrankungen, bei der durch Ablagerungen von Kristallen und Mikropartikeln im menschlichen Organismus schwere akute und chronische Organschäden verursacht werden. Kristallablagerungen in der Niere stellen eine häufige Pathologie dar und führen meist zu einer Schädigung des Nierenparenchyms. Hierbei entsteht eine kristall-induzierte Entzündungsreaktion und

konsekutive Fibrose des Nierengewebes. Nur für wenige kristall-induzierte Nephropathien existieren kausale und effektive Behandlungsstrategien. In vielen Fällen können den Patienten aktuell nur supportive Maßnahmen angeboten werden. Ziel der Forschung ist es daher die Pathomechanismen besser zu verstehen und gezielte Therapieansätze zu entwickeln.

In dieser Arbeit wurde als Modell der kristall-induzierten Nephropathie die chronische Oxalatnephropathie in C57Bl/6N-Mäusen, basierend auf einer enteral erhöhten Zufuhr von Oxalat, gewählt. Durch Kalziumoxalatkristallablagerungen in der Niere kommt es zum Verlust von Nephronen und einer renalen Entzündungsreaktion, sowie im Verlauf zu einer fulminanten Fibrose und zum chronischem Nierenversagen. Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte zeigten, dass Kristalle über diverse Pathomechanismen ihre zytotoxische Wirkung auf das umliegende Parenchym ausüben. Hierzu zählen eine kristall-induzierte Inflammation mit Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, Infiltration von Leukozyten sowie Nekrose von Tubuluszellen und Obstruktion von Gefäß- und Tubuluslumen. Dementsprechend sollte eine effiziente Therapie an verschiedenen Ebenen der Pathogenese eingreifen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Proteine wie das Tamm-Horsfall Glykoprotein, Osteopontin oder Nephrocalcin als Kristallisationsinhibitoren wirken. Wir postulierten daher, dass die Wahl eines Proteins eine Suppression der Kalziumformation bewirkt und damit einen protektiven Effekt auf das Nierenparenchym ausübt.

Kristalle verursachen über diverse Mechanismen eine Entzündungsreaktion. Zum einen werden Entzündungsmediatoren wie das NLRP3-Inflammasome aktiviert, wodurch die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β getriggert wird. Zum anderen induzieren Kristalle Nekroptose, wobei es zur Freisetzung von intrazellulären Molekülen kommt, welche als DAMPs fungieren und so einen sich selbst verstärkenden Nekroinflammationskreislauf induzieren.

Die anhaltende Entzündungsreaktion und Tubulusschädigung ist letztendlich mit einer schweren Fibrose und einem fortschreitendem chronischen Nierenversagen assoziiert. Wir nahmen daher an, dass eine Therapie mit einem anti-TGF β IgG-Antikörper zur Suppression der Entzündungsreaktion führt und vor allem hinsichtlich der renalen Fibrogenese einen protektiven Effekt zeigt. Ein fortschreitendes Stadium des chronischen Nierenversagen ist histopathologisch mit einer progredienten Fibrose assoziiert. In vielen Studien wird die Fibrose als Erfolgsparameter beziehungsweise primärer Endpunkt herangezogen. Letztendlich zeigten

bislang wenige Studien, inwiefern sich eine Inhibition der Fibrose auf die Nierenfunktion auswirkt. In dieser Arbeit soll als primärer Endpunkt, der für die Patienten prognostisch entscheidende Parameter, die GFR, herangezogen werden.

Leider werden im klinischen Alltag Patienten oft erst bei einem weit fortgeschrittenen CNV-Stadium vorstellig. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es daher herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt ein Therapiebeginn einen Therapieerfolg erzielen kann. Es wurde daher im Setting des langsam kontinuierlich fortschreitenden CNV-Modells der sekundären Hyperoxalurie ein präemptiver und ein verzögerter Therapiebeginn untersucht.

Die übergeordnete Hypothese dieser Arbeit lautet daher wie folgt:

Die Inhibition von TGF β mittels eines IgG-basierten Antikörpers inhibiert sowohl die Kalziumoxalatdeposition im Nierenparenchym als auch die Fibrogenese. Durch diesen synergistischen Effekt kann der Abfall der GFR verlangsamt werden. Entscheidend für den Therapieerfolg ist ein Therapiebeginn in einem bestimmten Zeitfenster.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiermodell

Versuchstiere

C57BL/6N, Wildtyp-Mäuse, männlich Charles River, Sulzfeld, D

Versuchstierhaltung

Makrolone Typ 2 Käfige	Techniplast, Hamburg, D
Oxalatreiches Futter	Sniff Spezialdiäten, Soest, D
Kalzium-freies Standardfutter	Sniff Spezialdiäten, Soest, D
Antikörper (1D11, 13C4)	Genzyme Corporation, Massachusetts, USA

GFR-Messung

Messgerät inkl. Photodiode & Batterie	MediBeacon™ Inc., Mannheim, D
FITC-Sinistrin	MediBeacon™ Inc., Mannheim, D
Isofluran-Narkosekammer	Harvard Anaesthesia System, UK
Leukoplast, Fixierpflaster	BSN medical GmbH, Hamburg, D
Rasierklängen	Wilkinson, USA
Skalpell	Pfammedicalag, Köln, D
Einmalkanüle Sterican	B.Braun AG, Puchheim, D
Feindosierungsspritze, 1ml	B.Braun AG, Puchheim, D
Sterile Multikompressen, 5x5cm	NOBA Verbandmittel, Wetter, D

Organentnahme

Anatomische Pinzette	Medicon, Tuttlingen, D
Skalpell	Pfammedicalag, Köln, D
EDTA	Calbiochem, San-Diego, USA
RNA-Later	Quiagen, GmbH, Hilden, D
Formaldehydlösung 18%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Histologische Färbungen

Aceton	Merck, Darmstadt, D
Alkohol 95%	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumpersulfat 0,02%	Bio-Rad, München, D
Antigen Unmasking Solution	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Diaminobenzidin	Merck, Darmstadt, D
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt, D
Formalin	Merck, Darmstadt, D
Gold-Chlorid-Lösung	Sigma-Aldrich, München, D
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, München, D
Histosette I, Einbettkassetten	Simport, Beloeil, Canada
Methylgrün	Fluka, Buchs, Schweiz
Mounting Medium Vecta Mount	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Natrium	
Nuclear Fast Red solution	Sigma-Aldrich, München, D
Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Paraffin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Periodsäure-Lösung 0,5%	Bio-Optica, Mailand, Italien
Schiffsche-Reagenz	Sigma-Aldrich, München, D
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Thiosemicarbazid	Sigma-Aldrich, München, D
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe, D
Xylol	Merck, Darmstadt, D

Antikörper

Alpha-SMA	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
CD3+	Serotec, Oxford, UK
F4/80	Serotec, Oxford, UK

Genexpressionsanalysen

RNA-Isolation

Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
PureLink™ RNA Mini Kit	Ambion Life Technologies, Darmstadt, D
RNAlater	Ambion Life Technologies, Darmstadt, D
RNase Free	Gene choice, Pelicanlifescience, San Diego, USA

cDNA-Synthese

Acrylamid	Ambion Life Technologies, Darmstadt, D
dNTPs 25mM	Fermentas, St.-Leon-Rot, D
First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Hexanucleotidmischung	Roche Diagnostics, Mannheim, D
RNAasin	Promega, Mannheim, D
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, D

Real-Time PCR

BSA	Fermentas, St.-Leon-Rot, D
MgCl ₂	Fermentas, St.-Leon-Rot, D
PCR-Optimizer	Bitop AG, Witten, D
RNAse freies Wasser	Fermentas, St.-Leon-Rot, D
SYBERgreen I	Fluka/Sigma, München, D
Taq-Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
Taq-Puffer 10x	Fermentas, St.-Leon-Rot, D

Primer

PCR-Primer	Metabion, Martinsried, D
------------	--------------------------

Tabelle 1: Eingesetzte murine Primersequenzen

Gen	Primersequenz
ACOX1	Forward 5'-CTTGGATGGTAGTCCGGAGA-3' Reverse 5'-TGGCTTCGAGTGAGGAAGTT-3'
Collagen1 α 1	Forward 5'-ACATGTTCACTTTGTGGACC-3' Reverse 5'-TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3'
Fibronectin-1	Forward 5'-GGAGTGGCACTGTCAACCTC-3' Reverse 5'-ACTGGATGGGGTGGGAAT-3'
IL-6	Forward 5'-TGATGCACTGCAGAAAACA-3' Reverse 5'-ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC-3'
iNOS	Forward 5'-GAGACAGGGAAGTCTGAAGCAC-3' Reverse 5'-CCAGCAGTAGTTGCTCCTCTTC-3'
KIM-1	Forward 5'-TCAGCTCGGGAATGCACAA-3' Reverse 5'-TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT-3'
PGC1 α	Forward 5'-AGTCCCATACACAACCGCAG-3' Reverse 5'-CCCTGGGGTCATTTGGTGA-3'
PPAR α	Forward 5'-TGCAAACCTGGACTTGAACG-3' Reverse 5'-GATCAGCATCCCGTCTTTGT-3'
18s RNA	Forward 5'-GCAATTATCCCCATGAACG-3' Reverse 5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'
TGF β 1	Forward 5'-CAACCCAGGTCCTTCCTAAA-3' Reverse 5'-GGAGAGCCCTGGATACCAAC-3'
TGF β 2	Forward 5'-CCGCATCTCCTGCTAATGTTG-3' Reverse 5'-AATAGCGGCATCCAAAGC-3'
TGF β R1	Forward 5'-GCTCCTCATCGTGTGTTGGT-3' Reverse 5'-CAGTGACTGAGACAAAGCAAAGA-3'
TGF β R2	Forward 5'-GCTGCATATCGTCCTGTGG-3' Reverse 5'-TCACATCGCAAAACTGCAC-3'

Durchflusszytometrie

AccuCheck Counting Beads	Thermo Fisher Scientific Inc.
Brefeldin A (Golgi Plug)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Bovines Serum-Albumin	Roche Diagnostics, Mannheim, D
DNase I	Sigma-Aldrich, München, D
FBS	Biochrom, Berlin, D
Fixations-/Permeabilisations-Puffer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Kollagenase	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Nykodenz	Axis-Shield, Dundee, UK
PBS	PAN-Biotech, Aidenbach, D
Permeabilisations-/Wasch-Puffer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Antikörper

APC anti-mouse F4/80	BioRad, München, D
FITC anti-mouse CD206	BD Biosciences, Heidelberg, D
PE/Cy5 anti-mouse CD45	BioLegend, Fell, D
V450 anti-mouse CD11b	BioLegend, Fell, D
PE anti-mouse Cx3CR1	BD Biosciences, Heidelberg, D
PE/Cy7 anti-mouse TGFβ1	BD Biosciences, Heidelberg, D

In chemico Versuchsreihen

Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumoxalat	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt, D

Kolorimetrische Assays

Creatinine FS	Diasys Diagnostic System, Holzheim, D
Urea FS	Diasys Diagnostic System, Holzheim, D
Oxalic Acid Colorimetric Assay Kit	LTA s.r.l., Mailand, Italien
Kalzium Colorimetric Assay	Sigma-Aldrich, München, D
Kalzium Colorimetric Assay Kits	Sigma-Aldrich, München, D

2.1.3 Geräte und Software

ELISA-Lesegerät

ELISA-Reader Tecan, GENios Plus Reader
ELISA Microplate-Washer ELx50 Washer
ELISA Platte HB

Tecan, Crailsheim, D
Biotek, Bad Friedrichshall, D
Sarstedt, Nürnbrecht, D

Mikroskope

Leica DMIL
Leitz DMRBE

Leica, Wetzlar, D
Leica, Wetzlar, D

Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit

Homogenizer ULTRA-TURRAX T25
Klebefolie
Light Cycler 480 Real-Time PCR
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer
Pure Link RNA mini kit Ambion
96-Schacht-Platten Lightcycler

IKA, Staufen, D
Roche, Basel, Schweiz
Roche, Basel, Schweiz
Peqlab Biotechnologie, Erlangen, D
LifeTechnologies, Carlsbad, USA
Sarstedt, Nürnbrecht, D

Waagen

BP110S
Mettler PJ 300

Sartorius, Göttingen, D
Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz

Zentrifugen

Heraeus, Minifuge T
Heraeus, Biofuge primo
Heraeus, Sepatech Biofuge A

VWR International, Darmstadt, D
Kendro Laboratory Products, Hanau, D
Heraeus Sepatech, München, D

Sonstiges

Deckgläser
Einbettkassetten
Eppendorf Tubes 1.5ml, 2ml
Falcons 15ml, 25ml
pH-Meter
Vortex Genie 2™
Wasserbad HI 1210

Menzel GmbH, Braunschweig, D
Simport, Boleoeil, Kanada
Eppendorf, Hamburg, D
TPP, Trasadingen, Schweiz
WTW, Weilheim, D
Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Leica, Bensheim, D

Software

AxioVision
Endnote X9
Prism 5.0
MPD Studio Software

Carl Zeiss AG, München, D
Thomson Reuters, Toronto, Kanada
GraphPad, La Jolla, USA
MediBeacon™ Inc., Mannheim, D

2.2 Methoden

2.2.1 In chemico Methoden

Herstellung von Kalziumoxalatkristallen

Die Herstellung der Kalziumoxalatkristalle erfolgte angelehnt an die Publikation von Thongboonkerd *et al.*³⁸ Zunächst wurde ein 10mM Tris-HCl Puffer hergestellt. Hierfür wurden 60,57 g TRIS in 500 ml doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst. Hiervon wurden 50ml entnommen und in 500ml ddH₂O gelöst. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt, sodass ein 10mM Tris-HCl Puffer entstand. Dieser wurde anschließend mittels Salzsäure auf einen pH von 7.3 titriert. Mithilfe dieser Lösung wurde nun eine 0,1mM Na₂C₂O₄ und eine 0,1mM CaCl₂ Lösung hergestellt. Zur Herstellung von Kalziumkristallen wurden 50µl jeder Lösung in einer 96-Well-Titerplatte pipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mikroskopisch zeigten sich im Wesentlichen 3 verschiedene Kristallformen (siehe Abbildung 4)^{38,181}.

- 1) COM klein: Kalziumoxalat-Monohydrat-Kristalle
- 2) COD: Kalziumoxalat-Dihydrat-Kristalle
- 3) COM groß: Kalziumoxalat-Monohydrat-Kristallduplets oder Triplets

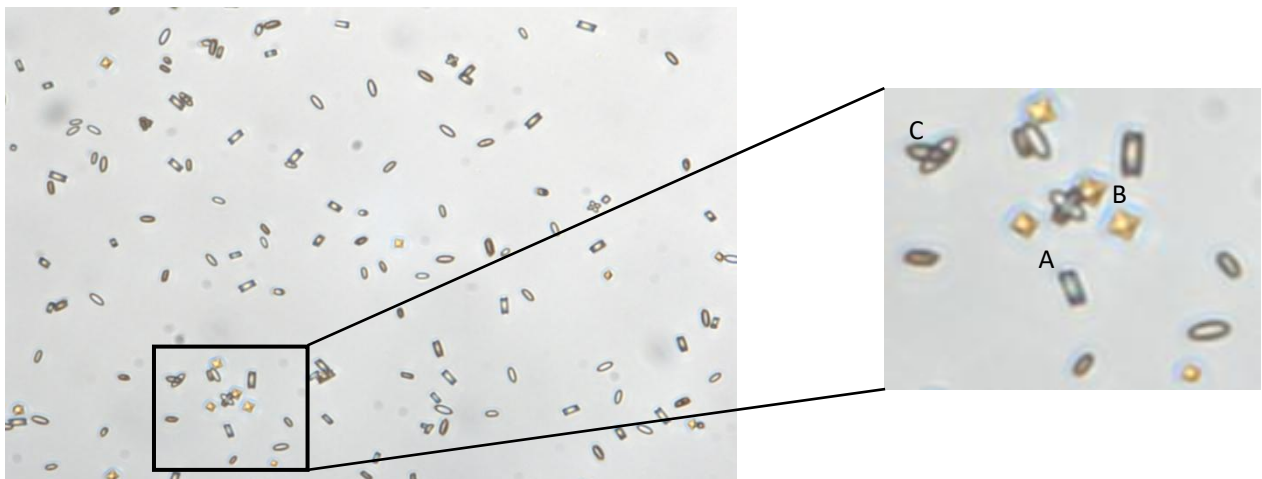


Abbildung 4: Kalziumoxalatkristallformen. Hier ist eine Photographie der hergestellten Kalziumoxalatkristalle abgebildet, vergrößert dargestellt durch ein Lichtmikroskop. In dem Ausschnitt rechts sind exemplarisch die drei häufigsten Kristallformen zu sehen: A) Kalziumoxalat-Monohydrat-Kristalle, B) Kalziumoxalat-Dihydrat-Kristalle, und C) Kalziumoxalat-Monohydrat-Kristallduplets.

Versuchsreihe zur Analyse des Effekts von Antikörpern auf die Kristallformation

Um den Einfluss des anti-TGF β -Antikörpers auf die Kristallbildung zu untersuchen, wurde die 0,1mM Natriumoxalat-Lösung ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) vor Zugabe der Kalziumchlorid-Lösung (CaCl_2) für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem anti-TGF β -Antikörper, der IgG1-Isotypenkontrolle und dem IgG F(ab') $_2$ Fragment des Antikörpers inkubiert. Alle Antikörper wurden in einer finalen Konzentration von 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugegeben. Die verschiedenen Kristallformen wurden zunächst mikroskopisch begutachtet, ausgezählt und zur besseren Quantifizierung mittels der Methode der Durchflusszytometrie analysiert (siehe Kapitel 2.2.5).

Versuchsreihe zur Analyse der Interaktion von Antikörpern und Oxalat

Um die Bindung sowohl des IgG1-Antikörpers als auch von murinen oder humanen Proteinen an Oxalat zu untersuchen wurde das lösliche Natriumoxalat mit BSA, IgG1 sowie humanem und murinem Serum inkubiert. In einer 96-Well-Titerplatte wurden zunächst 50 μl der 0,1mM Natriumoxalat-Lösung pipettiert. Anschließend wurde der IgG1-Antikörper hinzugefügt, sodass jeweils folgende Konzentrationen des Antikörpers erreicht wurden: 0.2, 0.4, 1.0, and 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IgG1. Darüber hinaus wurde das Natriumoxalat mit bovinen Serumalbumin (BSA) oder IgG1, jeweils in einer Konzentration von 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inkubiert. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die 0,1 mM Natriumoxatlösung mit dem IgG1-Antikörper(0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 5 μl murinem Serum oder mit beiden Substanzen gleichzeitig inkubiert. Zuletzt wurde die Natriumoxalat-Lösung mit einer steigenden Konzentrationsreihe von humanem Serum inkubiert. Hierzu wurden 50 μl der Natriumoxalat-Lösung jeweils 1 μl , 2 μl , 4 μl oder 5 μl von humanem Serum zugesetzt. Die Inkubation erfolgte in jeder Versuchsreihe bei 37°C über die Dauer einer Stunde. Anschließend wurde die Konzentration des freien Oxalats mit dem *Oxalic Acid Colorimetric Assay Kit* von LTA S.r.l. bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2.)

2.2.2 Tierexperimentelle Versuche

Für die Experimente wurden 8 Wochen alte C57BL/6N Mäuse von den Charles River Laboratories erworben. Die Tiere wurden unter pathogen-freien Bedingungen in Gruppen zu je 5 Mäusen aufgeteilt und in Käfigen mit uneingeschränktem Zugang zu Futter und vollentsalztem Wasser untergebracht. In den Käfigen befand sich zudem ein rotes

Plastikhäuschen, Einstreu und Nestwatte, welche ein bis zweimal pro Woche unter sterilen Bedingungen gewechselt wurden. Alle oben genannten Gegenstände und Nahrungsmittel wurden vor Gebrauch autoklaviert. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich nach den Kriterien der Regierung von Oberbayern evaluiert.

Die Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes wurden während der Durchführung der Experimente stets eingehalten. Alle Tierversuche wurden im Vorfeld der Studie (AZ: ROB-55.2-2532.Vet_02-15-189) durch die Regierung von Oberbayern auf Grundlage der EU-Richtlinie zum Schutz von Tieren, die zu wissenschaftlichen Zwecken benutzt werden (2010/63/EU), ausdrücklich genehmigt und in Übereinstimmung mit den ARRIVE-Leitlinien gemeldet ^{182,183}.

Studiendesign

Als Tiermodell der Oxalatnephropathie verwendeten wir das Modell der chronischen Oxalatnephropathie nach Knauf *et al.* ¹⁸⁴ / Mulay *et al.* ¹⁸⁵. Hierzu bekamen die Tiere über 2 Wochen hinweg eine Natriumoxalatreiche und Kalziumfreie Spezialdiät (Oxalatfutter). Das Futter enthielt kein Kalzium, da es im Darmlumen zu einer Ausfällung von Kalziumoxalat-Kristallen führt und folglich weniger freies Oxalat im Darm absorbiert wird ¹⁸⁴. Das Futter

Tabelle 2: Auflistung der Bestandteile des verwendeten Futters

Inhaltsstoffe	Menge	Oxalatfutter	Kontrollfutter
Rohprotein	17,7%	✓	✓
Rohfett	6,1%	✓	✓
Rohfaser	4,0%	✓	✓
Rohasche	2,4%	✓	✓
Stärke	31,1%	✓	✓
Zucker	33,8%	✓	✓
Kalzium	0,4%	✓	✓
Vitamin A	19800 U/kg	✓	✓
Vitamin D ³	2200 U/kg	✓	✓
Vitamin E	120 mg/kg	✓	✓
Vitamin K ³	45 mg/kg	✓	✓
Vitamin C	350 mg/kg	✓	✓
Kupfer	8 mg/kg	✓	✓
Natriumoxalat	50 mmol/kg	✓	✗

enthielt kein Kalzium, da es im Darmlumen zu einer Ausfällung von Kalziumoxalat-Kristallen führt und folglich weniger freies Oxalat im Darm absorbiert wird ¹⁸⁴. Das Kontrollfutter enthielt bis auf das Natriumoxalat dieselben Bestandteile. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 2 aufgelistet. Die Tierversuche wurden jeweils 5 Tage nach Ankunft der Tiere gestartet. Zum einen sollte den Tieren Zeit gegeben werden, um sich an die neue Umgebung zu gewöhnen und zum anderen wurde in diesen Tagen das Kontrollfutter gegeben, um mögliche Kalziumrückstände im Darm zu eliminieren ¹⁸⁵.

Studie I

Für den ersten Tierversuch wurden die Mäuse in 4 Gruppen à 5 Versuchstiere unterteilt: Die Interventionsgruppe erhielt Oxalatfutter und ab dem zweiten Tag alle 48 Stunden eine intraperitoneale (i.p.) Injektion mit einem murinen monoklonalen anti-TGF β Antikörper (1D11, *Genzyme Corporation, Sanofi, Framingham, MA, USA*). Insgesamt wurden 7 Injektionen verabreicht (siehe Abbildung 5). Bei 1D11 handelt es sich um einen TGF β Antikörper, welcher alle drei Isoformen des TGF β inhibiert ¹⁸⁶. Eine Kontrollgruppe erhielt ebenfalls Oxalatfutter und mit dem gleichen Injektionsschema den murinen monoklonalen IgG1 Antikörper 13C4, welcher als Isotypenkontrolle diente (siehe Abbildung 5). Beide Antikörper wurden freundlicherweise von *Genzyme Corporation* unentgeltlich zur Verfügung gestellt. Die dritte Gruppe erhielt ausschließlich Oxalatfutter und die vierte Gruppe das Kontrollfutter. Es gab zwei Versuchsreihen: die Erste wurde an Tag 7 und die Zweite an Tag 14 mit zervikaler Dislokation beendet. An Tag 0, 7 und 14 wurde jeweils die GFR gemessen, sowie Urin und Serumproben entnommen.

Studie II

In der zweiten Studie wurde die Therapie erst an Tag 7 gestartet (siehe Abbildung 5). Ansonsten wurde das bisherige Versuchsdesign beibehalten. Die Tiere wurden in 4 Gruppen zu je 5 Versuchstieren aufgeteilt. Eine Gruppe erhielt das Kontrollfutter. Die restlichen drei Gruppen wurden mit Oxalatfutter gefüttert. Zwei Gruppen erhielten zudem an Tag 7 alle 48 Stunden eine i.p.-Injektion mit dem anti-TGF β Antikörper 1D11 oder der zugehörigen Isotypenkontrolle 13C4 (siehe Abbildung 5).

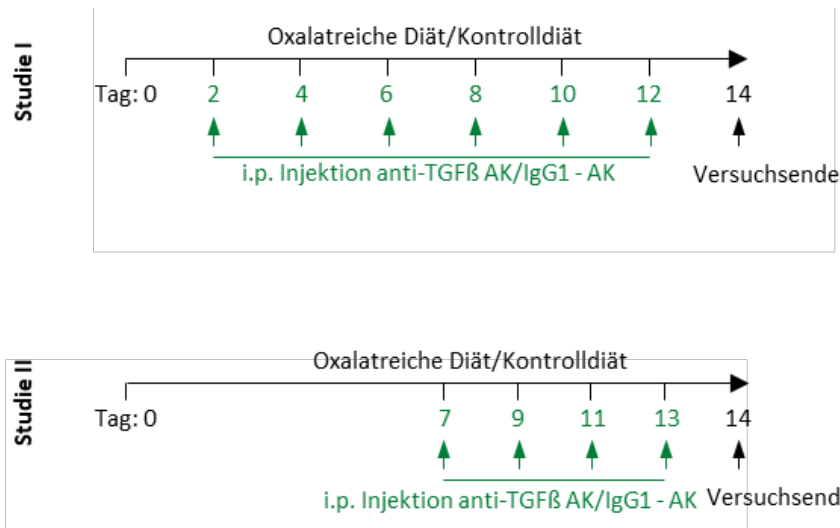


Abbildung 5: Mausmodell der chronischen Oxalatnephropathie. Schematische Darstellung des Studiendesigns.

Intravenöse Injektion

Die intravenöse Injektion der Antikörper erfolgt gemäß den Vorgaben der Regierung von Oberbayern in die Schwanzvene. Hierfür wurde die Maus in einer Narkosekammer mit 3% Isofluran und 4 L/min Sauerstoff narkotisiert. Anschließend wurde die Schwanzvene mithilfe eines Infrarot-Lichtes aufgesucht, mit einer 30G Nadel punktiert und das Volumen injiziert. Anschließend wurde die Stelle mit einer Kompresse komprimiert.

Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte jeweils bei Versuchsende. Hierbei wurden die Mäuse mithilfe von Isofluran-Gas in einer speziellen Narkosekammer anästhesiert. Mit einer heparinisierten Glaskapillare wurde der retrobulbäre Venenplexus punktiert. Das Blut tropfte hierüber ab und wurde in zwei verschiedenen 1,5ml Eppendorfgefäßen gesammelt. Eines der beiden Gefäße war mit 10µl EDTA gefüllt, das andere Gefäß war nicht präpariert und wurde unmittelbar nach der Blutentnahme zentrifugiert. Der Überstand, das Blutserum wurde dann in ein weiteres 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden jeweils bei -20°C gelagert oder direkt weiter prozessiert. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation euthanisiert.

Urinabnahme

Zur Gewinnung von Spontanurin fixierte man die Mäuse in der Hand indem man sie am Rückenfell griff und den Schwanz fixierte. Bei ausbleibender Spontanmiktion wurde die Blase

sanft massiert und der Urin mittels eines Eppendorfgefäßes aufgefangen. Zur Analyse der Kalzium- und Oxalatkonzentration wurde der Urin unmittelbar nach Gewinnung mit Salzsäure angesäuert. Hierbei wurde ca. 1µl Salzsäure für je 2ml Urin verwendet. Gelagert wurde die Probe vorübergehend bei -20°C.

Organentnahme

An Tag 14 wurden alle Versuchstiere in Studie I und II euthanisiert und die Nieren entnommen. Die folgenden Arbeitsschritte wurden in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt, welche zuvor mit 70% Ethanol desinfiziert wurde. Hierfür wurden die Tiere in einer Narkosekammer mit 3% Isofluran und 4L/min Sauerstoff euthanisiert. Mittels zervikaler Dislokation wurden die Tiere getötet und auf einem mit einem sterilen Abdecktuch bedeckten Styropor an den Extremitäten mit kleinen Nadeln befestigt. Anschließend wurde das Fell mit 70% Ethanol besprüht und die Bauchhaut, sowie das Peritoneum mittels Schere und Pinzette eröffnet. Im nächsten Schritt wurden die Nieren frei präpariert, am Nierenhilus durchtrennt und mit zwei Fingern wurde vorsichtig die Nierenkapsel abgezogen. Eine Niere wurde gedrittelt, wovon das Mittelstück für weitere histologische Untersuchungen in eine Kassette mit 4% Formalin gebettet wurde. Die anderen beiden Teile wurden für weitere RNA-Expressionsanalysen in ein Eppendorfgefäß mit 2ml RNA later platziert und bei -80°C gelagert. Die andere Niere wurde als Ganzes für die Durchflusszytometrie verwendet.

Transkutane Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

Die GFR wurde mit der Methode nach Schock-Kusch *et al.* bestimmt ¹⁸⁷. Diese Methode erlaubt die Erfassung der GFR an wachen, sich frei bewegenden Mäusen ohne Serum- oder Urinproben sammeln zu müssen. Dabei wurde transkutan die Eliminationsrate von Fluoreszenz Isothiocyanat (FITC) - Sinistrin gemessen, welches zuvor intravenös injiziert wurde. Sinistrin gehört wie Inulin zu der Gruppe der Polyfructosane, ist jedoch besser wasserlöslich und kann somit besser intravenös verabreicht werden ¹⁸⁷. In den bisher durchgeführten Tierversuchen in Ratten und Mäusen zeigte sich keine Toxizität oder Ablagerung in Organen ¹⁸⁸. Es wird ausschließlich glomerulär filtriert und es gibt keinen Hinweis für eine endogene Metabolisierung ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

Die Messung von FITC-Sinistrin erfolgte durch ein ca. 3cm x 1cm x 0,5cm kleines Detektionsgerät (siehe Abbildung 6, erworben bei MediBeacon™ Inc.), das mittels Pflaster und

Klebestreifen auf dem Mausrücken fixiert wurde. Dieses kleine Gerät bestand u.a. aus einer Licht-emittierenden Diode, die Licht mit einer Wellenlänge von 480nm emittiert und somit eine optimale Anregungswellenlänge für das Fluorochrom FITC darstellt. Dementsprechend enthielt es auch eine Photodiode, die Licht mit der Wellenlänge von 520nm detektiert, was dem Emissionsmaximum von FITC entspricht. Um die entsprechenden Wellenlängen zu selektieren, befanden sich vor den Dioden entsprechende Blau- bzw. Grün – Bandpassfilter. Die Signale wurden dann über einen Verstärker amplifiziert und schließlich digitalisiert¹⁹¹. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden in einer Sicherheitswerkbank mit einem Abzug und unter Verwendung von sterilen Abdecktüchern durchgeführt.

Zuerst wurde das Körpergewicht der Versuchstiere erhoben, da es später für die Berechnung der GFR benötigt wurde. Dann wurde die Maus eine Minute lang in eine Narkosekammer mit einem Gemisch aus 3% Isofluran und 4L/min Sauerstoff gelegt. Nun wurde der narkotisierten Maus mittels einer handelsüblichen Rasierklinge ein 2,5cm x 2cm Areal auf Höhe des Brustkorbs abrasiert, um das in Abb. 6 dargestellte Detektionsgerät ankleben zu können. Hierfür wurde ein doppelseitiger Klebestreifen, mit einem kleinen Fenster für die Dioden, an die Unterseite des Detektionsgerätes angebracht. Um dieses Konstrukt zu stabilisieren wurde der gesamte Brustkorb der Maus mit Leukoplast umwickelt ohne dabei die Bewegungsfreiheit der Maus zu beeinträchtigen. Kurz vor der Anbringung des Detektionsgerätes wurde die Batterie angebracht, sodass das Gerät mit der Aufzeichnung der Nulllinie startete. Fünf Minuten später wurde 150mg/kgKG FITC-Sinistrin (MediBeacon™ Inc.) intravenös injiziert. In

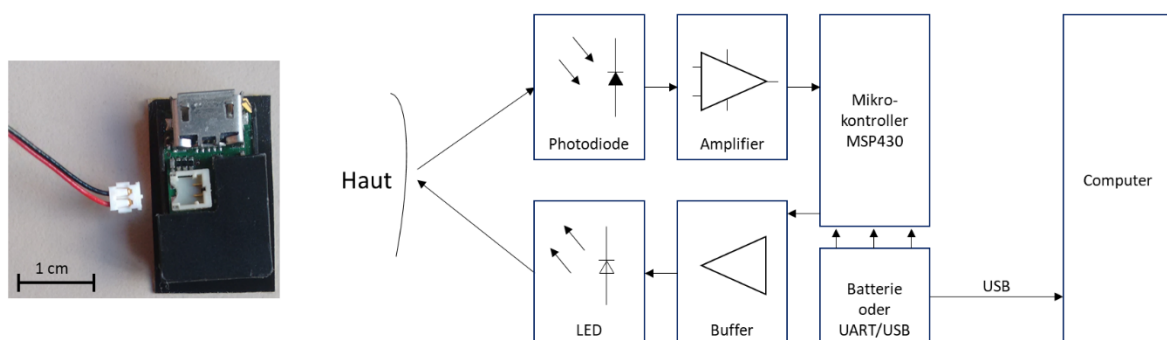


Abbildung 6: Transkutane GFR-Messung. Links ist eine Photographie des Miniaturgerätes zu sehen, welches die Photodiode, die LED-Lampe, den Mikrokontroller MSP 430 sowie den Amplifier und den Buffer enthält. Das rot/schwarze Kabel stellt die Verbindung zur Batterie dar. Beide Teile werden konnektiert und auf dem Rücken der Maus befestigt. Rechts ist eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus, Zeichnung adaptiert nach Schock-Kusch *et al.*¹⁸⁷.

den nächsten 90 Minuten wurden die Mäuse einzeln in sterilen Käfigen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Eine Einzelunterbringung war unerlässlich, da die Mäuse die Detektionsgeräte sonst beschädigt hätten. Zudem sollten sich keine Plastikhäuschen in den Käfigen befinden, da auch diese zu einer Beschädigung der Geräte oder Artefakten führen könnten. Nach eineinhalb Stunden wurden die Versuchstiere nochmals kurz narkotisiert um die Detektionsgeräte und Klebestreifen behutsam zu entfernen. Die Daten wurden am PC ausgelesen und mittels der MPD Studio Software (MediBeacon™ Inc.) analysiert. Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, steigt bei einer nierengesunden Maus kurz nach Injektion das Fluoreszenzsignal von FITC-Sinistrin sehr schnell an und fällt dann aufgrund der glomerulären Filtration innerhalb der folgenden 90 Minuten rasch auf das Ausgangsniveau ab¹⁹². Durch ruckartige Bewegungen der Maus kommt es zu Scherbewegungen zwischen dem Gerät und der Haut, was zu Artefakten führt. Um diese Signalschwankungen zu eliminieren, wurde zuerst eine lineare Korrektur durchgeführt und anschließend mit der oben genannten Software die Halbwertszeit des Fluoreszenzsignals bestimmt¹⁹³. Dabei wurde ein mathematischer Algorithmus verwendet, welcher nicht wie die bisherigen Analysemethoden, davon ausgeht, dass sich das FITC-Sinistrin ausschließlich im Plasma befindet, sondern stattdessen drei

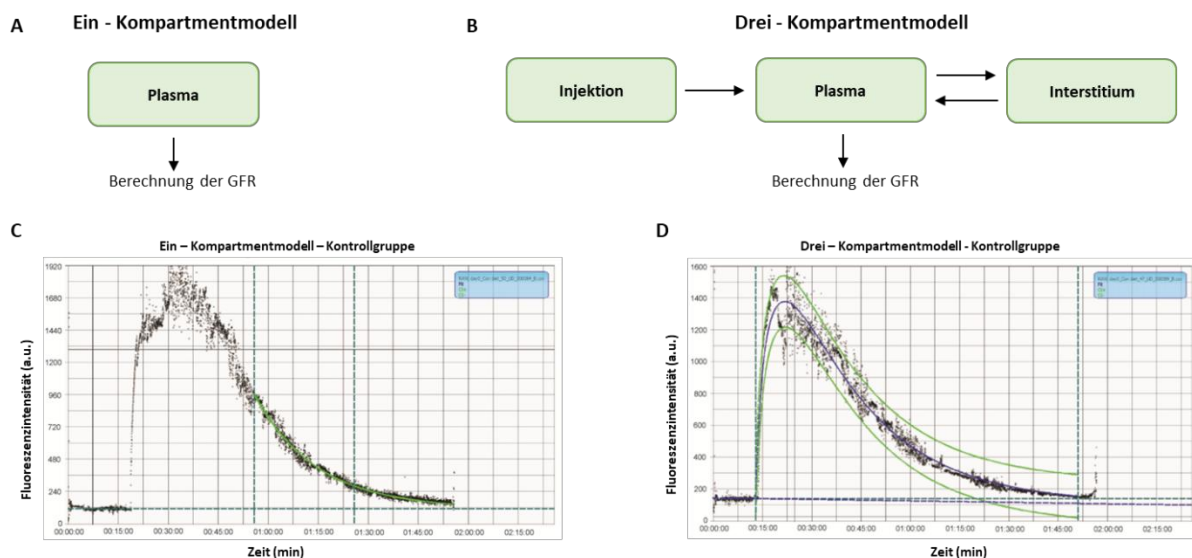


Abbildung 7: Modelle zur Berechnung der GFR. Über die Clearance von FITC-Sinistrin kann die GFR mithilfe von verschiedenen Modellen berechnet werden: A Das Ein-Kompartimentmodell geht von einer ausschließlichen Verteilung von FITC-Sinistrin im Plasma aus. B Das Drei-Kompartimentmodell mit linearer Korrektur berücksichtigt neben dem Injektionsprozess die Verteilung von FITC-Sinistrin im Plasma und im Interstitium. C, D Bei nierengesunden Mäusen steigt die FITC-Fluoreszenzintensität nach Injektion rapide an und fällt dann innerhalb von 90 Minuten durch die renale Clearance von FITC-Sinistrin rasch wieder ab.

Kompartimente berücksichtigt: den Injektionsprozess, den Intravasalraum und das Interstitium¹⁹³. Im letzten Schritt wurde anhand folgender Formel die GFR [$\mu\text{l}/\text{min}/100\text{gKG}$] aus der Halbwertszeit und unter Berücksichtigung des Körpergewichts ermittelt¹⁸⁷:

$$GFR [\mu\text{l}/\text{min}/100\text{gKG}] = \frac{14616 [\mu\text{l}/100\text{g KG}]}{t_{1/2}(\text{FITC-Sinistrin}) [\text{min}]}$$

Bestimmung der Nierenfunktionsparameter

Als klassische Nierenfunktionsparameter wurde der Kreatininspiegel und der Blut-Harnstoffstickstoff (BUN), also der an Harnstoff gebundene Stickstoff im Blut gemessen. Der Kreatininspiegel im Blutplasma wurde mit der Jaffé-Methode mithilfe des *Creatinin FS Kits* von DiaSys Diagnostic Systems bestimmt. Hierbei bildet Kreatinin mit der beigefügten Pikrinsäure einen orangeroten Komplex. Der Absorptionskoeffizient des jeweiligen Farbtönen ist proportional zur Kreatininkonzentration. Mit einer beigefügten Standardlösung wurde zunächst in einer 96-Kammerplatte eine Verdünnungsreihe pipettiert. Anschließend wurden je $10\mu\text{l}$ des Plasmas in jeweils eine Kammer der Platte pipettiert. Zur Herstellung des Mastermixes wurden das Reagenz 1 und 2 des Kits im Verhältnis 4:1 gemischt. Je $200\mu\text{l}$ dieser Lösung wurden dann zügig mit einer Mehrkanal-Mikroliterpipette in die mit Plasma und Standardlösung präparierten Kammern pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde der Absorptionskoeffizient bei 492nm nach 1 Minute (A1) und nach 2 Minuten (A2) in einem ELISA-Platten-Lesegerät gemessen. Die Veränderung des Absorptionskoeffizienten zu den Zeitpunkten A1 und A2 wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta A = [(A2 - A1) \text{ Serumprobe} / \text{Standard}] - [(A2 - A1) \text{ Leeraufnahme}]$$

Der Kreatinin-Serumspiegel wurde anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Kreatinin} \left(\text{mg}/\text{dl} \right) = \frac{\Delta A \text{ Serumprobe}}{\Delta A \text{ Standard}} \times \text{Standardkonzentration} \left(\text{mg}/\text{dl} \right)$$

Die BUN-Konzentration im Plasma wurden mithilfe des *Urea FS Kits* von DiaSys Diagnostic Systems gemessen, welches sich zur Messung des BUNs eine enzymatische Reaktion zu Nutze macht. Kurz zusammengefasst wird Harnstoff durch die Urease in Ammoniumionen und Hydrogencarbonat gespalten. Im Anschluss reagieren die Ammoniumionen und 2-Oxoglutarat zu L-Glutamat und Wasser. Bei dieser Reaktion wird NADH verbraucht, dessen Abfall bei der Messung des Absorptionskoeffizienten gemessen werden kann. Zu Beginn wurde eine

Verdünnungsreihe des beigefügten Standards in eine 96-Kammerplatte pipettiert. Danach wurden je 2µl des Blutplasmas in die jeweilige Kammer pipettiert. Zur Herstellung der Reaktionslösung wurden 4 Teile der Reagenz 1 mit einem Teil der Reagenz 2 gemischt. Jeweils 200µl dieser Reaktionslösung wurden in jede Kammer pipettiert und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1 Minuten (A1) und nach 2 Minuten (A2) wurde jeweils der Absorptionskoeffizient bei 360nm in einem ELISA-Platten-Lesegerät bestimmt. Der Wechsel des Absorptionskoeffizienten zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta A = [(A2 - A1) \text{ Serumprobe} / \text{Standard}] - [(A2 - A1) \text{ Leeraufnahme}]$$

Die BUN-Konzentration wurde wie folgt bestimmt:

$$BUN \left(\frac{mg}{dl} \right) = \frac{\Delta A \text{ Serumprobe}}{\Delta A \text{ Standard}} \times \text{Standardkonzentration} \left(\frac{mg}{dl} \right) \times 0,467$$

Messung der Oxalatkonzentration

Die Messung der Oxalsäure-Konzentration im Blut und im angesäuerten Urin wurde mit dem *Oxalic Acid Colorimetric Assay Kit* von LTA S.r.l. durchgeführt. Hierbei wurden 5µl des beigefügten Standards sowie jeweils 5µl der jeweiligen Probe in eine 96-Kammerplatte pipettiert. Im nächsten Schritt wurden die Reagenzien 1 und 2 des Kits im Verhältnis 1:1 gemischt. Von dieser Lösung wurden jeweils 100µl in eine Kammer pipettiert. Im letzten Schritt wurden 10µl des Reagenz 3 in jede Kammer pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei RT wurde der Absorptionskoeffizient bei 590nm gemessen. Die Konzentration der Oxalsäure wurde mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Oxalsäure [mM]} = \frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}}}{\text{Absorption}_{\text{Standard}}} \times 0,5$$

Messung der Kalziumkonzentration

Die Kalziumkonzentration im Urin wurde mithilfe des *Kalzium Colorimetric Assay Kits* von Sigma Aldrich gemessen. Bei diesem Assay bilden freie Kalzium-Ionen und o-Kresolphthalein einen Farbkomplex, dessen Absorptionswerte bei 575nm sich proportional zur vorliegenden Kalziumkonzentration verändern. Nach Angaben des Herstellers wurden 20µl der angesäuerten Urinprobe in eine Kammer pipettiert. Zudem wurde eine Verdünnungsreihe des

beigefügten Standards pipettiert. Anschließend wurde jede Kammer mit 50µl destilliertem Wasser aufgefüllt und 90µl der o-Kresolphthalein-Lösung beigefügt. Im nächsten Schritt wurden 60µl eines speziellen Puffers in jede Kammer pipettiert. Danach wurde die Platte vorsichtig geschwenkt, um die Reagenzien zu durchmischen und 10 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden mit einem ELISA-Platten-Leser die Absorptionswerte bei 575nm gemessen. Zur Bestimmung der Kalziumkonzentration wurde zunächst eine lineare Standardkurve der Verdünnungsreihe des beigefügten Standards angefertigt und über eine Regressionsgleichung konnten die Absorptionswerte in die zugehörigen Konzentrationen umgerechnet werden.

2.2.3 RNA-Expressionsanalysen

Zur Analyse der mRNA-Expressionsprofile wurde mRNA aus murinem Nierengewebe isoliert, in cDNA umgeschrieben und schließlich mithilfe der real-time Polymerasekettenreaktion (PCR) quantifiziert.

Murine RNA-Isolierung

Zunächst wurde ein Drittel der Niere in ein Eppendorf Tube transferiert, komplett mit einer RNA-later Lösung bedeckt und bei -80°C gelagert. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Probe aufgetaut und die mRNA wurde mithilfe des „Pure Link RNA Mini Kits“ von Ambion isoliert. Im ersten Schritt wurde ein kleines Stück (ca. 30mg) entnommen, in ein Eppendorf Tube mit 600µl des Lysis Buffers und 1% β-Mercaptoethanol transferiert und mittels des Homogenisators Ultra Turrax T25 20 Sekunden lang homogenisiert. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand (570µl) in ein Eppendorf Tube mit 570µl 70% Ethanol pipettiert und gut durchmengt. Die Lösung wurde auf eine spezielle Säule pipettiert, welche in ein Sammelröhrchen platziert wurde. Aufgrund ihrer Ladung blieb die mRNA bei der Zentrifugation in der Membran der Säule hängen und der Überstand wurde verworfen. Daraufhin wurde die Säule einmal mit „Wash Buffer I“ und zweimal mit „Wash Buffer II“ gewaschen. Im Anschluss wurde die Säule durch eine einminütige Zentrifugation bei 1100 rpm getrocknet. Die Säule wurde in ein neues Sammelröhrchen gesteckt und auf die Membran der Säule wurden 30µl RNA/DNA freies Wasser pipettiert, eine Minute lang bei Raumtemperatur

inkubiert und anschließend zentrifugiert. Durch das Hinzufügen von Wasser wurde die mRNA aus der Membran herausgelöst und befand sich nun im Sammelröhrchen. Die Konzentration der isolierten mRNA wurde mittels optischer Dichtemessung mit dem Thermo Scientific™ NanoDrop™ Spektralphotometer gemessen. Dabei wurde die optische Dichte bei 260nm und bei 280nm gemessen und der Quotient daraus gebildet. Es wurden nur Proben verwendet deren OD 260/ OD 280 zwischen 1.8 und 2.2 lag.

cDNA Herstellung

Im nächsten Schritt wurde die gewonnene RNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Der Vorteil der cDNA besteht darin, dass sie deutlich stabiler ist. Hierbei nutzten wir die Reverse Transkriptase, eine Polymerase welche RNA in DNA umschreibt. Zuerst wird 1µg mRNA in ein steriles Eppendorfgesäß pipettiert und mit Diethyl-Pyrokarbonat behandeltem Wasser auf eine Konzentration von 1µg/15µl verdünnt. Anschließend werden 7,45µl von einem Mastermix hinzugefügt. Dieser wurde zu Beginn angesetzt und bestand aus: 4,5µl 5 x First Strand Puffer, 1µl 0,1M Dithiothreitol (DTT), 0,45µl 25mM Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)-Mixtur, 0,5µl 40U/µl Ribonuklease-Inhibitor (RNasin), 0,25µl lineares Acrylamid, 0,25µl Hexanukleotide, 0,5µl SuperScript™ II Reverse Transkriptase (RT). Für die Negativkontrolle RT- wurde das SuperScript™ II Reverse Transkriptase (RT) weggelassen und das fehlende Volumen durch Wasser ersetzt. Im nächsten Schritt wurde die Lösung bei 42°C, 90 Minuten lang auf einem Thermoblock inkubiert. Um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurde die Lösung im Anschluss für 5 Minuten bei 90°C inkubiert. Zuletzt wurden die Eppendorfgesäße kurz zentrifugiert und schließlich bei -20°C gelagert.

Real-Time PCR

Die Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction) dient der Quantifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen. Dabei wird die gesuchte DNA-Sequenz mit entsprechenden Primern markiert und von Polymerasen amplifiziert. Die neu synthetisierten DNA - Doppelstränge können mithilfe des interkalierenden Farbstoffes Syber Green I quantifiziert werden. Im ersten Schritt wurde die gewonnene cDNA 1:20 mit DEPC-Wasser verdünnt. Als Nächstes wurde ein Mastermix hergestellt, der sich wie folgt zusammensetzte: 10µl 2X SYBR Green-Mix (10ml 2X SYBR Green-Mix: 2ml 10 x Taq-Puffer, 150µl dNTPs, 200µl BSA, 4ml PCR-Optimizer,

2,4ml MgCl₂, 40 µl SYBR Green, 1,21ml Wasser), 0,16µl TaqPolymerase, 0,6µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer und 6.64 µl Wasser. Von diesem Mastermix wurden in jedes Well 18µl sowie 2µl cDNA pipettiert. Als Kontrollen wurden die RT- Kontrolle und Wasser verwendet. Daraufhin wurde die Platte mit einer durchsichtigen Folie bezogen und kurz zentrifugiert, damit sich alle Reagenzien gleichzeitig auf dem Boden der PCR-Platte vermengen. Die Real-Time PCR wurde mit dem LightCycler480 durchgeführt. Das gewählte Programm umfasste 45 Zyklen, welche sich jeweils in drei Phasen gliederten: die Denaturierungsphase bei 95°C, die Annealingphase bei 60°C und die Amplifikationsphasen bei 72°C. Die Expressionen wurde mithilfe des CT (cycle threshold) - Wertes bestimmt. Dies ist der Zyklus, bei welchem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Zur Datenanalyse wurde die relative Expression berechnet. Dabei wurde die Expression des zu untersuchenden Gens in Relation zum sog. *Housekeeping* Gen 18S gesetzt und mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Relative Expression}_{\text{Probe}} = 2^{-(\text{CT}_{18\text{S}} - \text{CT}_{\text{Probe}})}$$

Die verwendeten Primer wurden alle bei Metabion (Metabion, Martinsried, Deutschland) erworben und vor Durchführung der PCR mittels Schmelzkurven auf Spezifität geprüft.

2.2.4 Durchflusszytometrie

In der folgenden Arbeit wurde die Methode der Durchflusszytometrie zur Charakterisierung der Makrophagenpopulation sowie zur Identifikation der verschiedenen Kristallformen angewandt. Für die Immunphänotypisierung wurde das FACSCanto II eingesetzt, während für die Charakterisierung der Kristallformen das BD FACSCalibur verwendet wurde.

Immunphänotypisierung

Die Analyse mittels Durchflusszytometrie erfordert zunächst die Herstellung einer Einzelzellsuspension. Hierfür wurde eine Niere direkt nach Entnahme in eine 6-Well-Titerplatte transferiert und mit 2ml einer Kollagenase /DNase I -Lösung (2mg/ml Kollagenase, 1000U/ml DNase I) bedeckt. Im nächsten Schritt wurde das Nierengewebe mit Hilfe des Gummiaufsatzes einer 1ml Spritze zerdrückt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit einer 2ml Spritze aufgezogen und viermal durch eine 20G Nadel gedrückt. Dann wurde die Suspension durch einen 70µm Filter in ein 15ml Falcon

gefüllt. Der Filter wurde mit ca. 8ml PBS gewaschen. Nach einer 5- minütigen Zentrifugation bei 1500 rpm wurde der Überstand dekantiert und das verbleibende Zellpellet erneut in 10ml PBS suspendiert und noch einmal gefiltert. Zur Isolation der Leukozyten wurde eine Nykodenz-Lösung verwendet, wodurch mithilfe eines Dichtegradienten die Immunzellen von Nierengewebe und Kalziumoxalatkristallen getrennt wurden. Hierfür wurde das Zellpellet in 5ml der Nykodenz-Lösung suspendiert und vorsichtig mit 2ml PBS aufgefüllt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 520 g entstand ein abgrenzbarer Leukozytenfilm zwischen den beiden Lösungen, während die Nierenzellen am Boden des Zentrifugationsröhrchens verblieben. Der Leukozytenfilm wurde vorsichtig abpipettiert und nach einem erneuten Waschschrift mit FACS-Puffer (0.1% BSA, 0.01% Natriumazid in PBS) in 2ml FACS-Puffer suspendiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an Fc-Rezeptoren von Leukozyten zu verhindern, wurden 100µl der Zellsuspension für 5 Minuten mit 1,4µl eines Fc-Rezeptor Blocks (CD16/CD32) inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit FACS-Puffer konnten die Zellen schließlich mit den gewünschten Oberflächen-Antikörpern gefärbt werden. Zunächst wurde jede Probe in folgende 3 Fraktionen aufgeteilt: 1) eine Fraktion für die Färbungen, 2) eine weitere Fraktion für die Zellzählung mittels Counting Beads und 3) ein Teil zur Bestimmung der Autofluoreszenz. Die Röhrchen 2) und 3) konnten vorerst auf Eis gestellt werden, während nun die erste Fraktion mit folgenden Antikörpern für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert wurde: PE/Cy5 CD45, V450 CD11b, APC F4/80, FITC CD206 und Cx3CR1. Im Anschluss erfolgte ein Waschschrift mit PBS zur Entfernung von überschüssigen Antikörpern. Des Weiteren wurde für jeden Antikörper eine einzelne Probe verwendet, welche nur mit diesem Antikörper gefärbt wurde. Dadurch konnten später bei Aufnahme die Signale der

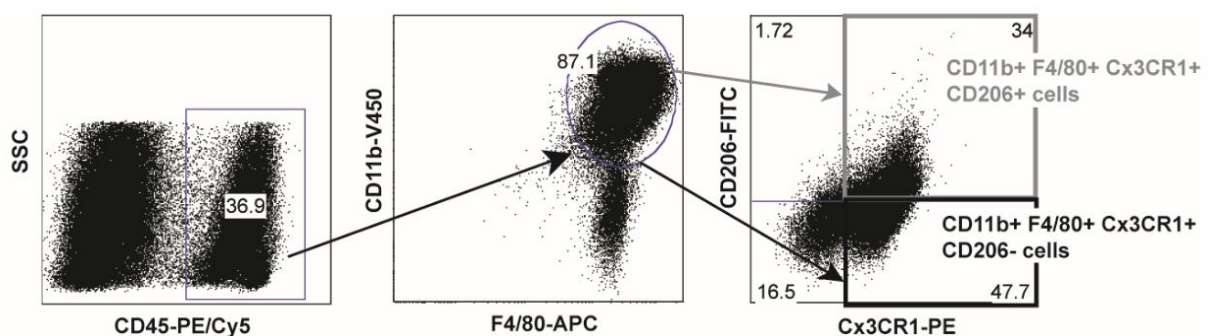


Abbildung 8: Gating-Strategie zur Phänotypisierung der Makrophagenpopulation. Zunächst wurden die CD45-positiven Zellen identifiziert. Anschließend wurden aus dieser Population die CD11b-, F4/80- und Cx3CR1-positiven Zellen selektiert. Die Zellpopulation, welche zusätzlich den Oberflächenmarker CD206 aufwies, wurde als M2-Makrophagenpopulation deklariert und die CD206-negativen Zellen als M1-Makrophagen definiert.

verschiedenen Fluorochrome voneinander abgegrenzt werden. Zuletzt erfolgte die intrazelluläre Färbung mit TGF β , wobei zunächst die Freisetzung von intrazellulären Zytokinen mit Hilfe von Brefeldin A (GolgiPlug) inhibiert wurde, um die Detektionsrate von intrazellulärem TGF β zu erhöhen. Hierfür wurde das Zellpellet mit 1,4 μ l der GolgiPlug-Lösung für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Als nächstes erfolgte ein Waschschriff mit 200 μ l FACS-Puffer und anschließend wurde das Zellellet in 100 μ l eines Fixations/Permeabilisations-Puffers suspendiert und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Dadurch wurden die Zellen zum einen durch vernetzte Proteine fixiert und zum anderen werden Löcher in der Membran verursacht, sodass der intrazelluläre Antikörper eindringen kann. Im Folgenden wurden die Zellen mit einem Permeabilisations/Wasch-Puffer gewaschen und schließlich für 40 Minuten bei 4°C im Dunkeln mit PE/Cy7 TGF β 1 inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen und letztendlich in 1ml FACS Puffer rekonstituiert. Die Proben für die Zellzählung wurden in 100 μ l FACS Puffer rekonstituiert und kurz vor Messung wurden 100 μ l der Accu Check Counting Beads hinzugefügt. Die absoluten Zellzahlen wurden gemäß Herstellerangaben kalkuliert. Zuerst wurden die Röhrchen mit den Einzelfärbungen aufgenommen um Signale der verschiedenen Fluorochrome voneinander trennen zu können. Vor Analyse der gefärbten Proben wurden zunächst die ungefärbten Proben aufgenommen, um ggf. starke Autofluoreszenzen minimieren zu können. Trotz der Filterung und der Separation mittels Nykodenz verblieben in den Proben meist Nierenparenchymzellen, tote Zellen und vereinzelt Kristalle, welche jeweils eine starke Autofluoreszenz zeigen. Damit das Signal der Fluorochrom-markierten Antikörper nicht durch diese Autofluoreszenz überlagert wurde, musste ggf. die Leserintensität durch Anpassung der Spannung verringert werden. Die erhobenen Daten wurden mit der Software FlowJo 8.7 analysiert. Die Gating-Strategie ist in Abbildung 8 dargestellt.

Quantifizierung der Kalziumoxalatkrystallformen

Zur Quantifizierung der verschiedenen Kalziumoxalatkrystallformen COM klein, COM groß und COD wurde die Methode der Durchflusszytometrie angewandt. Wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben wurden die verschiedenen Ansätze in 2 Fraktionen aufgeteilt: 1) Beads 2) ohne Beads. Aufgrund der starken Autofluoreszenz von Kristallen war keine Färbung nötig. Anhand der Größe und dem Verhalten im SSC konnten die Signale im Punktdiagramm den

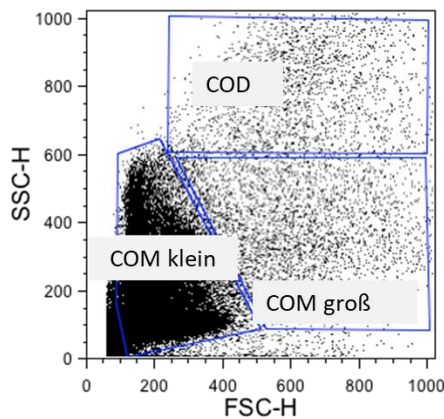


Abbildung 9: Identifikation der verschiedenen Kristallformen mittels Durchflusszytometrie. Im linken unteren Quadranten befinden sich die kleinsten Kristalle die Calciumoxalat-Monohydrat-Kristalle. Rechts daneben finden sich die COMs, welche sich zu Duplets und Triplets zusammengelagert hatten. Im oberen Bereich des Punktdiagramms befinden sich die Calcium-Dihydrat-Kristalle.

verschiedenen Kristallformen (siehe Kapitel 2.2.1) wie in Abbildung 9 zu sehen, zugeordnet werden.

2.2.5 Histologische Färbungen

Unmittelbar nach Entnahme der Nieren wurde das Mittelstück in eine Kassette mit 4% Formalin gebettet und über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einen Gewebeautomaten überführt und zur Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie in Xylol inkubiert. Zuletzt wurden die Gewebeschnitte in flüssiges Paraffin eingebettet. Nach Erstarren des Paraffinblocks wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms 2µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden nun auf einen Objektträger gelegt, welcher zuvor mit 100% Aceton und einer 0,02%-igen Ammoniumpersulfat-Aceton-Lösung entfettet worden war. Nach einer 12-stündigen Inkubation bei 37°C im Trockenschrank wurde der Objektträger vor jeder Färbung mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert.

Periodic Acid Schiff-Färbung

Zur histologischen Beurteilung des Tubulusschadens wurde eine PAS-Färbung angefertigt. Mit der PAS-Färbung werden Moleküle mit Aldehydgruppen wie beispielsweise Glykoproteine, Polysaccharide, Mukopolysaccharide oder Glykolipide nachgewiesen ¹⁹⁴. Zuerst wird der Objektträger für 5 Minuten in 0,5%-iger Periodsäure inkubiert und danach mit Wasser gewaschen. Hierbei werden 1,2-Glykole zu Aldehydgruppen oxidiert. Danach wird der Objektträger für 5 Minuten mit der Schiffschen Reagenz inkubiert. In diesem Schritt reagieren die benachbarten Aldehydgruppen mit der Fuchsin-schwefligen Säure und bilden so die typisch

rosa-violette Farbe aus. Anschließend wurden die Präparate für 2 Minuten mit lauwarmem Wasser gewaschen und zur Anfärbung der Kerne für 2 Minuten mit Hämatoxylin gefärbt. Zuletzt wurden die Objektträger kurz in 95% Alkohol getaucht und mit VectaMount™ eingedeckelt.

Kalziumoxalatfärbung nach Pizzalato

Um die Kalziumoxalatkristalle im Nierengewebe zu quantifizieren wurde die Kalziumoxalatfärbung nach Pizzalato durchgeführt¹⁹⁵. Zu Beginn wurden die entparaffinierten Schnitte mit einer Lösung aus 5%-igem Silbernitrat und 30%-igem Wasserstoffperoxid bedeckt und mit einer 60 Watt Glühbirne aus ca. 15 cm Entfernung bestrahlt. Hierbei reagierte CaOx mit Silbernitrat zu Silberoxalat. Es folgte ein Waschschriff mit Wasser und eine Gegenfärbung mit Kenrechtrot, wobei die Präparate für 5 Minuten in Nuclear Fast Red-Lösung inkubiert wurden. Zum Schluss wurde das Präparat mit einer aufsteigenden Ethanolreihe sowie Xylol entwässert und mit VectaMount™ eingedeckelt.

Immunhistochemische Färbungen

Zur Färbung des Bindegewebes (α -SMA) sowie von infiltrierenden Leukozyten (CD3 für T-Zellen, F 4/80 für Makrophagen) wurden immunhistochemische Färbungen eingesetzt. Zuerst wurden die entparaffinierten und rehydrierten Präparate für 20 Minuten im Dunkeln bei RT in einer Lösung aus 30%-igem Wasserstoffperoxid und Methanol inkubiert. Dieser Schritt diente der Inaktivierung der endogenen Peroxidasen. Nach einem Waschschriff mit PBS erfolgte die Demaskierung des jeweiligen Antigens. Hierfür wurden die Objektträger in eine 1%-ige Antigen Unmasking Solution getaucht, welche zuvor für 10 Minuten in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht und anschließend autoklaviert wurde. Zur Blockierung von endogenem Biotin wurde das Präparat für 15 Minuten mit Avidin inkubiert, mit PBS gewaschen und dann für 15 Minuten mit Biotin inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Nach der Inkubation wurden die Schnitte zweimalig für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurde der Gewebeschnitt für 1 Stunde bei RT oder über Nacht in einer feuchten Kammer mit dem primären Antikörper inkubiert, mit PBS gewaschen und schließlich für 30 Minuten mit dem sekundären biotinyliertem sekundären Antikörper inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Nun konnte das Präparat für 30 Minuten mit einer

ABC-Lösung inkubiert werden, wodurch der an Peroxidase gekoppelte Avidin-Biotin Komplex an den sekundären Antikörper binden konnte. Die Färbung entstand durch Zugabe von Diaminobenzidin, 8%-igem Nickelchlorid und 3%-igem Wasserstoffperoxid. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Methylgrün und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol wurde die überschüssige Farbe entfernt. Zuletzt wurde der Gewebeschnitt mit VectaMount™ eingedeckelt.

Jones Methenamin Silberfärbung

Für die Durchführung der Jones Methenamin Silberfärbung wurden die entparaffinierten, rehydrierten Präparate zunächst für 15 Minuten in 1%-iger Periodsäure inkubiert, anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und dann für 5 Minuten mit 0,5%-iger Thiosemicarbazid-Lösung bedeckt. Im Anschluss daran erfolgte eine ca. 10-minütige Inkubation in 63°C warmer Silber-Methenamin Lösung. Diese Lösung musste bei jeder Färbung frisch aus 55ml Methenamin Lösung, 2,8ml Silberlösung und 6,6ml Natrium-Borat Lösung hergestellt werden. Danach wurden die Präparate für 15 Minuten in Gold-Chlorid Lösung eingetaucht und für 1 Minute in einer Hydrogennitrat-Formaldehyd Lösung inkubiert. Zur Fixation wurden die Schnitte für 10 Minuten mit einer Natrium-Borat Lösung bedeckt. Zuletzt erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin, indem die Schnitte zuerst 2 Minuten mit einer Hämatoxylin Lösung inkubiert und anschließend 10 x in eine Eosin-Lösung getaucht wurden. Zwischen jedem der aufgeführten Färbeschritte erfolgte mindestens ein Waschschrift mit destilliertem Wasser. Nun konnten die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol rehydriert und eingedeckelt werden.

Histologische Auswertung

PAS-Färbung: Zur Auswertung der PAS-Färbungen wurden 10-15 repräsentative Ausschnitte in 200-facher Vergrößerung nach drei Kategorien beurteilt: 1) dem Anteil nekrotischer Tubuli 2) dem Anteil dilatierter Tubuli und 3) dem Anteil an Tubuli mit Castformation. Der prozentuale Anteil am gesunden Nierengewebe wurde abgeschätzt und der Schaden anhand von folgendem numerischen Score semi-quantitativ ausgewertet.

Tabelle 3: Quantifizierung des Tubulusschadens

Score	Tubulusschaden	
0	0 – 10%	Prozentualer Anteil von nekrotischen Tubuli, dilatierten Tubuli und Castformation am gesunden Nierengewebe
1	11 – 20%	
2	21 – 40%	
3	41 – 60%	
4	61 – 80%	
5	81 – 100%	

Immunhistochemische Färbungen, Kalziumoxalatfärbung, Silbernitratfärbung: Für die semi-quantitative Auswertung wurden zunächst lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt und anschließend mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ bearbeitet. Je nach Färbung wurden hierbei unterschiedliche Vergrößerungen gewählt. Zu Beginn wurde das Bild mit ImageJ in seine 8-bit Form konvertiert. Im nächsten Schritt wurde ein Farbbereich festgelegt, in welchem ein Bildpunkt als gefärbt gewertet wird. Nun konnte der prozentuale Anteil von gefärbten Bildpunkten an nicht-gefärbten Bildpunkten berechnet werden. Je nach gewählter Vergrößerung wurden 3 bis 5 Aufnahmen pro Niere angefertigt. Zudem wurden alle Aufnahmen in einer Sitzung mit exakt denselben Einstellungen aufgenommen. Sämtliche histologischen Auswertungen wurden von einem unabhängigen Begutachter durchgeführt, welcher pseudonymisierte histologische Slides erhielt.

2.2.6 Magnetresonanztomographie

Zur bildmorphologischen Beurteilung der Nieren wurde post mortem eine Magnetresonanztomographie durchgeführt. Hierfür wurde von jeweils 4 Tieren der Interventionsgruppen, welche den anti-TGF β Antikörper oder die IgG1-Isotypenkontrolle erhalten hatten, eine Niere entnommen und in ein 1,5%-iges Agarose Gel überführt. In einer Ganzkörperspule wurden Aufnahmen im *ClinScan 7 T* (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany), einem 7-Tesla Kernspintomographen, speziell für Kleintiere, angefertigt. Neben den üblichen

Standardsequenzen zur Beurteilung der Morphologie wurde auch die Längsrelaxationszeit T1 und die Querrelaxationszeit T2 farblich lokal dargestellt. Dabei wurde jeweils der Kortex, sowie das äußere und innere Mark einzeln ausgewertet. In neuen Studien konnte gezeigt werden, dass eine verlängerte Längsrelaxationszeit T1 mit einer Vermehrung an Bindegewebe assoziiert ist, während eine verlängerte Querrelaxationszeit T2 in entzündetem Gewebe beobachtet werden konnte ^{196,197}. Die Analyse der Relaxationszeiten und die farblich graphische Darstellung wurden mit der Software Osirix durchgeführt.

2.2.7 Statistik

Die Auswertung der Daten wurde mit der Prism 5.0 GraphPad-Software durchgeführt. Jede Interventions- oder Kontrollgruppe setzte sich aus je 5 Versuchstieren zusammen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Der Kolmogorov-Smirnov Test wurde angewandt, um eine Normalverteilung der Daten zu ermitteln. Bei einem p-Wert von $<0,05$ wurde das Ergebnis als statistisch signifikant gewertet. Der jeweilige p-Wert wurde graphisch wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Bei Vergleich der Mittelwerte von zwei Gruppen wurde der Student's t-Test herangezogen. Um mehrere Gruppen zu vergleichen, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse one-way ANOVA (analysis of variance) mit der Bonferroni-Korrektur angewandt. Bei Vergleich der Gruppen über verschiedene Zeitpunkte hinweg wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse two-way ANOVA unter Einbeziehung des Schnelltests nach Tukey eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte der IgG - Antikörper auf die Kristallformation in chemico

Bei der Behandlung der kristall-induzierten Nephropathien ist ein wichtiger Bestandteil des Therapieregimes die Prävention und Inhibition weiterer Kristallablagerungen im Nierenparenchym. Die Kalziumoxalatkristallformation wird durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst. Neben Faktoren wie dem pH-Wert und der Konzentration der jeweiligen Ionen spielen Makromoleküle wie Oberflächenrezeptoren, Proteine oder Phospholipide eine wichtige Rolle^{38,37}. Im ersten Schritt untersuchten wir den Einfluss von IgG - Antikörpern auf die Formation von Kalziumoxalatkristallen *in chemico*.

Hierfür wurde vor Mischung der Natriumoxatlösung ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) und der Kalziumchloridlösung (CaCl_2), die Natriumoxatlösung jeweils mit dem anti-TGF β Antikörper 1D11 oder der IgG1 - Isotypenkontrolle 13C4 inkubiert. Anschließend wurden die Kristalle unter dem Lichtmikroskop begutachtet und danach mittels Durchflusszytometrie quantifiziert und klassifiziert. Wie bereits unter 2.2.1 erläutert, kristallisieren Kalziumoxalatkristalle im Wesentlichen in drei Formen: kleine Kalziumoxalat-Monohydrat Kristalle (COM), große Kalziumoxalat-Monohydrat-Kristallduplets oder Triplets und Kalziumoxalat-Dihydrat Kristalle (COD) (siehe Abbildung 4). In diesem Assay bilden sich vorrangig COM-Kristalle (siehe Abbildung 4). Dies stellt auch die häufigste Kristallform dar, die *in vivo* aus Steinanalysen von Patientenkohorten isoliert werden konnte¹⁹⁸. Die verschiedenen Kristallformen konnten in der Durchflusszytometrie anhand ihrer Größe und der spezifischen Beugung des Laserstrahls mittels dem *Side scatter* (SSC) und dem *Forward scatter* (FSC) unterschieden werden. Die größte Population der COM Kristalle findet sich hierbei im linken unteren Quadranten des Punktdiagramms (siehe Abbildung 10B). Die quantitativen Auswertungen zeigten, dass nach Inkubation mit dem anti-TGF β Antikörper 1D11 und der IgG1-Kontrolle 13C4 deutlich weniger Kristalle nachweisbar waren (siehe Abbildung 10B). Sowohl die Anzahl der kleinen COM-Kristalle, als auch die Formation der großen COM-Kristalle und der COD-Kristalle war signifikant rückläufig¹⁹². Um diesen Prozess besser verstehen zu können wurde zudem die Natriumoxatlösung mit einem fragmentierten IgG F(ab')₂ -Antikörper, also lediglich dem antigenbindenden Anteil des IgG-Antikörpers, inkubiert. Die Kristallformation von kleinen und

großen COM- sowie COD-Kristallen konnte auch hier signifikant supprimiert werden. Interessanterweise zeigte sich zwischen den verschiedenen Antikörpern und den Antikörperfragmenten kein Unterschied bei dem Ausmaß der Inhibition der Kristallbildung (siehe Abbildung 10B). Zusammenfassend konnte die Kristallformation *in vitro* sowohl durch den anti-TGF β Antikörper 1D11 als auch durch die IgG1 - Isotypenkontrolle 13C4 und dem fragmentierten IgG F(ab')₂ -Antikörper signifikant inhibiert werden. Unterschiede zwischen

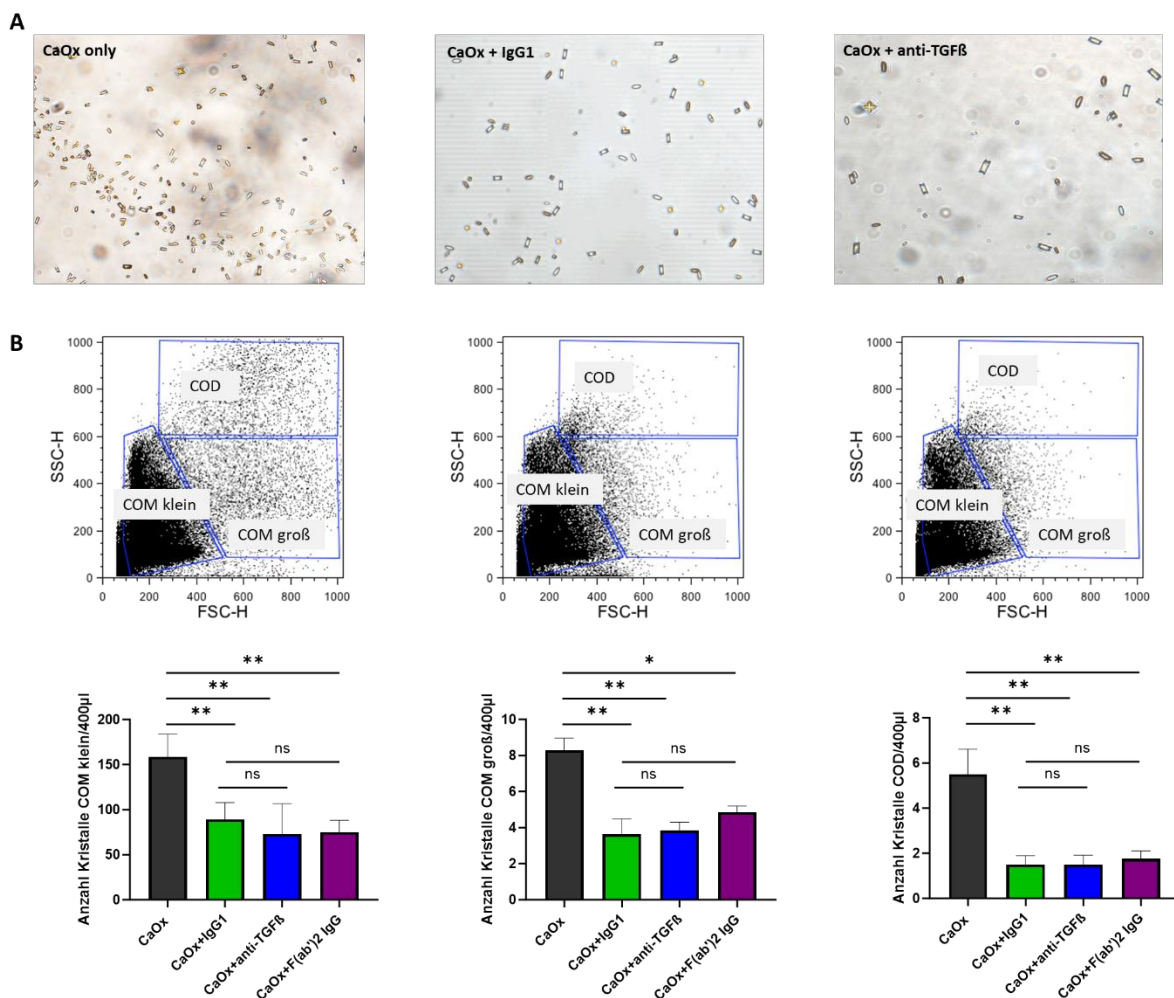


Abbildung 10: Inhibition der Kalziumoxalatkrystallformation durch IgG1-Antikörper in chemico. Zur Herstellung von Kalziumoxalatkrystallen wird Natriumoxalat ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) mit Kalziumchlorid (CaCl_2) gemischt, wobei es zur Ausfällung von verschiedenen Kristallformen (COM klein, COM groß, COD) kommt. In dieser Versuchsreihe wurde das Natriumoxalat vor Zugabe von Kalziumchlorid jeweils 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem anti-TGF β Antikörper (CaOx + anti-TGF β), dessen Isotypenkontrolle (CaOx + IgG1) oder dem IgG F(ab')₂ Fragment-Antikörper (CaOx + IgG F(ab')₂) inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen Kristalle unter dem Lichtmikroskop visualisiert (A). Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen Kristallformen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (B). Hierbei zeigte sich eine signifikante Inhibition der Kristallformation durch die jeweiligen Antikörper bzw. dessen antigenbindendem Fragment. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n=5$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test). Abbildung adaptiert nach Steiger et al.¹⁹²

den jeweiligen Antikörpern zeigten sich nicht ¹⁹². Eine mögliche Erklärung hierfür wäre u.a. eine direkte Bindung der eben genannten Antikörper an freies Oxalat im Serum. Diese Hypothese wurde in folgendem Experiment weiter untersucht.

Die eben genannten Daten zeigen, dass der anti-TGF β Antikörper 1D11 sowie dessen IgG1-Isotypenkontrolle 13C4 die Kristallformation *in chemico* gleichermaßen inhibieren. Im nächsten Schritt untersuchten wir die Interaktion zwischen dem IgG1-Antikörper 13C4 und freiem Oxalat. Hierfür inkubierten wir freies, lösliches Oxalat mit aufsteigenden Konzentrationen des IgG1-Antikörpers 13C4. Anschließend bestimmten wir die Konzentration an freiem Oxalat. Nach Inkubation mit dem IgG1-Antikörper 13C4 zeigte sich eine signifikant verminderte Konzentration an freiem Oxalat. Dieser Effekt war unabhängig von der jeweiligen Antikörperkonzentration (siehe Abbildung 11 A). Eine Inkubation mit bovinem Serumalbumin

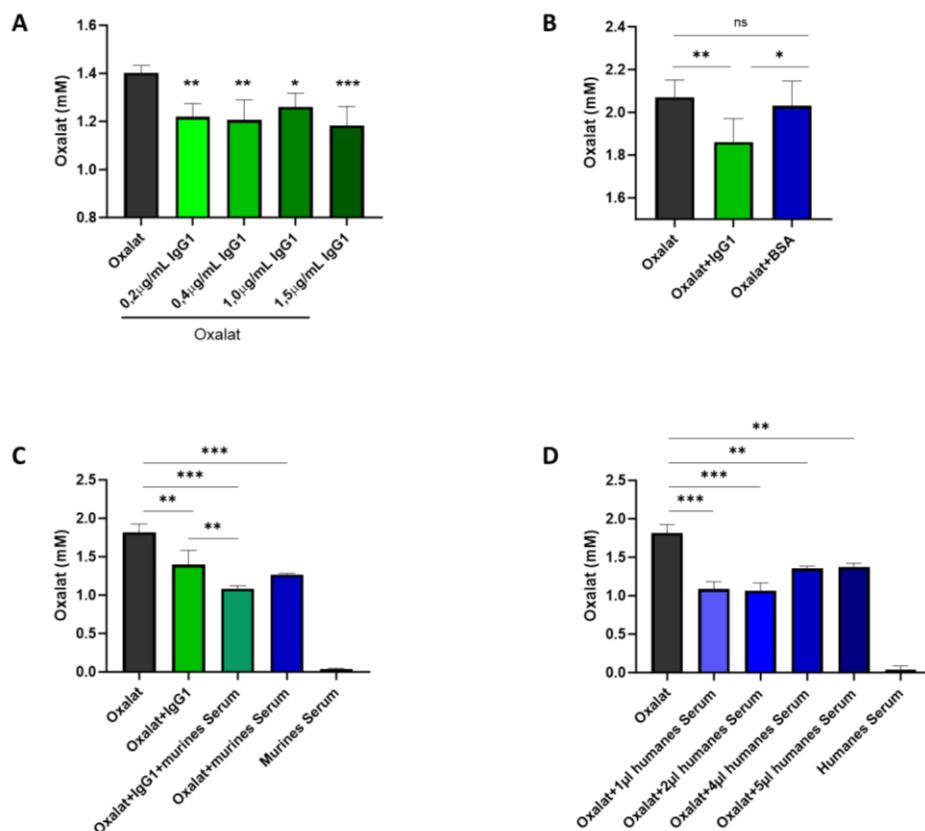


Abbildung 11: Bindung von freiem Oxalat durch IgG1-Antikörper. Natriumoxalat ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) wurde über 1 Stunde bei RT mit verschiedenen Konzentrationen des IgG1-Antikörpers inkubiert. Bei Bestimmung der Menge des freien Oxalats zeigt sich eine signifikante Reduktion des freien Oxalats (A). Eine Inkubation mit BSA hingegen hatte keinen Einfluss auf die Menge an freiem Oxalat (B). Eine weitere Reduktion des Anteils an freiem Oxalat konnte durch die Ko-Inkubation von IgG1 und murinem Serum erzielt werden (C). Eine Bindung von freiem Oxalat zeigte sich auch nach Zugabe von humanem Serum. Dieser Effekt war unabhängig von der Menge an zugegebenem humanem Serum (D). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n=5$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

(BSA) hatte keinen Effekt auf den Anteil von freiem Oxalat (siehe Abbildung 11 B). Darüber hinaus konnte durch die gleichzeitige Inkubation mit dem IgG1-Antikörper 13C4 und murinem Serum ein additiver Effekt gezeigt werden (siehe Abbildung 11 C). Zudem konnte eine verminderte Konzentration von freiem Oxalat auch bei Inkubation mit humanem Serum nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11 D). Die Daten zeigen, dass der IgG1-Antikörper 13C4 mit freiem Oxalat interagiert, wodurch weniger freies Oxalat für die Kristallformation zur Verfügung steht.

Allerdings ist die Aussagekraft von *in vitro* Experimenten der Kristallbildung in vielerlei Hinsicht deutlich eingeschränkt. Die Kristallformation *in vivo* ist ein dynamischer Prozess, wobei Faktoren wie die Konzentration der Salze als auch der pH-Wert sich ständig verändern. Zum anderen interagieren *in vivo* zahlreiche weitere Moleküle bei der Kristallformation. Als komplizierender Faktor kommt hinzu, dass sich die Kristallbildung innerhalb der Niere in verschiedenen Kompartimenten abspielt. Im Folgendem untersuchten wir daher im Mausmodell der chronischen Oxalatnephropathie den Einfluss von anti-TGF β und IgG1 *in vivo*.

3.2 Effekte der IgG-Antikörper auf die Kristallformation in vivo

Aufgrund der Limitationen der *in vitro*-Experimente untersuchten wir im nächsten Schritt den Einfluss des anti-TGF β Antikörpers 1D11 und des IgG1 Antikörpers 13C4 auf die Kristallformation im murinen Modell der chronischen Oxalatnephropathie. Wie bereits unter Kapitel 2.2.2 detailliert ausgeführt wurde, erhielt die Interventionsgruppe von C57BL/6N-Mäusen über 14 Tage eine spezielle oxalatreiche Spezialdiät. 48 Stunden nach Beginn der oxalatreichen Spezialdiät erhielten zwei Interventionsgruppen jeden zweiten Tag eine intraperitoneale Injektion mit dem anti-TGF β Antikörper 1D11 oder dem IgG1-Antikörper 13C4.

3.2.1 Effekte der antikörperbasierten anti-TGF β Therapie auf die Kristallformation in vivo

Zur Quantifizierung der Kristalldeposition wurden die Nieren nach Abschluss des Tierversuches entnommen histologisch aufgearbeitet und eine Kalziumoxalatfärbung nach

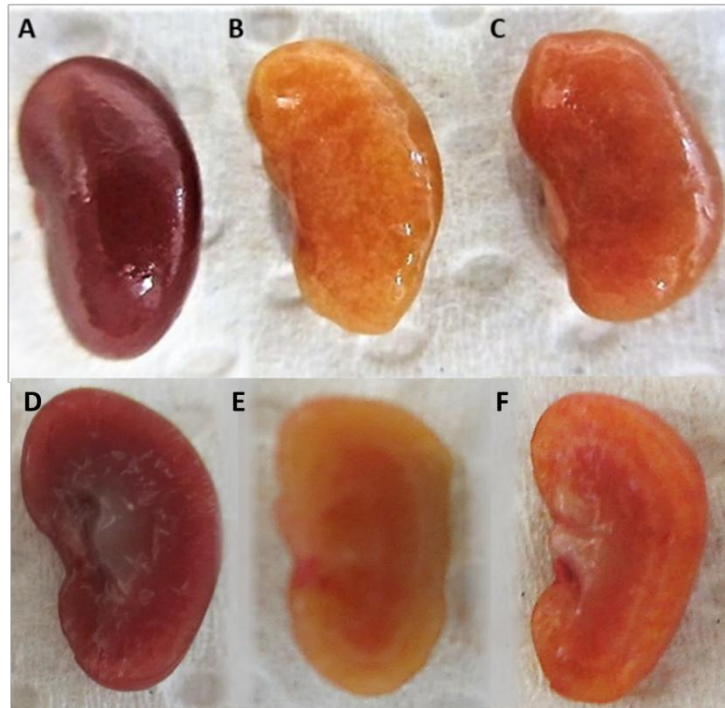


Abbildung 12: Morphologische Veränderungen im Modell der chronischen Oxalatnephropathie. A) Links ist die Niere einer C57BL/6N – Maus zu sehen, welche 14 Tage das Kontrollfutter erhalten hatte. B) Mittig ist exemplarisch eine Niere einer C57BL/6N – Maus zu sehen, welche 14 Tage die oxalatreiche Spezialdiät erhalten hatte C) Rechts ist eine Niere einer C57BL/6N – Maus dargestellt, welche neben der oxalatreichen Spezialdiät einer anti-TGF β Therapie erhalten hatte. D-F) Nachfolgend sind die exemplarisch die entsprechenden Nieren im Längsschnitt abgebildet.

Pizzalato durchgeführt. Bereits bei Entnahme zeigte sich makroskopisch ein eindrücklicher Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen (siehe Abbildung 12). Nieren der C57BL/6N-Mäuse, welche die oxalatreiche Spezialdiät erhalten hatten, zeigten sich verhärtet, wiesen eine knotige Oberfläche und eine gelbliche Verfärbung mit durchschimmernden weißlichen Kristallablagerungen auf im Vergleich zu gesunden Tieren, denen eine oxalatarme Kontrolldiät verabreicht wurde (siehe Abbildung 12A+B). Bei der Interventionsgruppe, welche den anti-TGF β Antikörper erhalten hatte, zeigten sich die oben genannten makroskopischen Befunde weniger ausgeprägt (siehe Abbildung 12C). Nach Färbung der histologischen Schnitte zeigte sich in der Gruppe, welche ausschließlich eine oxalatreiche Spezialdiät erhalten hatte, eine ausgeprägte Ablagerung von Kalziumoxalatkristallen, wobei der größte Anteil im Kortex und im äußeren Anteil der Medulla darstellbar war (siehe Abbildung 13). In der Kontrollgruppe mit der oxalatarmen Kontrolldiät waren keine Kristalle nachweisbar. Durch Administration des anti-TGF β Antikörpers 1D11 und des IgG1-Antikörpers 13C4 bei Mäusen mit enterischer Hyperoxalurie konnte die Kalziumoxalatdeposition im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen signifikant vermindert werden (siehe Abbildung 13).

Die Kalziumoxalatablagerungen wurden hierbei in den zweidimensionalen Nierenquerschnitten als positiv gefärbter prozentualer Flächenanteil nach Pizzalato-Färbung angegeben. In der unbehandelten Gruppe betrug im äußeren Anteil der Medulla der Anteil mit Kristalldeposition durchschnittlich $15 \pm 1,4\%$ SEM der Gesamtfläche, nach Gabe des anti-TGF β Antikörpers 1D11 lag der Anteil lediglich noch bei $4,2 \pm 1,6\%$ SEM und nach Gabe des IgG1 Antikörpers 13C4 bei $6,1 \pm 2\%$. Dies entspricht einer Reduktion der Kalziumdisposition von max. 72% Behandlung mit dem anti-TGF Antikörper 1D11 und max. 60% bei Behandlung mit dem IgG1 – Antikörper 13C4.

Die Reduktion der Kristallablagerung konnte hierbei in jedem Kompartiment, also sowohl im Kortex als auch in der inneren Medulla nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen der Behandlung mit dem anti-TGF β Antikörper 1D11 und dem IgG1 Antikörper 13C4 zeigte sich nicht (siehe Abbildung 13). Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die antikörperbasierte anti-TGF β Therapie im Modell der sekundären Hyperoxalurie die Kalziumoxalatdeposition im Nierenparenchym vermindert.

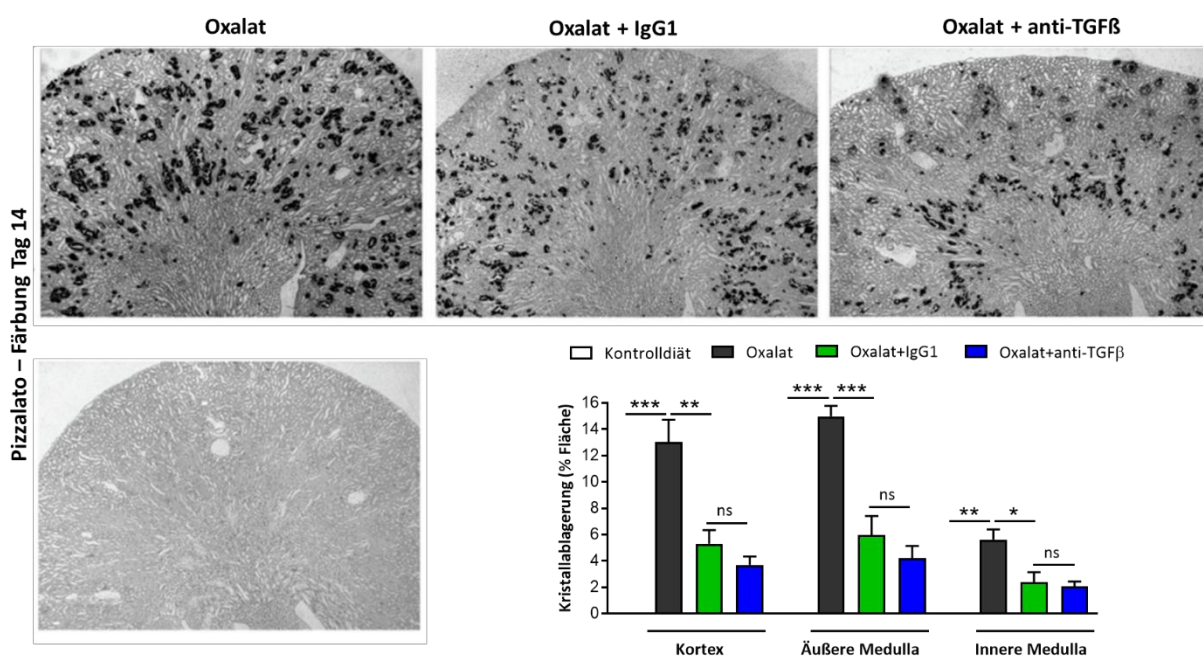


Abbildung 13: Reduktion der renalen Kalziumdeposition durch IgG-Antikörper *in vivo*. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen bilden exemplarische Nierenausschnitte der verschiedenen Interventionsgruppen ab. Die schwarzen Areale stellen die durch die Pizzalato-Färbung angefärbten Kalziumoxalatkristallablagerungen dar. Das Säulendiagramm zeigt den durchschnittlich positiv gefärbten Anteil pro Niere einer Interventionsgruppe. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

3.2.2 Effekte der IgG-Antikörpertherapie auf den Serumoxalatspiegel

Bei einer verminderten Kalziumdeposition im Nierenparenchym stellt sich als nächstes die Frage, bei welchem Schritt der Kristallformation die Antikörpertherapie eingreift. Aufgrund der Komplexität und der multiplen Einflussfaktoren sind diverse Pathomechanismen möglich. Im ersten Schritt untersuchten wir die Oxalatkonzentration im Serum, da die Übersättigung eines Metaboliten essenziell für das Ausfällen von Kristallen ist ^{36,37,38}. Hierbei zeigte sich bei der Gruppe mit dem oxalatreichen Futter ein stetiger Anstieg des Serumoxalatspiegels, welcher vor allem ab Tag 7 rapide anstieg (siehe Abbildung 14). An Tag 7 zeigte sich noch kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen mit der oxalatreichen Diät, zu diesem Zeitpunkt hatte die IgG-Antikörpertherapie noch keinen signifikanten Einfluss auf den Serumoxalatspiegel. Bei Versuchsende an Tag 14 konnte die Serumoxalatkonzentration hingegen mehr als halbiert werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Therapie mit den anti-TGF β Antikörper 1D11 und der IgG1-Isotypenkontrolle 13C4 zeigte sich hierbei nicht. Eine mögliche Erklärung für die rapide ansteigenden Serumoxalatspiegel ist der zunehmende Rückgang der GFR, wodurch die übermäßige Oxalatzufuhr nicht mehr renal eliminiert werden kann. Eine mögliche Erklärung für die Reduktion der Serumoxalatkonzentration durch die IgG1-Antikörpertherapie wäre eine nicht-kovalente Bindung von Oxalat an den anti-TGF β - bzw. IgG1-Antikörper, was wiederum die Konzentration an löslichem Oxalat vermindert und damit auch die Menge an Oxalat, welche im Glomerulus filtriert wird. Neben der

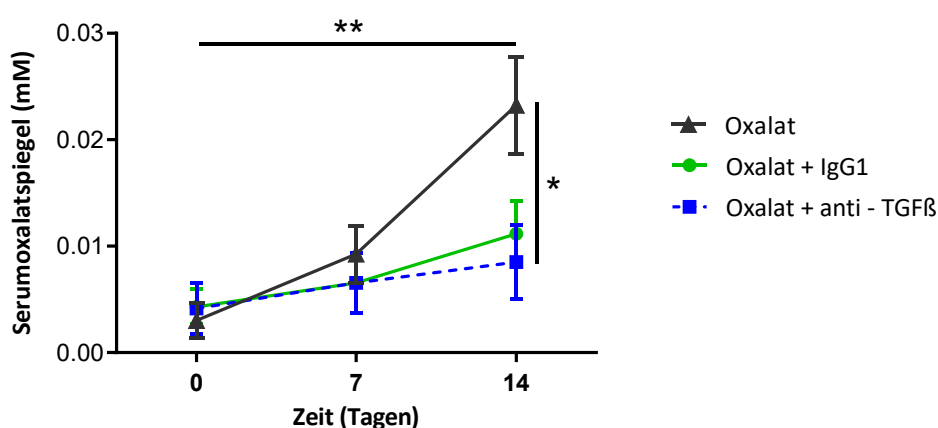


Abbildung 14: Reduktion der Serumoxalatspiegel durch IgG-Antikörper *in vivo*. Die C57BL/6N – Mäuse erhielten 14 Tagen eine oxalatreiche Spezialdiät. Eine Gruppe erhielt alle 48 Stunden eine i.p. – Injektion mit dem anti – TGF β Antikörper 1D11 (Oxalat + anti – TGF β). Eine weitere Gruppe erhielt alle 48 Stunden den IgG1- Antikörper 13C4 (Oxalat + IgG1). An Tag 0, 7 und 14 wurde jeweils Blut abgenommen und die Serumoxalatkonzentration bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=5. *p<0,05 (two-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test

Übersättigung an Metaboliten im Tubuluslumen sind viele weitere Faktoren für eine Kristallformation im Nierenparenchym erforderlich. Ein weiterer Risikofaktor wurde im nächsten Kapitel untersucht^{36,37,38}.

3.2.3 Effekte der anti-TGF β Therapie auf die Expression von Adhäsionsmolekülen

Eine Voraussetzung für die Entwicklung einer Nephrokalzinose stellt die Adhäsion von Kristallen an Tubulusepithelzellen dar¹⁹⁹. Mulay *et al.* deckte auf, dass bei der chronischen Oxalatnephropathie eine TNFR-vermittelte Expression von CD44 und Annexin II essenziell für die Entstehung einer Nephrokalzinose ist²⁰⁰. Im nächsten Schritt untersuchten wir daher, inwiefern sich eine Blockade der TGF β -Signaltransduktionswege auf die renale Expression von CD44 und Annexin II auswirkt. Es zeigte sich, dass durch die anti-TGF β Therapie an Tag 7 und an Tag 14 signifikant weniger Annexin II und CD44 exprimiert wurde (siehe Abbildung 15). Allerdings konnte in der Pizzalato-Färbung kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe, welche die IgG1-Isotypenkontrolle und derer welche den anti-TGF β Antikörper erhalten hatte, festgestellt werden (siehe Abbildung 13). Letztendlich lässt sich aus den Ergebnissen schlussfolgern, dass der Effekt der anti-TGF β Therapie auf die Oberflächenmoleküle CD44 und Annexin II in unserem Modell nicht ursächlich für die verminderte Kalziumdeposition in unserem Modell ist.

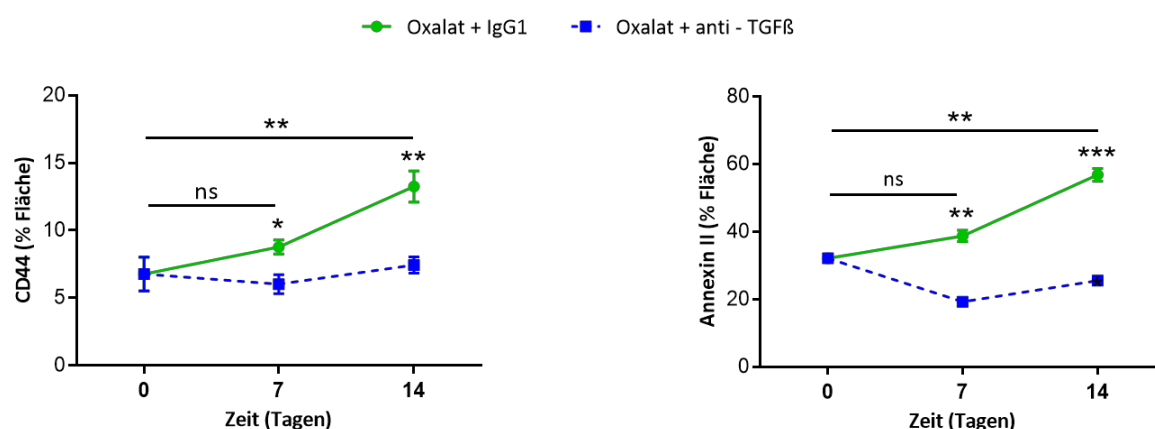


Abbildung 15: Effekt der anti-TGF β Therapie auf die Expression von Adhäsionsmolekülen. Die Mäuse wurden jeweils mit einer oxalatreichen Spezialdiät gefüttert. Zudem wurde alle 48 Stunden der anti-TGF β AK 1D11 oder die IgG1-Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert. Bei 2 Gruppen wurde die Versuchsreihe nach 7 Tagen beendet und die Nieren entnommen, bei den anderen beiden Interventionsgruppen nach 14 Tagen. Von jeder Maus wurde ein Nierenquerschnitt immunhistologisch auf CD44 und Annexin II gefärbt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (two-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

3.3 Effekte der anti - TGF β Therapie auf die β - Oxidation

Änderungen im Zellstoffwechsel von Tubulusepithelzellen konnten in den letzten Jahren neben der Inflammation als bedeutender Risikofaktor bei der Entstehung und Progression der renalen Fibrose identifiziert werden. Im Rahmen von genomweiten Transkriptomanalysen fiel insbesondere eine verminderte Expression von Schlüsselenzymen der β -Oxidation, also dem Abbau von Fettsäuren, bei Nierengewebeproben von CKD-Patienten auf ²⁰¹. *In vivo*- und *in vitro*- Studien zeigten, dass gesunde Tubulusepithelzellen den Großteil ihrer Energie aus der Fettsäureoxidation gewinnen und eine verminderte Fettsäureoxidation mit Zelltod und einer zunehmenden Transition von Tubulusepithelzellen hinzu einem mesenchymalen Phänotyp assoziiert ist. TGF β fungiert in diesem Zusammenhang als Inhibitor der β – Oxidation ²⁰¹.

Wir untersuchten zunächst die Folgen der Oxalatnephropathie auf die Fettsäureoxidation im Nierengewebe und im nächsten Schritt den Effekt der Antikörper-basierten anti-TGF β Therapie. Hierbei bestimmten wir die renale mRNA-Expression von *Acyl-coenzyme A oxidase 1* (*Acox1*), einem Schlüsselenzym der β -Oxidation sowie den beiden zentralen Transkriptionsfaktoren *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (*Ppara*) und *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha* (*Pgc1 α*) ²⁰¹⁻²⁰³. Im Nierengewebe der Mäuse, welche eine Oxalat-Nephropathie aufwiesen, wurde im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe eine signifikant verminderte Expression von *Pgc1 α* und *ACox1* nachgewiesen (siehe Abbildung 16). Durch die Gabe des anti-TGF β Antikörpers 1D11 konnte die mRNA-Expression des Schlüsselenzyms *ACox1* und der Transkriptionsfaktoren *Pgc1 α* und *Ppara* im Modell der sekundären Oxalatnephropathie mehr als verdoppelt werden. Dies lässt schlussfolgern, dass die anti-TGF β Therapie die pathologische Inhibition der

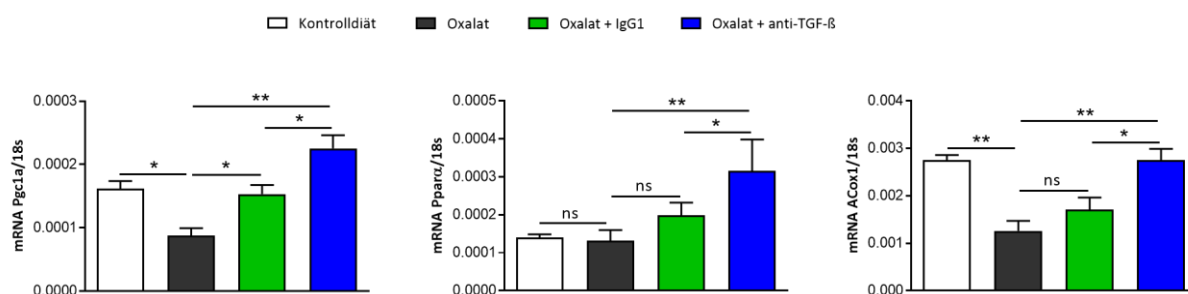


Abbildung 16: Inhibition der TGF β -Signalwege schützt vor metabolischer Reprogrammierung. Die Mäuse wurden jeweils mit einer oxalatreichen Spezialdiät gefüttert. Zudem wurde alle 48 Stunden der anti – TGF β AK 1D11 oder die IgG1 – Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert. Nach 14 Tagen wurden die Nieren entnommen und die mRNA-Expression der Schlüsselenzyme der β -Oxidation bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

Fettsäureoxidation im Rahmen der Nephrokalzinose vermindert. Ein Erhalt der Fettsäureoxidation erwies sich in einigen murinen Fibrosemodellen als protektiv gegenüber dem Fortschreiten der renalen Fibrose ^{201,204}.

3.4 Effekte der anti - TGF β Therapie auf die Entzündungsreaktion

Die kristall-induzierte Inflammation spielt bei der Nephrokalzinose eine zentrale Rolle bei der Progression des Tubulusschadens, der Fibrose und letztendlich des chronischen Nierenversagens ³⁹. TGF β gilt vorrangig als anti-inflammatorischer Mediator, je nach Milieu kann TGF β allerdings auch pro-inflammatorische Effekte vermitteln ¹⁸⁰. Die folgenden Experimente sollten daher Aufschluss darüber geben, inwiefern sich eine Inhibition der TGF β -Signalwege auf die kristall-induzierte Entzündungsreaktion der chronischen Oxalatnephropathie auswirkt.

3.4.1 Inhibition der TGF β - Signalwege durch den 1D11-Antikörper

Im ersten Schritt wollten wir zeigen, dass durch die intraperitoneale Gabe von anti-TGF β die Expression der TGF β - Signalkaskade tatsächlich inhibiert wird. Im ersten Schritt bestimmten wir die TGF β -Spiegel im Serum (siehe Abbildung 17). Durch die Applikation des anti-TGF

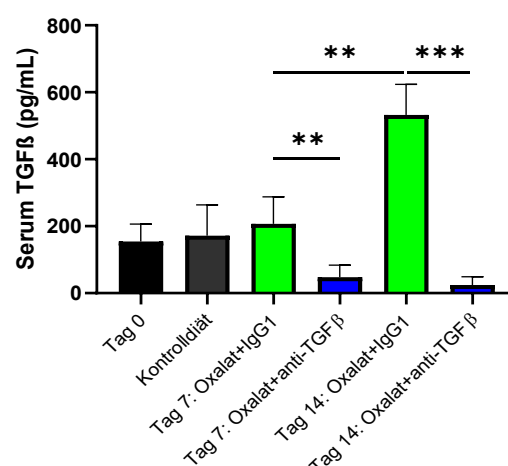


Abbildung 17: Systemische Inhibition der TGF β – Signalwege durch den 1D11 Antikörper. Die C57BL/6N - Mäuse wurden mit einer oxalatreichen Spezialdiät gefüttert. Zudem wurde alle 48 Stunden der anti – TGF β AK 1D11 oder die IgG1 – Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert. An Tag 0, 7 und 14 wurde Blut entnommen und im abzentrifugierten Serum die Konzentration von freiem TGF β in pg/ml bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

Antikörpers 1D11 konnte der TGF β -Spiegel signifikant inhibiert werden, im Vergleich zur Kontrollgruppe, welcher die Isotypenkontrolle IgG1 appliziert wurde (siehe Abbildung 17). Damit konnte gezeigt werden, dass der 1D11-Antikörper die Konzentration an freiem TGF β effektiv systemisch vermindert.

Im nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss auf die Aktivierung der TGF-Signalwege im gewünschten Zielorgan, der Niere. Hierfür bestimmten wir die renale mRNA-Expression von TGF β 1 und 2 als auch der TGF β Rezeptoren 1 und 2. Bei den hyperoxalurischen Mäusen zeigte sich unter Gabe der IgG1-Isotypenkontrolle eine signifikante Hochregulation der mRNA-Expression der TGF β -Isoformen 1 und 2, als auch der TGF β -Rezeptoren 1 und 2. Durch Gabe des neutralisierenden anti-TGF β Antikörpers 1D11 konnte die mRNA-Expression der beiden TGF β Isoformen und der TGF β Rezeptoren 1 und 2 im Nierengewebe der hyperoxalurischen Mäuse signifikant reduziert werden (siehe Abbildung 18).

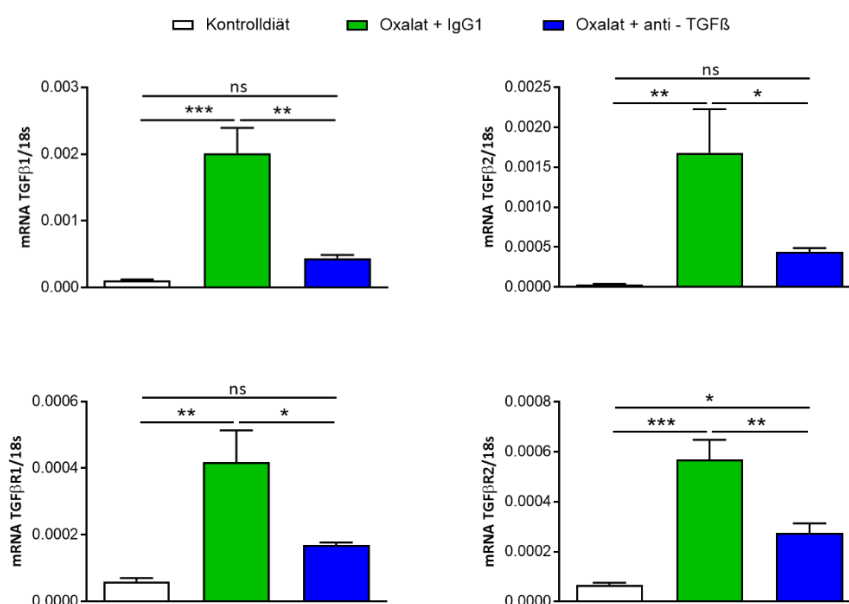


Abbildung 18: Inhibition der TGF β – Signalwege in der Niere durch den 1D11 Antikörper. Die C57BL/6N - Mäuse wurden mit einer oxalatreichen Spezialdiät gefüttert. Zudem wurde alle 48 Stunden der anti – TGF β AK 1D11 oder die IgG1 – Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert. Nach 14 Tagen wurden die Nieren entnommen und die mRNA-Expression von TGF β 1, TGF β 2, TGF β R1, TGF β R2 bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

3.4.2 Effekte der anti-TGF β Therapie auf die Expression proinflammatorischer Zytokine

Zunächst untersuchten wir den Einfluss der Therapie mit dem anti-TGF β IgG Antikörper 1D11 auf die mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Zytokine *Interleukin-6* (IL-6) und *Tumor necrosis factor-alpha* (TNF α) im Nierengewebe der Mäuse mit fortgeschrittener Nephrokalzinose. IL-6 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches u.a. via Aktivierung der JAK-STAT- und MAP-Kinase-Signaltransduktionswege, im Rahmen der akuten Phase einer Gewebsschädigung oder Infektion sezerniert wird. Eine Überexpression von IL-6 spielt auch eine Rolle in diversen chronische Autoimmunerkrankungen wie dem Morbus Castleman, der rheumatoiden Arthritis oder der Systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis ²⁰⁵. TNF α ist ein pleiotropes Zytokin, welches hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen sezerniert wird und neben der Regulation von zahlreichen biologischen Prozessen wie Apoptose, Zelldifferenzierung, eine starke pro-entzündliche Wirkung zeigt ²⁰⁶. Die renale mRNA-Expression von *Il-6* und *Tnfa* ist bei Vorliegen einer chronischen Oxalatnephropathie massiv erhöht im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (siehe Abbildung 19). Sowohl durch Gabe der IgG1 – Isotypenkontrolle 13C4 als auch den anti-TGF β IgG-Antikörper 1D11 konnte die mRNA-Expression der Zytokine reduziert werden. Hervorzuheben ist ein signifikanter Unterschied zwischen dem IgG1- AK 13C4 und dem anti-TGF β AK 1D11. So konnte durch den anti-TGF β Antikörper eine weitere Suppression von *Il-6* und *Tnfa* erzielt werden. Zusammenfassend lassen die Daten vermuten, dass durch die Antikörper, und noch effizienter

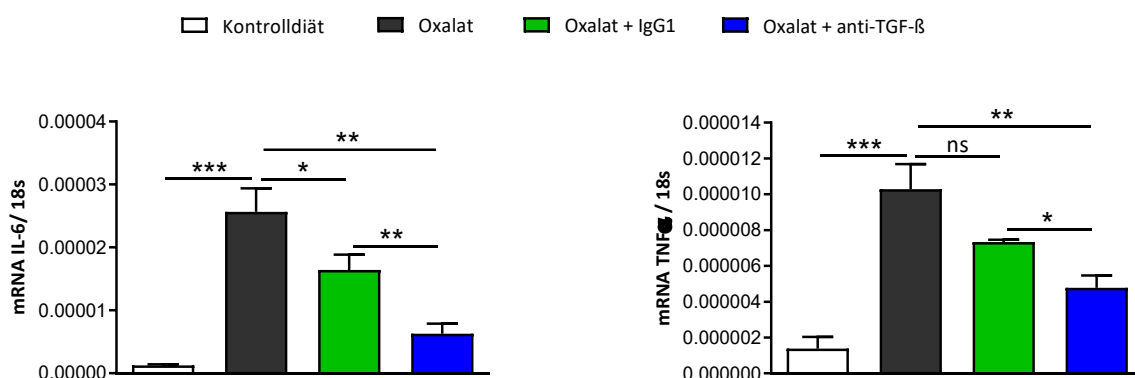


Abbildung 19: Inhibition der Entzündungsmediatoren durch die anti-TGF β Therapie in vivo Die C57BL/6N - Mäuse wurden mit einer oxalatreichen Spezialdiät oder der Kontrolldiät gefüttert. Zudem wurde alle 48 Stunden der anti - TGF β AK 1D11 oder die IgG1 – Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert. Nach 14 Tagen wurden die Nieren entnommen und die mRNA-Expression von *Il-6* und *Tnfa* bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

durch den anti-TGF β Antikörper 1D11 die Entzündungsreaktion supprimiert werden kann. Der Effekt der IgG1 - Isotypenkontrolle ist hierbei als sekundärer Effekt der verminderten Kristalldeposition zu werten. Um den Mechanismus insbesondere des additiven Effekts der anti-TGF β Therapie besser zu verstehen, analysierten wir im nächsten Schritt die infiltrierende Leukozytenpopulation.

3.4.3 Effekte der anti-TGF β Therapie auf die Makrophagendifferenzierung

Durch die kristall-induzierte Tubulusschädigung wird über verschiedene Mechanismen wie beispielsweise die Nekroinflammation, eine sterile Inflamationsreaktion ausgelöst. Unmittelbar nach der Gewebsschädigung werden gewebsständige Immunzellen wie dendritische Zellen und Makrophagen direkt über DAMPs aktiviert und induzieren via Chemotaxis eine Infiltration von zirkulierenden Immunzellen ²⁰⁷. Da wir aufgrund der oben genannten Daten im Rahmen der kristall-induzierten Nephropathie eine anti-inflammatorische Wirkung des anti-TGF β Antikörpers vermuteten, analysierten wir im Folgenden die infiltrierende Leukozytenpopulation. Zur Quantifizierung und detaillierten Phänotypisierung der infiltrierenden Makrophagen isolierten wir aus dem entnommenen Nierengewebe die Leukozytenpopulation und analysierten diese nach Färbung mit diversen Antikörpern mittels Durchflusszytometrie. Mithilfe des CD45-Antigens identifizierten wir zunächst die Leukozytenpopulation. CD45 ist ein Transmembranprotein mit einer Tyrosin-Phosphatase-Aktivität, welches von den meisten differenzierten hämatopoetischen Zellen exprimiert wird und ist vor allem als Regulator der T- und B-Zell Aktivierung bekannt ²⁰⁸. Im Weiteren identifizierten wir die gesamte Makrophagenpopulation als CD45+ F4/80+ und CD11b+ positive Zellen. F4/80 oder auch bekannt als *EGF- linke module containing mucin-like hormone receptor-like 1* (EMR1) ist vor allem als Marker für murine Makrophagen bekannt, er wird aber auch von einer Reihe weiterer Leukozytensubpopulationen wie den Monozyten oder eosinophilen Granulozyten exprimiert ²⁰⁹. CD11b ist ebenfalls ein etablierter Monozyten-/Makrophagen-Marker und gehört zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle ²¹⁰. Die FACS-Analysen zeigten bei Vorliegen einer Nephrokalzinose eine massive Infiltration an CD45-positiven Leukozyten, welche durch die Behandlung mit dem anti-TGF β Antikörper 1D11 signifikant vermindert werden konnte. Durch IgG1 konnte ebenfalls eine signifikante, wenn auch nicht so ausgeprägte Reduktion der Leukozyteninfiltration erzielt werden (siehe

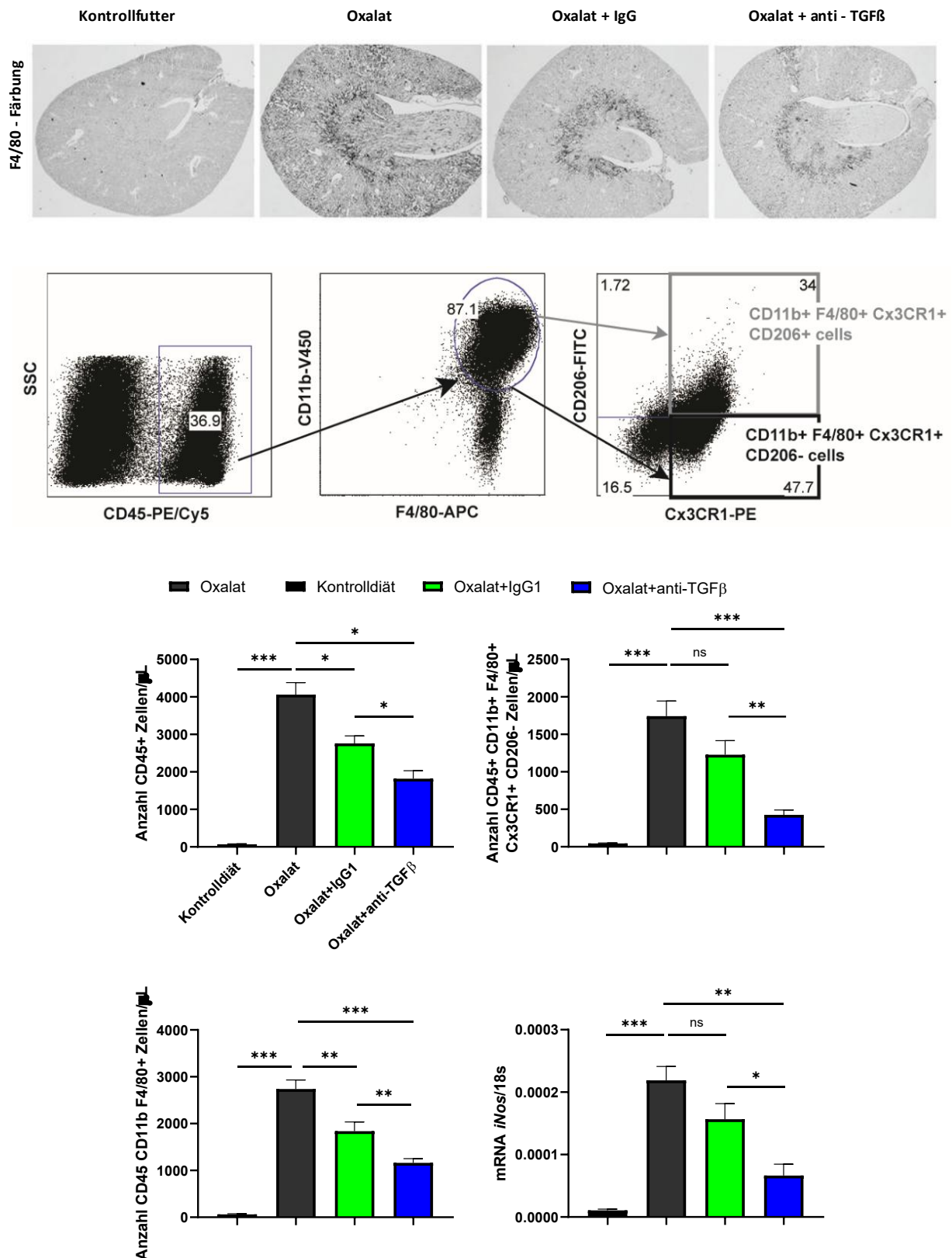


Abbildung 20: Inhibition der Differenzierung zu M1-Makrophagen durch die anti-TGFβ Therapie. Die C57BL/6N - Mäuse wurden mit einer oxalatreichen Spezialdiät oder der Kontrolldiät gefüttert. Zudem wurde alle 48 Stunden der anti-TGFβ Antikörper 1D11 oder die IgG1 – Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert. Nach 14 Tagen wurde die renale Makrophagenpopulation mittels histologischer F4/80-Färbung und Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, n=3-5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

Abbildung 20). Korrelierend sahen wir zudem eine verminderte Anzahl an infiltrierenden Makrophagen (CD45+ F4/80+ CD11b+ -Zellen) unter Therapie mit dem anti-TGF β Antikörper 1D11 und dem IgG1-Kontrollantikörper 13C4. Die FACS-Ergebnisse konnten zudem durch eine immunhistochemische F4/80-Färbung der aufgearbeiteten Nierenquerschnitte bestätigt werden (siehe Abbildung 20). Die genannten Daten lassen somit einen additiven anti-inflammatorischen Effekt der antikörperbasierten anti-TGF β Therapie vermuten. Um den zu Grunde liegenden Pathomechanismus besser verstehen zu können, erhoben wir eine Phänotypisierung der infiltrierenden Makrophagen. Makrophagen sind vom initialen Beginn einer Gewebsschädigung bis hin zur Gewebsregeneration oder Atrophie maßgebend an der Regulation der Entzündungsaktivität sowie Fibrogenese und Regeneration beteiligt. Das umgebende Milieu beeinflusst den jeweilig dominierenden Phänotyp, welcher entscheidend sein kann, ob sich eine anhaltende, sich reziprok verstärkende Entzündungsreaktion dominiert oder ob die Inflamationsreaktion einer Regenerationsphase weicht. M1-Makrophagen dominieren meist in der Initialphase eines Entzündungsgeschehens und zeigen eine pro-inflammatorische Wirkung, welche vor allem der Elimination des verursachenden Pathogens dienen soll. Bei der physiologischen Ausheilung eines Entzündungsherdens verschiebt sich der überwiegende Anteil zu Gunsten der M2-Makrophagen, welche je nach Unterform eine anti-inflammatorische, pro-fibrotische Wirkung vermitteln, wodurch eine Beendigung der Entzündungsreaktion und eine Regeneration des umgebenden Gewebes erzielt werden soll²⁰⁷. Durch Hinzunahme weiterer Oberflächenmarker bei der Durchflusszytometrie wurde eine Phänotypisierung der Makrophagen aus dem entnommenen Nierengewebe durchgeführt. Dabei wurden die M1-Makrophagen als CD45-, F4/80-, CD11b-, CX3CR1-positive und CD206-negative Zellen, während die M2-Makrophagen als CD45-, F4/80-, CD11b-, CX3CR1-, CD206-positive Zellen definiert wurden. CD206, auch bekannt als Mannoserezeptor, ist ein transmembranes C-Typ 1 Lektin, welches vor allem von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird und eine wichtige Rolle bei der Erkennung von bakteriellen Pathogenen und beim Abbau von Kollagen spielt. Zudem gilt er als Marker für M2-Makrophagen²¹¹. Im Rahmen der Nephrokalzinose zeigte sich eine massive Infiltration von M1-Makrophagen (CD45+, F4/80+, CD11b+, CX3CR1+, CD206-), welche durch die anti-TGF β Therapie im Vergleich zur Behandlung mit IgG1 signifikant inhibiert werden konnte (siehe Abbildung 20). Passend hierzu zeigte sich durch die anti-TGF β Therapie auch eine verminderte mRNA-Expression von *inducible nitric oxide synthase (iNos)*, einem Enzym, das von aktivierten M1-

Makrophagen exprimiert wird und durch Synthese von Stickstoffmonoxid, der Abtötung von Pathogenen dient ²¹². Aus den eben genannten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass im Mausmodell der chronischen Oxalatnephropathie durch eine Inhibition der TGF β Signalkaskade eine anti-inflammatorische Wirkung vermittelt wird. Assoziiert ist dieser Effekt mit einer Suppression der Makrophagendifferenzierung hinzu einem M1-Makrophagen Phänotyp.

3.5 Effekte der anti-TGF β Therapie auf die Fibrogenese

Ein fortgeschrittenes Stadium der chronischen Niereninsuffizienz ist in den meisten Fällen mit einer interstitiellen Fibrose assoziiert, so auch bei den kristall-induzierten Nephropathien ^{156,185}. Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, wie sich eine Inhibition der Fibrogenese auf die Nierenfunktion auswirkt. TGF β gilt als Masterregulator der Fibrogenese. Als Erstes untersuchten wir daher die Wirkung des anti-TGF β Antikörpers im Mausmodell der chronischen Oxalatnephropathie ¹⁷⁹. Das Studiendesign hierzu wurde bereits in Kapitel 2.2.3 dargestellt. Zur Evaluation und Quantifizierung der interstitiellen Fibrose untersuchten wir das entnommene Nierengewebe bildmorphologisch, molekularbiologisch und histologisch. Um den Pathomechanismus hinter den gemessenen Effekten besser zu verstehen, führten wir im letzten Schritt eine Phänotypisierung der isolierten Makrophagen aus dem Nierengewebe mittels Durchflusszytometrie durch.

3.5.1 Inhibition der Expression profibrotischer Zytokine

Als Erstes untersuchten wir die renale mRNA-Expression der Fibrosemarker *Alpha-1-Typ-I-Kollagen* und *Fibronectin-1*. Bei Alpha-1-Typ-I-Kollagen handelt es sich um eine Polypeptidkette, welche zusammen mit Alpha-1-Typ-II-Kollagen eine Triplehelix das Kollagen Typ 1 bildet, einem der häufigsten Kollagentypen ²¹³. Fibronectin-1 ist ein Glykoprotein, bestehend aus zwei Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Fibronectin besitzt eine Vielzahl an Funktion an diversen Wirkungsorten, im Bereich der extrazellulären Matrix dient es unter anderem als Verbindungsmolekül zwischen Kollagenfibrillen und anderen Molekülen der extrazellulären Matrix ²¹⁴. Wie bereits beschrieben, zeigte sich im Modell der Oxalatnephropathie eine massive Zunahme der beiden

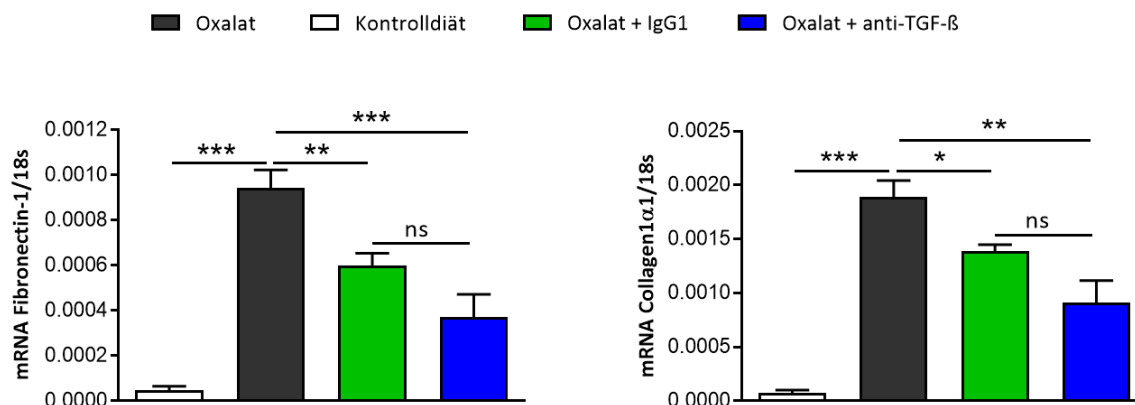


Abbildung 21: Inhibition der Expression pro-fibrotischer Marker durch die anti-TGFβ Therapie. Die C57BL/6N - Mäuse wurden mit einer oxalatreichen Spezialdiät oder der entsprechenden Kontrolldiät gefüttert. Zudem wurde allen Tieren 48 Stunden der anti - TGFβ Antikörper 1D11 oder die IgG1 – Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert (Studiendesign I). Nach 14 Tagen wurde die renale mRNA – Expression der pro-fibrotischen Marker *Fibronectin-1* und *Alpha-1-Typ-I-Kollagen* analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

Fibrosemarker (siehe Abbildung 21). Sowohl durch den anti-TGFβ IgG Antikörper als auch durch dessen Isotypenkontrolle IgG1 konnte eine signifikant verminderte mRNA-Expression der beiden Moleküle der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass unsere Intervention die Fibrogenese im Modell der Oxalatnephropathie inhibiert.

3.5.2. Effekte der anti-TGFβ Therapie auf die renale extrazelluläre Matrix

Nachdem auf mRNA-Ebene eine anti-fibrotische Wirkung von der antikörperbasierten anti-TGFβ Therapie nachgewiesen werden konnte, untersuchten wir in folgenden Analysen das Ausmaß der Fibrose auf Proteinebene. Das Nierengewebe der Versuchstiere wurde daher histologisch aufgearbeitet und auf Komponenten des Bindegewebes gefärbt. Hierzu führten wir eine Jones Methenamin Silberfärbung und eine immunhistochemische Färbung für α – smooth muscle actin (α -SMA) durch. Bei der Jones Methenamin Silberfärbung werden die Disaccharid-Einheiten der amorphen Grundsubstanz der extrazellulären Matrix mittels Oxidation durch Silber-Ionen schwarz gefärbt ²¹⁵. Alpha-SMA ist ein Bestandteil von Mikrofilamenten und wurde durch eine immunhistochemische Färbung demaskiert. Die Zufuhr des oxalatreichen Futters führte zu einer massiven Zunahme der extrazellulären Matrix. Während bei der Kontrollgruppe im Mittel $1,86 \pm 0,88\%$ der Fläche des Nierenquerschnitts positiv in der Jones Methenamin Silberfärbung gefärbt wurden, waren dies in der Gruppe der chronischen Oxalatnephropathie $10,91 \pm 2,57\%$ (siehe Abbildung 22).

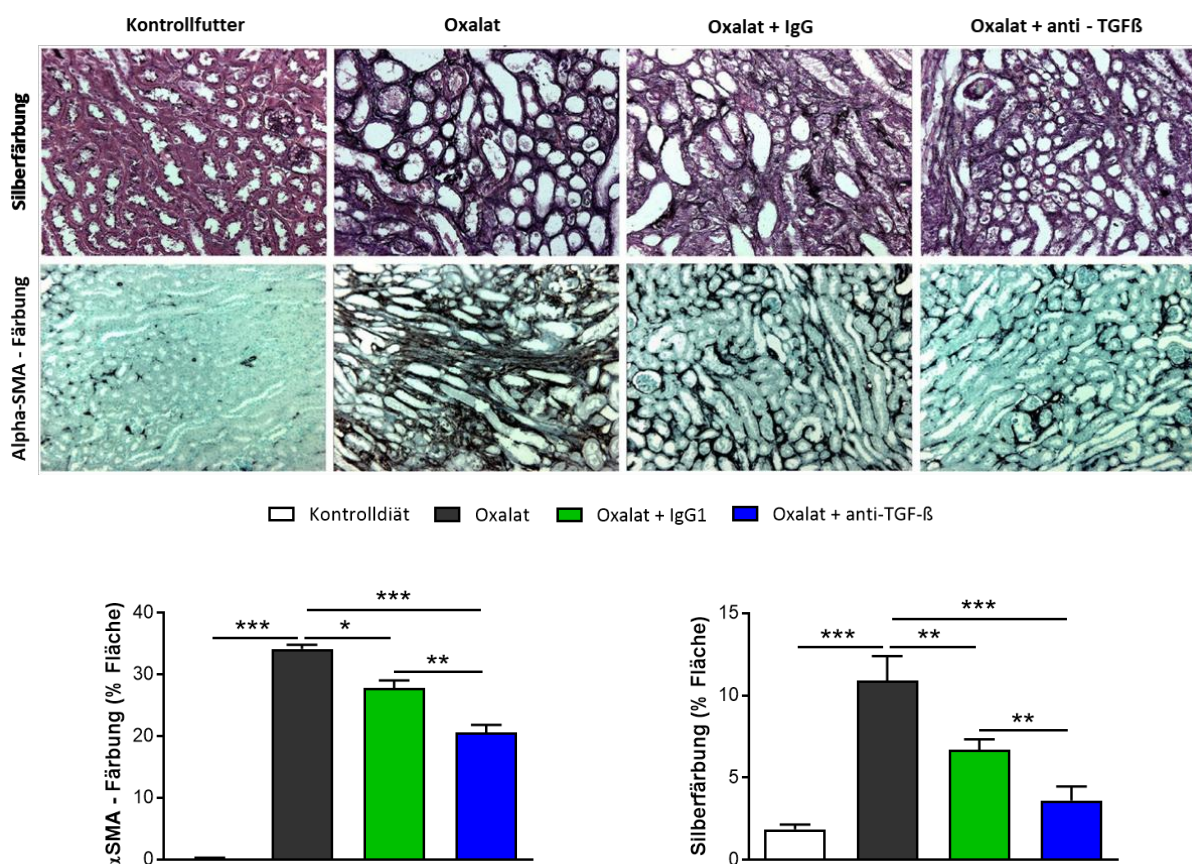


Abbildung 22: Reduktion der renalen extrazellulärer Matrix durch die anti-TGFβ Therapie. Die C57BL/6N - Mäuse wurden mit einer oxalatreichen Spezialdiät oder der entsprechenden Kontrolldiät gefüttert. Zudem wurde alle 48 Stunden der anti - TGFβ Antikörper 1D11 oder die IgG1 - Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert. Nach 14 Tagen wurde der renale Anteil extrazellulärer Matrix mittels Silberfärbung und α-SMA Färbung quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

Bei der Färbung für α-SMA zeigte sich eine Zunahme der positiv gefärbten Anteile von durchschnittlich $0,21 \pm 0,12$ % auf $34,15 \pm 1,35$ % nach Gabe einer oxalatreichen Diät im Vergleich zur Kontrolldiät (siehe Abbildung 22). Durch die Gabe des anti-TGFβ Antikörpers verminderte sich der Fibroseanteil in beiden Färbungen signifikant, im Rahmen der Silberfärbung sank der Anteil um ca. zwei Drittel von $10,9 \pm 2,57$ % auf $3,6 \pm 1,1$ %. Bei der α-SMA Färbung verringerte sich der positiv gefärbte Flächenanteil im Nierenquerschnitt um 40%. Durch die Administration der Isotypenkontrolle konnte der fibrotische Anteil ebenfalls signifikant reduziert werden, allerdings nicht in dem Maße wie durch den anti-TGFβ Antikörper. Zusammenfassend zeigen die Daten eine anti-fibrotische Wirkung der antikörperbasierten anti-TGFβ Therapie und dessen Isotypenkontrolle, wobei sich ein signifikanter additiver inhibitorischer Effekt von anti-TGFβ nachweisen lässt.

Die postmortale MRT-Untersuchung der Versuchstiere ermöglichte es uns im Gegensatz zu den histologischen Färbungen und der mRNA-Expressionsanalysen das Ausmaß der Fibrose der gesamten Niere zu quantifizieren. Hierfür wurde den Versuchstieren postmortem nach Beendigung der zweiwöchigen Intervention die gesamte Niere entnommen und in ein 1,5%-iges Agarose Gel überführt. Die konservierten Nieren wurden in einem externen Labor mithilfe eines 7-Tesla Kernspintomographen (*ClinScan 7 T*, BrukerBioSpin, Ettlingen) untersucht.

Verglichen wurden das Nierengewebe der Interventionsgruppe, welche den anti-TGF β Antikörper 1D11 erhalten, mit der Kontrollgruppe, welcher die IgG1-Isotypenkontrolle 13C4 appliziert wurde (siehe Abbildung 23). Beide Gruppen erhielten das oxalatreiche Futter (Zusammensetzung siehe Tabelle 2). Neben den Standardsequenzen zur Darstellung der Morphologie wurde sowohl die Längsrelaxationszeit T1 als auch die Querrelaxationszeit T2 in den jeweiligen Nierenabschnitten analysiert. Nach Gabe des anti-TGF β Antikörpers zeigte sich in allen Nierenabschnitten sowohl eine signifikant verminderte Längsrelaxationszeit T1 als auch Querrelaxationszeit T2. Eine verlängerte Längsrelaxationszeit

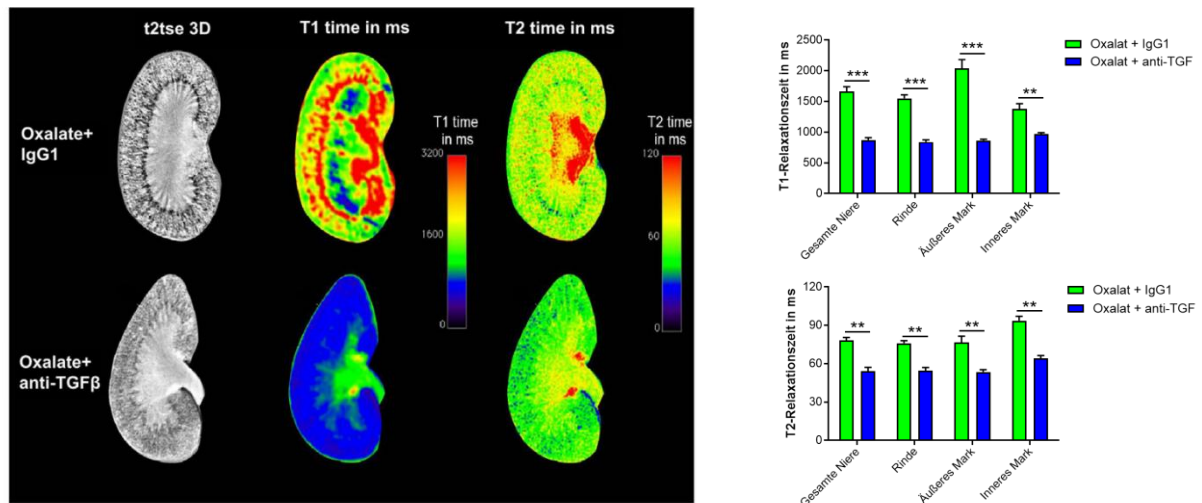


Abbildung 23: Reduktion der renalen Expansion extrazellulärer Matrix durch die anti-TGF β Therapie in der Kernspintomographie. In der oberen Reihe ist exemplarisch eine Niere einer Maus dargestellt, welche das Oxalat-Futter erhalten hatte und der IgG1-Isotypenkontrolle 13C4 appliziert wurde. In der unteren Reihe exemplarisch die Niere einer Maus, welche neben dem oxalatreichen Futter den anti-TGF β Antikörper erhalten hatte. In gelb-orange-rot ist graphisch die jeweilige Längsrelaxationszeit T1 des Gewebeabschnitts dargestellt, in grün-blau-schwarz die Querrelaxationszeit T2. Je mehr rot zu sehen ist, desto höher der Anteil an Bindegewebe in der Niere. Je mehr blaue Anteile desto mehr entzündlich-veränderte Gewebsanteile. Rechts sind die Mittelwerte der Quer- und Längsrelaxationszeiten in ms in den jeweiligen Nierenabschnitten dargestellt. In der Interventionsgruppe mit der anti-TGF β Therapie zeigte sich sowohl eine verkürzte Quer- als auch Längsrelaxationszeit. Dies spricht für einen verminderten Anteil an fibrotisch- und entzündlich veränderten Nierengewebe. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n=5$. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (two-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

T1 in dem untersuchten Gewebe ist mit einem erhöhten Anteil an Bindegewebe assoziiert. Wohingegen eine verlängerte Querrelaxationszeit T2 v.a. in entzündlich verändertem Gewebe darstellbar ist ¹⁹⁷. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die anti-TGFβ Therapie bei der Behandlung der Nephrokalzinose einen anti-inflammatorischen und anti-fibrotischen Effekt vermittelt.

3.5.3. Effekte der anti-TGFβ Therapie auf die Makrophagendifferenzierung

Makrophagen sind maßgeblich an der Regeneration und Fibrosierung nach einer Gewebsschädigung beteiligt. In Kapitel 3.4.4. konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Inhibition der TGFβ Signalkaskade eine Differenzierung hinzu einem pro-inflammatorischen M1-Makrophagenphänotyp vermindert werden konnte (siehe Abbildung 20). Im Folgenden soll die M2-Makrophagensubpopulation genauer untersucht werden. Die M2-Makrophagenpopulation dominiert vor allem beim Abheilungs- und Regenerationsprozess in Folge eines Entzündungsgeschehens ²⁰⁷. Abgeleitet aus *in vitro*-Studien können Makrophagen u.a. in folgende Subtypen unterteilt werden: M2a-, M2b- und M2c-Makrophagen. M2a-Makrophagen können anhand ihrer Oberflächenmarker als CD45-, F 4/80-, CD11b-, CX3CR1-, CD206- und TGFβ-positive Zellen identifiziert werden. Dieser Subpopulation wird im beginnenden Heilungsprozess einer Gewebeschädigung eine pro-fibrotische Wirkung zugesprochen. Während im gesunden Nierengewebe nur vereinzelt M2a-Makrophagen nachweisbar sind, zeigte sich bei der Gruppe mit einer Oxalat-Nephropathie eine massive Infiltration von M2a-Makrophagen (siehe Abbildung 24). Nach Gabe der IgG1-Isotypenkontrolle bei Versuchstieren mit einer Nephrokalzinose konnte der Anteil an M2a-Makrophagen signifikant vermindert werden (siehe Abbildung 24). Eine weitere signifikante Inhibition der Infiltration von M2a-Makrophagen konnte durch die Applikation des anti-TGFβ Antikörpers erzielt werden. M2c-Makrophagen dominieren gegen Ende des Heilungsprozesses und vermitteln v.a. einen anti-inflammatorischen Effekt ^{207,211}. Eine Identifikation erfolgt durch ihre spezifische Expression der Oberflächenmarker als CD45-, F 4/80-, CD11b-, CX3CR1-, CD206- positive und TGFβ-negative Zellen. Eine Quantifizierung dieser Subpopulation mittels FACS-Analyse zeigte nach Therapie mit dem anti-TGFβ

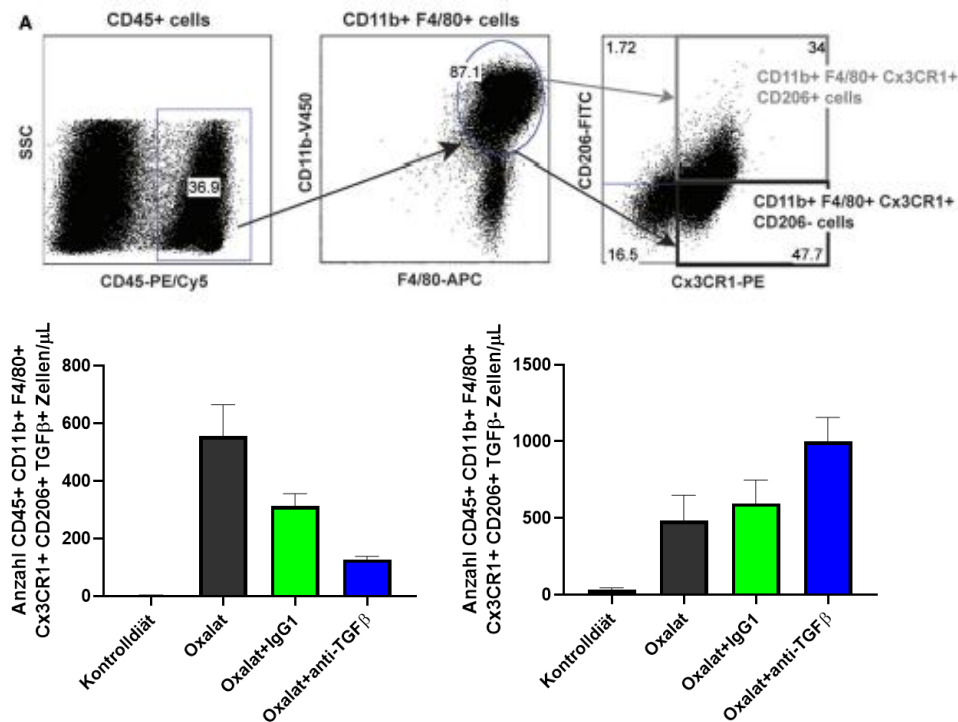


Abbildung 24: Modulation der Makrophagendifferenzierung hinzu einem protektiven anti-inflammatorischen M2c-Makrophagen Phänotyp durch die anti-TGFβ Therapie. Die C57BL/6N - Mäuse wurden mit einer oxalatreichen Spezialdiät oder der Kontrolldiät gefüttert. Zudem wurde alle 48 Stunden der anti - TGFβ Antikörper 1D11 oder die IgG1 – Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert. Nach 14 Tagen wurde die renale Makrophagenpopulation analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

Antikörper eine signifikante Zunahme der M2c-Makrophagenpopulation (siehe Abbildung 24). Die Gabe der IgG1-Isotypenkontrollen hatte keinen Effekt auf die M2c-Makrophagenpopulation (siehe Abbildung 24). Zusammenfassend zeigten die aufgeführten Ergebnisse, dass durch die anti-TGFβ Therapie sowohl die Fibrogenese als auch die Inflamationsreaktion im murinen Mausmodell der Oxalat-Nephropathie signifikant inhibiert wird. Dieser Effekt ist assoziiert mit einer Verschiebung der Makrophagenpopulation von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen und pro-fibrotischen M2a-Makrophagen hinzu einem dominierenden anti-inflammatorischen M2c-Makrophagen Phänotyp (siehe Abbildungen 22 und 24).

3.6 Effekte der anti-TGFβ Therapie auf die Nierenfunktion

Die bisherigen Kapitel konnten zeigen, dass die Therapie mit dem anti-TGFβ Antikörper 1D11 die Nephrokalzinose und die daraus resultierende Kristallbildung, Entzündungsreaktion und

Fibrosierung des Nierengewebes signifikant vermindert. Entscheidend für den betroffenen Patienten und seine langfristige Prognose ist es, den Verlust von Nephronen zu verhindern und damit seine Nierenfunktion zu erhalten¹. Ob eine Inhibition der Fibrogenese im Rahmen einer Nephropathie sich günstig auf den Erhalt der Nierenfunktion auswirkt, bleibt strittig. Je nach untersuchter Pathologie und Therapieansatz konnte sowohl ein protektiver als auch ein schädlicher oder ausbleibender Effekt der antifibrotischen Therapie auf die Nierenfunktion gezeigt werden^{181,182, 183, 184, 187, 188, 189}. Leider ist die Anzahl der Forschungsarbeiten, welche die GFR als Endpunkt heranziehen limitiert¹⁶⁵. Im Folgenden soll daher untersucht werden, ob sich die antikörperbasierte anti-TGF β Therapie der Nephrokalzinose protektiv auf den Erhalt der Nephrone und damit die Nierenfunktion auswirkt.

3.6.1 Effekte der anti-TGF β Therapie auf die mRNA-Expression renaler tubulärer Schädigungsmarker

Im ersten Schritt untersuchten wir renale Schädigungsmarker auf mRNA-Ebene um das Ausmaß der Tubulusschädigung im Rahmen der Nephrokalzinose und den jeweiligen Interventionsgruppen zu quantifizieren. Das *Kidney-Injury-Molecule-1* (KIM-1) ist ein Transmembranprotein des proximalen Tubulus, dessen Expression im Rahmen einer Tubulusschädigung hochreguliert wird²¹⁶. Die *Tissue inhibitor of metalloproteinases 2* (TIMP2) ist ein weiteres Molekül, welches im Rahmen eines Nierenversagens hochreguliert wird.

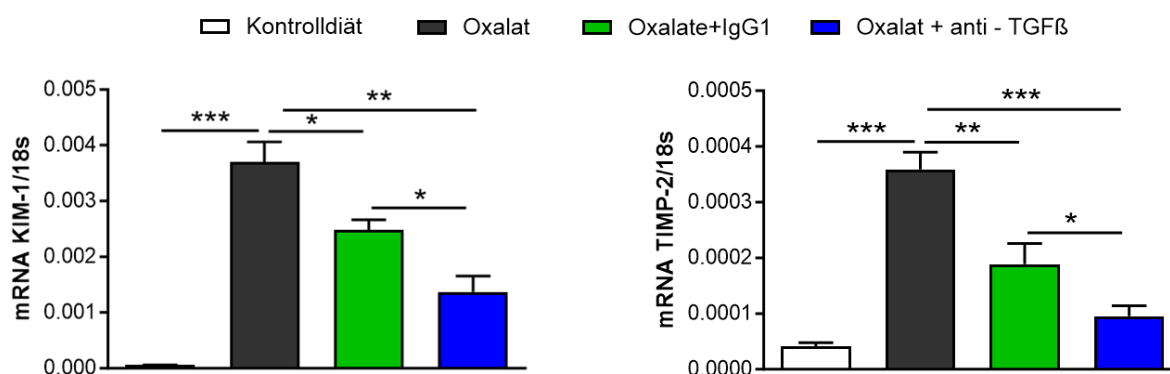


Abbildung 25: Reduktion der mRNA-Expression der tubulären Schädigungsmarker KIM-1 und Timp-2 durch die anti-TGF β Therapie. Die C57BL/6N - Mäuse wurden mit einer oxalatreichen Spezialdiät oder der entsprechenden Kontrolldiät gefüttert. Zudem wurde alle 48 Stunden der anti - TGF β Antikörper 1D11 oder die IgG1 – Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert. Nach 14 Tagen wurde die renale mRNA – Expression tubulärer Schädigungsmarker analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

TIMP2 gilt als Induktor der G1-Phase des Zellzyklusarrests einer Zelle. Nach einer akuten renalen Schädigung treten einige Tubuluszellen in die G1-Phase des Zellzyklusarrests ein. Es wird vermutet, dass die Tubuluszelle diesen Zeitraum nutzt, um DNA-Schäden zu reparieren²¹⁷. Die mRNA-Expression der renalen Tubulusschädigungsmarker *KIM1* und *Timp2* wurde bei den Tieren mit Nephrokalzinose um fast das Vierfache hochreguliert (siehe Abbildung 25). Nach Gabe der IgG1-Isotypenkontrolle verminderte sich die mRNA-Expression von *KIM1* und *Timp2* um fast die Hälfte (siehe Abbildung 25). Nach der Therapie mit dem anti-TGF β Antikörper konnte die mRNA-Expression von *KIM1* und *Timp2* im Vergleich zur IgG1-Isotypenkontrolle weiter signifikant reduziert werden (siehe Abbildung 25). Diese Daten lassen vermuten, dass sowohl der anti-TGF β Antikörper als auch die IgG1-Isotypenkontrolle das Ausmaß der Tubulusschädigung vermindern können. Hervorzuheben ist jedoch, dass der Effekt bei Gabe des anti-TGF β Antikörpers deutlich ausgeprägter ist als bei der IgG1-Isotypenkontrolle. Da mRNA-Expressionsanalysen nur hinweisend und nicht beweisend für das tatsächliche Ausmaß der Tubulusschädigung sind, erfolgten als Nächstes histopathologische Analysen des Nierengewebes.

3.6.2 Effekte der anti-TGF β Therapie auf das Ausmaß der tubulären Schädigung

Bei der Oxalatnephropathie handelt es sich vorrangig um eine Tubulopathie¹⁸⁵. Um herauszufinden, inwieweit die Inhibition der TGF β Signalkaskade den Untergang von Tubuli im Rahmen der Oxalatnephropathie verhindern kann, erfolgte eine histopathologische Untersuchung des Nierengewebes. Zunächst wurde eine PAS-Färbung der Nierenschnitte durchgeführt. Anschließend wurde zur Quantifizierung des renalen Schadens ein Tubulus-Schädigungs-Score erhoben (siehe Kapitel 2.2.7.1.). Beurteilt wurde in diesem Score der Anteil nekrotischer, dilatierter Tubuli sowie der Nachweis von intratubulärer Castformation. Während bei der Kontrollgruppe der Anteil an nekrotischen, dilatierten Tubuli mit Casts bei unter 10% lag, betrug dieser Anteil bei den Versuchstieren mit Oxalatnephropathie im Mittel 61-80% (siehe Abbildung 26). Durch die Applikation der IgG1-Isotypenkontrolle konnte dieser Anteil auf 41-60% vom gesamten Nierengewebe reduziert werden. In der Gruppe, welche den anti-TGF β Antikörper erhalten hatte, lag der Anteil nur noch bei 11-20% (siehe Abbildung 26). Den Therapieerfolg der IgG1-Isotypenkontrolle führen wir a.e. auf die Inhibition der Kristallformation zurück. Der additive protektive Effekt des anti-TGF β Antikörpers kann a.e.

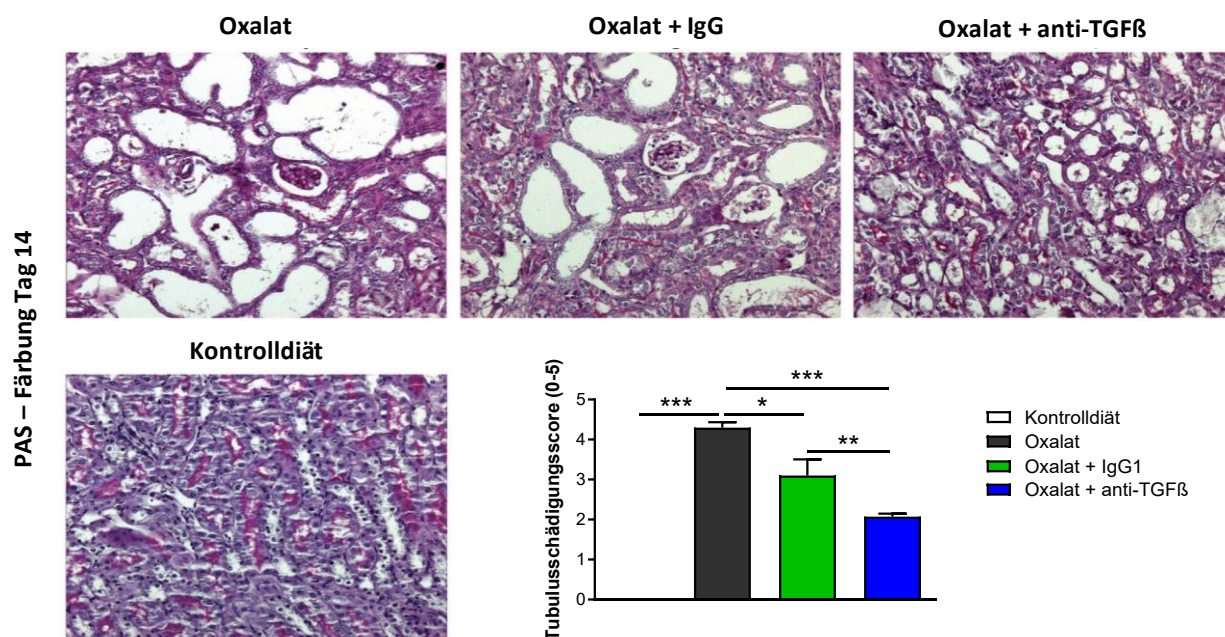


Abbildung 26: Inhibition des Ausmaßes der tubulären Schädigung im Modell der chronischen Oxalatnephropathie durch die anti-TGFβ Therapie. Die C57BL/6N - Mäuse wurden mit einer oxalatreichen Spezialdiät oder der entsprechenden Kontrolldiät gefüttert. Zudem wurde alle 48 Stunden der anti - TGFβ AK 1D11 oder die IgG1 – Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert. Nach 14 Tagen wurde eine PAS-Färbung des Nierengewebes durchgeführt. Kriterien bei der Quantifizierung des Tubulusschadens mit dem genannten Score war der Anteil an nekrotischen Tubuli, dilatierten Tubuli und Castformationen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, n=5. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

durch die in den vorherigen Kapiteln dargestellte anti-fibrotische und anti-inflammatorische Wirkung erklärt werden. Wir fassen daher zusammen, dass die antikörperbasierte anti-TGFβ Therapie das Ausmaß der Tubulusschädigung im murinen Mausmodell der chronischen Oxalatnephropathie effektiv vermindert.

3.6.3 Effekte der anti-TGFβ Therapie auf die Nierenretentionsparameter

Die vorausgehenden Kapitel zeigten, dass die Therapie mit dem anti-TGFβ Antikörper den Untergang von Tubuli durch die Nephrokalzinose und die daraus resultierende Fibrose effektiv vermindert. Zielsetzung der folgenden Analyse war es daher zu zeigen, inwiefern sich die Therapie auf die Nierenfunktion auswirkt. Hierfür bestimmten wir zunächst die Kreatinin- und Harnstoff-Stickstoff (BUN) - Spiegel im Serum der Versuchstiere an Tag 14 (siehe Abbildung 27). Bei den Versuchstieren, welche 14 Tage lang oxalatreiches Futter erhalten hatten, zeigte sich ein rapider Anstieg von Kreatinin und BUN im Serum (siehe Abbildung 27). Der Kreatinin-Mittelwert stieg unter Gabe des oxalatreichen Futters im Vergleich zur Kontrolldiät um das 4-

fache ($0,41 \pm 0,09$ mg/dl vs. $1,69 \pm 0,12$ mg/dl). Nach Gabe des anti-TGF β Antikörper zeigte sich eine Reduktion des Kreatinins um 41% ($1,69 \pm 0,12$ mg/dl vs. $0,99 \pm 0,16$ mg/dl) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Oxalatnephropathie ohne Therapieintervention. Derselbe Effekt zeigte sich bei den BUN-Serumspiegeln, hier konnte durch die anti-TGF Therapie eine Normalisierung des BUN-Spiegels erzielt werden. Wir schlussfolgern daher, dass sich die anti-TGF β Therapie im murinen Mausmodell der chronischen Oxalatnephropathie protektiv auf den Erhalt der Nierenfunktion auswirkt. Es muss hierbei angemerkt werden, dass Schwankungen der BUN- und Kreatinin-Serumspiegel auch unabhängig von Veränderungen der GFR zu beobachten sind ²¹⁸. Der BUN-Serumspiegel zeigt zum Beispiel nach einer erhöhten enteralen Eiweißzufuhr, einer Blutung oder einem Trauma einen Anstieg ²¹⁹. Die Kreatinin-Messung und die daraus abgeleitete geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) ist aktuell nach KDIGO der Goldstandard zur Beurteilung der Nierenfunktion ²²⁰. Allerdings unterliegt auch diese Messmethode einigen Limitationen. Der Kreatinin-Serumspiegel ist einerseits abhängig von der endogenen Produktion also im Wesentlichen von der Muskelmasse ²²¹. Andererseits wird Kreatinin nicht nur über die glomeruläre Basalmembran filtriert, sondern auch im proximalen Tubulus sezerniert. In den frühen Stadien des chronischen Nierenversagens wird kompensatorisch mehr Kreatinin sezerniert, sodass sich der Abfall der GFR nicht am gemessenen Kreatinin-Spiegel zeigt. Erst bei einem Ausfall von mehr als 50-60% der Nephronen kommt es zu einem Kreatinin-Anstieg ²²². Darüber hinaus wird bei dem angewandten Assay nach Jaffé der Kreatinin Wert überschätzt, ein Effekt der umso ausgeprägter zum Tragen kommt je höher der Kreatinin-Wert ²²³. Im nächsten Schritt bestimmten wir daher die GFR mittels einer neuartigen Messung nach Schock-Kusch *et al.*,

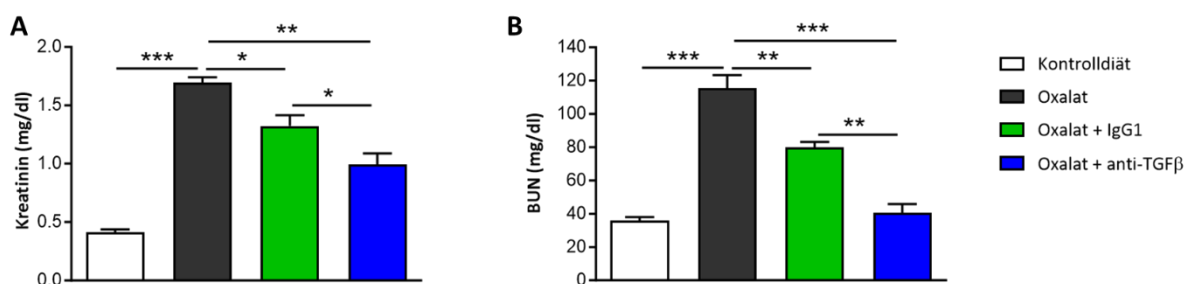


Abbildung 27: Verbesserung der Nierenfunktion im Modell der chronischen Oxalatnephropathie durch die anti-TGF β Therapie. Die C57BL/6N - Mäuse wurden mit einer oxalatreichen Spezialdiät oder der entsprechenden Kontrolldiät gefüttert. Zudem wurde alle 48 Stunden der anti - TGF β AK 1D11 oder die IgG1 - Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert. Nach 14 Tagen wurden in dem gewonnenen Serum der Harnstoff-Stickstoff- und der Kreatinin-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n=5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (one-way ANOVA mit Tukey's post-doc Test).

welche eine weitaus exaktere Erhebung der GFR ermöglicht ¹⁸⁷.

3.6.4 Effekte der anti-TGF β Therapie auf die glomeruläre Filtrationsrate

Ziel dieses Experiments war es zu untersuchen, inwieweit sich die Inhibition der Fibrosierung auf den progressiven Abfall der GFR im Rahmen der Nephrokalzinose auswirkt. Die gängigen Methoden zur Bestimmung der GFR wie Erhebung der Nierenretentionsparameter unterliegen zahlreichen Limitationen (siehe Kapitel 3.6.3). Wir wählten zur bestmöglichen Messung der tatsächlichen GFR die transkutane GFR-Messung von FITC-Sinistrin nach Schock-Kusch *et al.* (siehe Kapitel 2.2.4.) ¹⁸⁷. Sinistrin ist ein Polyfructosan, welches den Versuchstieren intravenös injiziert wird und anschließend ausschließlich glomerulär filtriert wird ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Durch Konjugation mit dem Fluoreszenz Isothiocyanat (FITC) kann die Halbwertszeit des Fluoreszenzsignals mittels eines kutan angebrachten Detektors bestimmt und damit die glomeruläre Filtrationsrate berechnet werden ¹⁸⁷. Der hierbei angewandte mathematische Algorithmus berücksichtigt hierbei auch die sequenzielle Verteilung von FITC-Sinistrin während des Injektionsprozesses, sowie anschließend in den Kompartimenten Plasma und Interstitium ¹⁹³ (siehe Kapitel 2.2.4.). Wir bestimmten die GFR während der Studie I (siehe Kapitel 2.2.3.) bei den Versuchstieren der jeweiligen Kontroll- und Interventionsgruppen an Tag 0 und 14. In Abbildung 28A ist beispielhaft das Fluoreszenzsignal einer C57BL/6N-Maus zu sehen, welche 14 Tage lang das Kontrollfutter erhalten hatte. Kurz nach intravenöser Injektion von FITC-Sinistrin steigt das Fluoreszenzsignal rapide an und fällt durch die renale Clearance innerhalb von ca. 90 Minuten auf das Ausgangsniveau ab. Nach 14-tägiger Diät mit dem oxalatreichen Futter ist die renale Clearance von FITC-Sinistrin deutlich beeinträchtigt, was daran zu sehen ist, dass das detektierte Fluoreszenzsignal nach 90 Minuten weiterhin nahe am gemessenen Maximalwert liegt (siehe Abbildung 28B). Durch die antikörperbasierte anti-TGF β Therapie konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe mit der IgG1-Isotypenkontrolle die renale Clearance von FITC-Sinistrin deutlich angehoben werden. Dies ist an dem schnelleren Abfall des Fluoreszenzsignals zu sehen (siehe Abbildung 28C). Die Halbwertszeit von FITC-Sinistrin ($t_{1/2}$) stellt die Zeit dar, nach welcher 40% des maximalen Fluoreszenzsignals erreicht wurden. Über den in Kapitel 2.2.4 aufgeführten mathematischen Algorithmus wurde zunächst die GFR an Tag 0 und 14 der Studie berechnet.

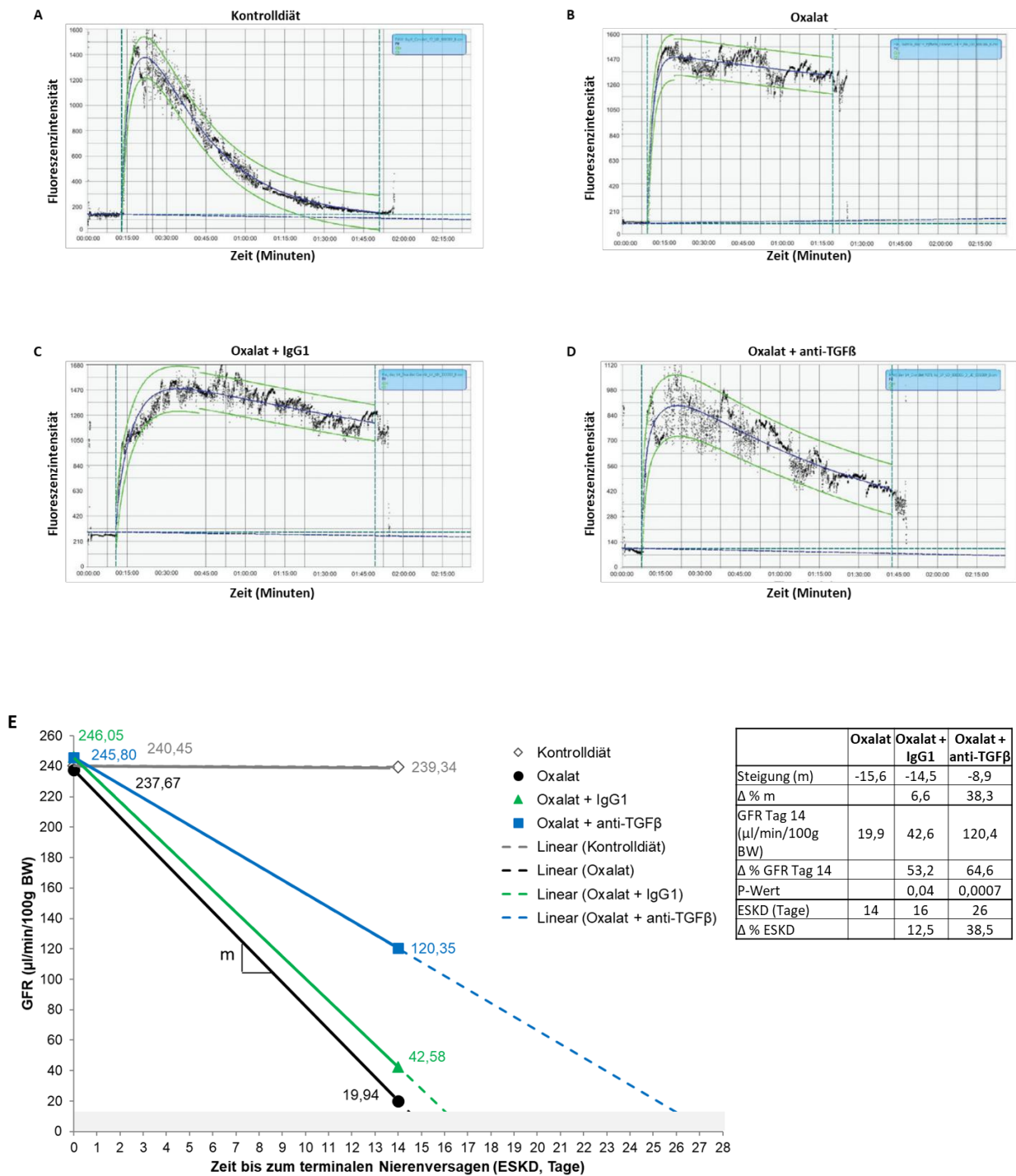


Abbildung 28: Verlangsamung des Verlusts der glomerulären Filtrationsrate durch die anti-TGFβ Therapie im Modell der chronischen Oxalatnephropathie. Die C57BL/6N - Mäuse wurden mit einer oxalatreichen Spezialdiät oder der entsprechenden Kontrolldiät gefüttert. Zudem wurde alle 48 Stunden der anti - TGFβ Antikörper 1D11 oder die IgG1 - Isotypenkontrolle 13C4 via ip.-Injektion appliziert. An Tag 0 und 14 der Studie wurde an den wachen Mäusen die GFR via FITC-Sinistrin gemessen. Graphik A zeigt den physiologischen Abfall der Fluoreszenzintensität bei einer nierengesunden Maus. In Graphik B ist zu sehen wie die Fluoreszenz-Aktivität kaum abfällt, da die Niere den Metaboliten nicht mehr eliminieren kann. In C und D ist zu sehen wie die jeweilige Antikörpertherapie zu einer Verbesserung der GFR und damit Eliminationsrate von FITC-Sinistrin führt. Graphik E zeigt, dass durch die anti-TGFβ Therapie der Abfall der glomerulären Filtrationsrate signifikant vermindert und damit das geschätzte Zeit bis zum Eintreten des terminalen Nierenversagens um 10 Tage hinausgezögert werden kann.

Im nächsten Schritt berechneten wir die Steigung der durchschnittlichen täglichen Abnahme der glomerulären Filtrationsrate. Mithilfe des durchschnittlichen GFR-Wertes an Tag 0 und Tag 14 sowie der Steigung konnte eine lineare Gleichung aufgestellt werden (siehe Abbildung 28E). Unter der Annahme, dass die GFR weiterhin einen kontinuierlich linearen Abfall zeigt, konnte mithilfe dieser Geradengleichung der Zeitpunkt bei Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz berechnet werden (siehe Abbildung 28E). Die terminale Niereninsuffizienz wurde gemäß KDIGO als eine GFR kleiner oder gleich $15 \mu\text{l/min/100g KG}$ definiert ³.

An Tag 14 der Studie zeigte sich in der Gruppe, welche oxalatreiches Futter erhalten hatte, nur noch eine durchschnittliche GFR von $19,9 \pm 6,6 \mu\text{l/min/100g KG}$, was insgesamt einem GFR-Verlust von 92% entspricht (siehe Abbildung 28E). Die Steigung m der Geradengleichung der Oxalat-Gruppe betrug $-15,6$, was gleichbedeutend mit einem durchschnittlichen GFR-Verlust von $15,6 \mu\text{l/min/100g KG}$ pro Tag ist (siehe Abbildung 28E).

Durch die IgG1-Therapie konnte die Steigung m auf $14,5$ reduziert werden. An Tag 14 zeigte sich in dieser Interventionsgruppe mit durchschnittlich $42,6 \pm 14 \mu\text{l/min/100g KG}$ eine mehr als doppelt so hohe GFR als in der Kontrollgruppe ohne Therapie ($19,9$ vs. $42,6 \mu\text{l/min/100g KG}$, $\Delta = 53,2\%$, $p = 0,04$). Der größte Therapieerfolg konnte mit dem anti-TGF β Antikörper erzielt werden. Hierbei konnte der GFR-Abfall um $38,3\%$ vermindert werden ($m_{\text{Oxalat} + \text{IgG1}} -14,5$ vs. $m_{\text{Oxalat} + \text{TGF}\beta} -8,9$). In der Gruppe, welche den anti-TGF β Antikörper erhalten hatte, zeigte sich an Tag 14 im Vergleich zur Kohorte mit der IgG1-Isotypenkontrolle eine 2,8-fach höhere GFR ($42,6$ vs. $120,4 \mu\text{l/min/100g KG}$, $\Delta = 64,6\%$, $p = 0,0007$) (siehe Abbildung 28E). Unter der Annahme eines kontinuierlichen, linearen GFR-Abfalls kann die anti-TGF β Therapie im Vergleich zur IgG1-Isotypenkontrolle das Eintreten des terminalen Nierenversagens somit um 10 Tage hinauszögern (siehe Abbildung 28E). Die aufgeführten Daten zeigen, dass sich die anti-TGF β Therapie protektiv auf den Erhalt der Nierenfunktion auswirkt.

In dem eben aufgeführten Experiment wurde die jeweilige Antikörper-Therapie unmittelbar nach Beginn mit der Fütterung des oxalatreichen Futters begonnen. Im klinischen Alltag ist ein früher Therapiebeginn aufgrund einer verzögerten Diagnosestellung oft nicht möglich ¹⁰⁶. Im Folgenden untersuchten wir daher den nierenprotektiven Effekt bei einem verzögerten Therapiestart der Antikörpertherapie.

3.7 Effekte der anti-TGF β Therapie bei verzögertem Beginn

Das vorausgehende Kapitel zeigte, dass eine frühzeitige Therapie mit dem anti-TGF β Antikörper den progressiven Verlauf des Nephrokalzinose-assoziierten Nierenversagens signifikant verlangsamen kann. Im klinischen Alltag ist ein Therapiebeginn im Frühstadium einer Nephrokalzinose nicht immer möglich. Nicht selten kann im klinischen Alltag eine Diagnose erst bei einem fortgeschrittenen Nierenversagen gestellt werden ¹⁰⁶. In dem folgenden Experiment untersuchten wir daher den Effekt eines verzögerten Therapiebeginns. Wir starteten im Folgendem die Therapie mit dem anti-TGF β Antikörper 1D11 und der IgG1-

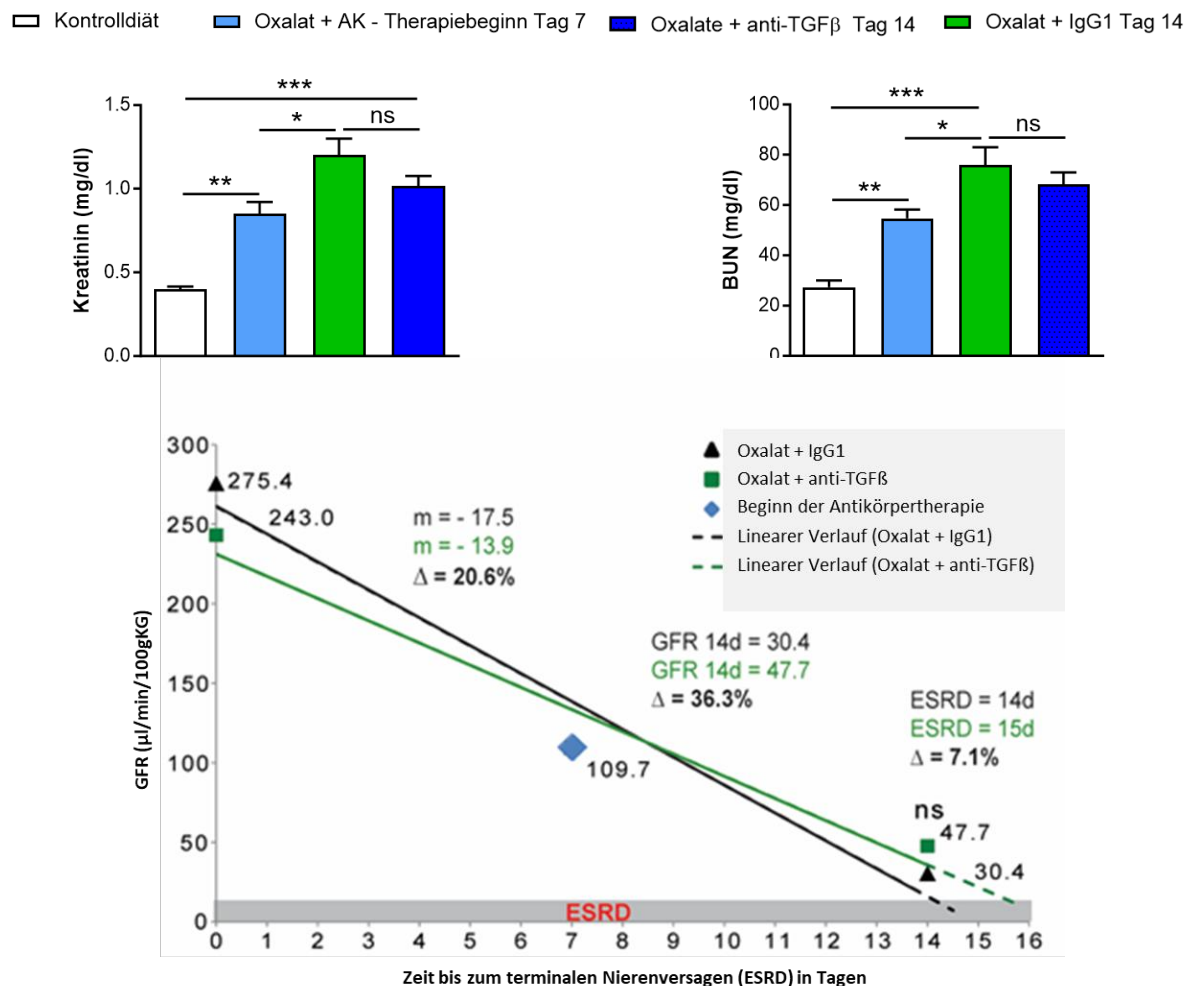


Abbildung 29: Kein protektiver Effekt auf die Nierenfunktion durch die anti-TGF β Therapie bei einem verzögertem Therapiebeginn. Die C57BL/6N - Mäuse wurden mit einer oxalatreichen Spezialdiät oder der entsprechenden Kontrolldiät gefüttert. An Tag 7 wurde mit der jeweiligen Antikörpertherapie begonnen, hierbei wurde einer Interventionsgruppe alle 48 Stunden der anti-TGF β Antikörper 1D11 iv. injiziert, während einer weiteren Gruppe die IgG1-Isotypenkontrolle appliziert wurde. An Tag 0, 7, 14 wurde Blut zu BUN und Kreatinin-Bestimmung abgenommen. Zudem wurde an den wachen Mäusen mittels FITC-Sinistrin die GFR bestimmt. Letztendlich kann bei einem verspäteten Beginn der Therapie das Fortschreiten des chronischen Nierenversagens nicht verlangsamt werden.

Isotypenkontrolle 13C4 an Tag 7 der Studie II (siehe Kapitel 2.2.3, siehe Abbildung 5). Wir führten an Tag 0, 7 und 14 eine transkutane GFR-Messung durch und entnahmen Blutproben zur Bestimmung der Kreatinin- und BUN-Spiegel. An Tag 7 bestand bereits eine schwere Beeinträchtigung der Nierenfunktion, was sich an einem signifikanten Anstieg des BUN- und vor allem des Kreatinin-Spiegels zeigt (siehe Abbildung 29). Nach Beginn der anti-TGF β Therapie zeigte sich ein fortschreitender signifikanter Anstieg von Kreatinin und BUN im Serum (siehe Abbildung 29). An Tag 14 bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Nierenretentionsparametern der Gruppe, welche den anti-TGF β Antikörper 1D11 erhalten hatte und der Kohorte mit der IgG1-Isotypenkontrolle 13C4 (siehe Abbildung 29). Die GFR-Messung an Tag 14 zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der anti-TGF β Therapie und der IgG1-Isotypenkontrolle (siehe Abbildung 29). Bei der Berechnung des Zeitpunkts bei Eintreffen des mutmaßlichen terminalen Nierenversagen sahen wir keine signifikante Verbesserung durch die Therapie mit dem anti-TGF β Antikörper (siehe Abbildung 29). Aus den eben aufgeführten Daten kann abgeleitet werden, dass die verzögerte anti-TGF β Therapie im murinen Mausmodell der chronischen Oxalatnephropathie keine protektive Wirkung auf den Verlust der Nierenfunktion hat.

4 Diskussion

Organschädigungen, denen pathophysiologisch eine durch Kristalle oder Mikropartikel induzierte Organschädigung zu Grunde liegt, sind für einen Großteil von akuten und chronischen Erkrankungen in unserer Gesellschaft verantwortlich ²⁹. Die Bandbreite der kristall-induzierten Nephropathien ist groß, sie reicht von den renovaskulären Kristallopathien, über die Urolithiasis bis hin zur umfangreichen Gruppe der tubulären Kristallopathien ³⁹. Kristall-induzierte Nephropathien sind häufig mit einer lokalen Entzündungsreaktion, einer Tubulusschädigung und einer progressiven interstitiellen Fibrose assoziiert ³³. In dieser Arbeit wählten wir das Mausmodell der sekundären, chronischen Oxalatnephropathie nach Knauf *et al.* ¹⁸⁴ / Mulay *et al.* ¹⁸⁵. Bei diesem Modell kommt es im Rahmen der Nephrokalzinose zu einer progressiven Fibrosierung mit schwerem, chronischem Nierenversagen und hoher Morbidität ^{33,185}.

Die Hypothese dieser Arbeit lautet wie folgt: *Inhibition der TGFβ-Signaltransduktionswege, mittels eines IgG-basierten Antikörpers inhibiert sowohl die Kalziumoxalatdeposition im Nierenparenchym als auch die Fibrogenese. Durch diesen synergistischen Effekt kann das Fortschreiten des progressiven chronischen Nierenversagens verlangsamt werden. Entscheidend für den Therapieerfolg ist ein früher Therapiebeginn.*

In unserem Modell der chronischen Oxalatnephropathie wird über eine hohe enterale Zufuhr von Oxalat eine Nephrokalzinose mit konsekutiv fortschreitendem chronischen Nierenversagen induziert. Ein fundamentaler Effekt der antikörperbasierten anti-TGFβ-Therapie ist eine verminderte Kalziumoxalatdeposition im Nierengewebe. Additiv hierzu konnte durch die Blockade der TGFβ-Rezeptoren eine Inhibition der Inflammation und der Fibrogenese erzielt werden. Als einer der zu Grunde liegenden Mechanismen konnte eine Verschiebung der Makrophagenpopulation von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen und pro-fibrotischen M2a-Makrophagen hinzu einem dominierenden anti-inflammatorischen M2c-Makrophagen Phänotyp identifiziert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die anti-TGFβ Therapie eine Reprogrammierung des Metabolismus zur Folge hat, indem der im gesunden Nierengewebe dominierende Stoffwechselweg im Modell der chronischen Oxalatnephropathie erhalten bleibt. Im Folgenden sollen die eben genannten Punkte ausführlich diskutiert werden.

4.1 Die antikörperbasierte anti-TGF β Therapie inhibiert die renale Kristallformation

Etwa 80% aller Nierensteine bestehen aus Kalziumoxalat. Je nach Lokalisation der Kalziumoxalatablagerungen führen die Kristalle zu verschiedenen Krankheitsbildern. Bei Ablagerung in den ableitenden Harnwegen kann dies zu einer Urolithiasis führen, wohingegen Kristallformationen im Nierengewebe eine Nephrokalzinose mit einem progressivem chronischem Nierenversagen zur Folge haben ²²⁴. Die Kristallformation in der Niere ist ein dynamischer Prozess, welcher von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Neben der Konzentration der Salze, sind der vorliegende pH-Wert, die Temperatur sowie interagierende Proteine und viele weitere Faktoren an der Kristallisation beteiligt ^{38,37}. Strukturanalysen ergaben, dass fast die gesamte Oberfläche von Kalziumoxalatkristallen von Proteinen oder anderen organischen Molekülen bedeckt ist ²²⁵. Experimente mit extrahierten Proteinen aus Nierensteinen zeigten, dass Proteine das Kristallwachstum fördern können, u.a. indem sie als eine Art „Bindeglied“ zwischen kleineren Kristalleinheiten fungieren ²²⁶. Die Interaktion zwischen Kristallen und Proteinen wird dabei vermutlich über multivalent geladene Proteine, welche jeweils eine Bindung mit angrenzenden Kristallgitterstrukturen eingehen, vermittelt ²²⁷. Im Gegensatz dazu, konnten im Urin zahlreiche Proteine wie Uromodulin, Nephrokalzin oder Uropontin identifiziert werden, welche die Kristallformation im Tubulus vermindern ^{228,229}. Bei Patienten mit rezidivierender Urolithiasis oder Nephrokalzinose konnten korrelierend zu den *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen niedrigere Konzentrationen dieser Kristallisationsinhibitoren im Urin nachgewiesen werden ^{228 229}. Neben Proteinen können sich auch Makromoleküle wie Glykosaminoglykane oder Phospholipide inhibitorisch auf die Kristallformation auswirken ²³⁰. Ein wichtiger Schritt in der Kristallformation im Tubulus ist eine Zell-Kristall-Interaktion. Damit Kristalle im Tubulus wachsen können, müssen sie sich an die Oberflächenproteine der apikalen Seite der Tubuluszellen anheften können. Bislang konnte eine Vielzahl solcher Moleküle identifiziert werden, einige Beispiele hierfür sind Annexin II oder Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF-Rezeptoren), welche die Aggregation von Kalziumoxalatkristallen fördern ^{200,231}.

Unsere Daten zeigen, dass nach Gabe des anti-TGF β Antikörpers 1D11 und dessen Isotypenkontrolle 13C4 die Oxalatkonzentrationen im Serum signifikant abfallen (siehe Abbildung 13). Immunglobulin G besitzt etwa eine Größe von 150kDa, womit das Immunglobulin nicht die glomeruläre Basalmembran passieren und damit nicht lokal

innerhalb des Tubulussystems im Urin wirken kann ²³². Die *in vitro*-Daten zeigen, dass nach Inkubation von löslichem Oxalat mit der IgG1-Isotypenkontrolle oder dem entsprechendem IgG F(ab')₂ – Fragment weniger freies Oxalat messbar ist (siehe Abbildung 11). Bei Proteinen wie BSA konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11). Diese Daten lassen vermuten, dass sowohl der anti-TGFβ Antikörper 1D11 und die IgG1-Isotypenkontrolle 13C4 direkt freies Oxalat im Serum in irgendeiner Form binden oder dessen Elimination oder Abbau fördern, womit es nicht mehr über die glomeruläre Basalmembran filtriert werden kann. Marschner et al. zeigte, dass Pentraxin3, ein im Blut frei zirkulierendes Opsonin, als endogener Inhibitor der Kalziumoxalatformation und dem Nephrokalzinose-assoziierten chronischen Nierenversagen fungiert. Genau wie in unserer Arbeit konnte durch das Protein Pentraxin3 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Kristallformation vermindert werden ²³³. Arbeiten aus dem Bereich der Gicht-Forschung ergaben, dass *in vivo* spezifische IgM- und IgG-Antikörper gegen Mononatriumurat-Kristalle gebildet werden. Allerdings zeigten die Forschungsergebnisse hier eine fördernde Wirkung der Antikörper auf die Kristallbildung ²³⁴. Antikörper können die Kristallformation *in vivo* sowohl hemmen als auch fördern. Deshalb sollte der Effekt der Antikörpertherapie auf die Kristallbildung bei Anwendung des murinen Mausmodells als CKD-Modell beachtet werden.

Eine sehr seltene Ursache einer schweren Form der chronischen Oxalatnephropathie stellt die primäre Hyperoxalurie vom Typ I dar. Hierbei handelt es sich um eine autosomal-rezessive vererbte Störung des Glykoxylat-Stoffwechsels mit einem Defekt der hepatischen Glykoxylat-Aminotransferase. Dadurch kommt es zu einer Überproduktion von Oxalat, welches sich erst in Form von Kalziumoxalatkristallen in der Niere und im Verlauf auch in weiteren Organen abgelagert. Ohne eine effektive Therapie entwickelt ca. die Hälfte der Patienten im jungen Erwachsenenalter ein terminales Nierenversagen. Bis vor kurzem stellte die kombinierte Leber- und Nierentransplantation die einzig kurative Therapie dar. Im Jahr 2020 wurde Lumasiran von der US Food and Drug Administration (FDA) als Primärtherapie der primären Hyperoxalurie Typ I zugelassen. Lumasiran ist ein Vertreter der RNAi-Therapeutika, eine neue Wirkstoffklasse von kleinen, doppelsträngigen Ribonukleinsäuren (small interfering RNA, siRNA). Lumasiran wird spezifisch in der Leber aufgenommen und führt dort über RNA-Interferenzen zu einem vermehrten Abbau der mRNA der Glykolatoxygenase und somit zu einer verminderten Translation des Enzyms. Dadurch wird weniger Glykoxylat produziert, welches im Rahmen der PH Typ I in Oxalat umgewandelt wird. Phase-III-Studien konnten zeigen, dass

die Mehrheit der Patienten nach 6-monatiger Gabe von Lumasiran eine normale oder annähernd normale Oxalat-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin aufwiesen²³⁵. Für die PH Typ II und III und die meisten Formen der Nephrokalzinose oder Urolithiasis stehen bislang nur supportive Maßnahmen wie eine hohe Flüssigkeitszufuhr oder je nach Fall eine Ansäuerung oder Alkalisierung des Urins zur Verfügung^{89,90}. Weitere Forschungsarbeiten im Bereich der Nephrokalzinosen sind notwendig, um für die zahlreichen Entitäten von Nephrokalzinosen zielgerichtete Therapien anbieten zu können.

4.2 Die Fibrogenese und deren kontroverser Effekt auf die Nierenfunktion

Durch die kristallinduzierte Inflammation und den Nephronenverlust kommt es zu einer Aktivierung von Fibroblasten als auch Akkumulation von Myofibroblasten und extrazellulärer Matrix. Eine fortschreitende Fibrose ist neben der chronischen Oxalatnephropathie in nahezu allen Formen des chronischen Nierenversagens zu finden^{159,160}. Ob es sich hierbei um eine Assoziation oder um einen kausalen Zusammenhang handelt, ist noch nicht abschließend geklärt. Die führende Fachmeinung geht von einer schädlichen Wirkung der Fibrose aus, wonach die Ausdehnung des fibrotischen Gewebes eine renale Ischämie und Verdrängung der Nierenregeneration zur Folge hat^{181,182}. Demgegenüber gibt es auch Forschungsarbeiten, die einen protektiven Effekt der Fibrose zeigen, welcher vermutlich über eine mechanisch stabilisierende Funktion des zusätzlichen Bindegewebes vermittelt wird¹⁶⁴.

Unsere Arbeit zeigte, dass ein vorzeitiger Beginn der anti-TGF β Therapie die Fibrogenese inhibiert und das Fortschreiten des chronischen Nierenversagens verlangsamt. Durch die Gabe des anti-TGF β Antikörpers 1D11 konnte die GFR um 283% im Vergleich zur IgG1-Isotypenkontrolle 13C4 verbessert werden (42,6 vs. 120,4 μ l/min/100g KG, $p = 0,0007$). Anwendung eines idealen linearen Modells zur Berechnung des GFR-Verlaufs ergab eine Verlängerung der Zeit bis zum Eintreten des terminalen Nierenversagens um 40%. Allerdings konnte bei einem verzögerten Therapiebeginn, ab Tag 7 der Studie, kein protektiver Effekt auf den Erhalt der Nierenfunktion nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass antifibrotische Therapien nur bei Beginn in einem bestimmten Zeitfenster einen protektiven Effekt auf die Nierenfunktion vermitteln können. Dies könnte der Grund dafür sein, dass die Antikörper-basierte anti-TGF β 1 Therapie im Rahmen einer Phase-II-Studie bei Patienten mit

einer diabetischen Nephropathie und damit einem bereits etablierten chronischen Nierenversagen keinen protektiven Effekt auf die Nierenfunktion zeigte²³⁶.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre beispielsweise, dass zu diesem Zeitpunkt bereits ein großer Anteil der Nephrone untergegangen ist und durch das fibrotische Gewebe die Vaskularisierung massiv verdrängt wurde.

Neben einem kritischen therapeutischen Fenster ist auch der Pathomechanismus der Nierenschädigung entscheidend, inwieweit sich eine Modulation der Fibrose, auf die Nierenfunktion auswirkt. Einen sehr differenzierten Einblick in die Auswirkungen der Fibrogenese auf die Nierenfunktion bietet die Forschungsarbeit von Buchtler *et al.*, welche zeigte, dass die Effekte der Fibrose abhängig von der zugrunde liegenden Pathologie sind. Eine homozygote Deletion von Kollagen Typ I in hämatopoetischen Zellen führte im Mausmodell der UUO und im Mausmodell der Adenin-induzierten Nephropathie zu einer 50%-igen Reduktion der Kollagen Typ I-Ablagerung in der Niere. Während im UUO-Modell die verminderte Kollagen Typ I-Produktion zu einem progressiven Abfall der GFR führte, war dies in der Adenin-induzierten Nephropathie mit einer verbesserten Nierenfunktion assoziiert. Bei der unilateralen Ureterligatur stellte sich die Kollagenbildung als protektiv dar, vermutlich ist die Fibrose in diesem Fall essenziell für die mechanische Stabilität der verbliebenen Nephrone, welche nach Ligatur einem erhöhten intrarenalen Filtrationsdruck standhalten müssen. Im Gegensatz hierzu war die zusätzliche intrazelluläre Matrix im Modell der Adenin-induzierten Nephropathie schädlich und führte zu einem progressiveren Verlust der Nierenfunktion²³⁷. Die Arbeit deckte zudem auf, dass die jeweilige zelluläre Quelle des Kollagens ebenfalls ausschlaggebend für den Effekt einer anti-fibrotischen Intervention ist. Im 6-Tages Modell der UUO hatte die Kollagenproduktion der hämatopoetischen Zellen keinen Einfluss auf die Nierenfunktion, während das Kollagen anderen zellulären Ursprungs essenziell für den Erhalt der Nierenfunktion war. Die Autoren diskutierten hierbei als pathophysiologische Ursache eine mangelnde Infiltration mit hämatopoetischen Zellen im 6-Tages Modell. Wie in der Arbeit dargestellt, nimmt die Kollagenproduktion durch die hämatopoetischen Zellen im 14-Tages-UUO Modell an Bedeutung zu. Im kürzeren 6-Tages Modell wird der überwiegende Kollagenanteil von residenten Zellen wie Fibroblasten oder Perizyten produziert. Darüber hinaus wurde auch diskutiert, dass residente und hämatopoetische Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation extrazelluläre Matrix an verschiedenen Nischen bzw. Strukturen

im Nierenparenchym ablagern²³⁷. Letztendlich konnten die Autoren nicht aufdecken, warum das Kollagen der hämatopoetischen Zellen im 6-Tages UUO Modell eine so unterschiedliche Wirkung wie das der residenten Zellen ausübt. Die Arbeit zeigt allerdings, dass sowohl der Zeitpunkt der Intervention als auch der gewählte Pfad der Fibrogenese entscheidend ist, inwiefern sich die anti-fibrotische Therapie auf die Nierenfunktion auswirkt. TGF β gilt als einer der zentralen Masterregulatoren der renalen Fibrogenese. Eine Überexpression von TGF β 1 führt meist zu einer Induktion der renalen Fibrose wohingegen eine Inhibition von TGF β 1 in zahlreichen renalen Erkrankungen eine Verminderung der Fibrogenese zur Folge hat¹⁷⁹. In unserer Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die antikörpervermittelte Inhibition von TGF β die fortschreitende interstitielle Fibrose im Modell der progressiven Nephrokalzinose effizient vermindert (siehe Abbildung 22). Dies zeigte sich sowohl in der Kernspintomographie mit einem signifikant verminderten Volumen an extrazellulärer Matrix als auch histologisch mit einem deutlich verminderten Anteil an α -SMA positiven Arealen (siehe Abbildung 22, 23). Wallace *et al.* untersuchten die Rolle von TGF β im Krankheitsmodell der autosomal-dominant polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD). Die Arbeitsgruppe induzierte in transgenen *Pkd1*^{RC/RC}-Mäusen, einem Mausmodell der autosomal-dominant polyzystischen Nierenerkrankung, eine lokale Überexpression von TGF β 1 in den Sammelrohren. Hierbei zeigte sich sowohl bei den homozygoten *Pkd1*^{RC/RC}-Mäusen mit polyzystischer Nierenerkrankung als auch der phänotypisch normalen *Pkd1*^{RC/+}-Mäusen eine extensive Zunahme der Fibrose²³⁸. Die Formation von Zysten bei den *Pkd1*^{RC/RC}-Mäusen wurde durch die lokale Induktion von TGF β nicht beeinflusst. Hierbei zeigte sich bei den *Pkd1*^{RC/RC}-Mäusen mit polyzystischer Nierenerkrankung eine signifikante Verschlechterung der Nierenfunktion. Als Parameter für die Nierenfunktion wurde eine BUN-Messung im Serum durchgeführt. Die Nierenfunktion bei den nierengesunden *Pkd1*^{RC/RC}-Mäusen hingegen blieb trotz TGF β 1 induzierter Fibrose erhalten. Allerdings zeigte sich bei der Überlebensrate eine signifikant niedrige Überlebenswahrscheinlichkeit bei den *Pkd1*^{RC/+}-Mäusen mit TGF β 1 induzierter Fibrose im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Fibrose²³⁸. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass auch in gesundem Nierengewebe eine Zunahme der Fibrose unter bestimmten Umständen langfristig zu einer Schädigung der Nephrone und letztendlich Rückgang der Nierenfunktion führt. Zudem zeigt die Arbeit erneut, dass nicht allein der Beginn einer Intervention oder Therapie, sondern auch der Zeitpunkt der Messung der Nierenfunktion entscheidend ist. Möglicherweise werden durch zu früh gewählte

Messzeitpunkte und Studienendpunkte Effekte übersehen, welche erst langfristig zum Tragen kommen. Eine Arbeit von McGaraughty *et al.*, welche ebenfalls einen antikörperbasierten Ansatz wählte, entwickelte einen bispezifischen Antikörper mit einer Bindungsstelle für TGF β und einer für *Fibronectin extra domain A* (Fn-EDA). Dies ermöglichte eine zielgerichtete Applikation des anti-TGF β Antikörpers in dem Bereich der Nierenschädigung. Hierdurch konnte im Modell der unilateralen Ureterligatur der fibrotische Umbau von Nierengewebe deutlich reduziert werden. Leider wurden in dieser Arbeit keine Nierenfunktionsparameter erhoben, sodass die Auswirkungen auf den Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz unklar bleibt ²³⁹.

Unsere Studie zeigte, dass die Gabe des anti-TGF β Antikörpers 1D11 die renale Fibrose und die Nephrokalzinose-assoziierte Niereninsuffizienz signifikant verbessert. Damit sind unsere Ergebnisse in Einklang mit einer Vielzahl an Publikationen, welche zeigen, dass TGF β in verschiedenen renalen Erkrankungen als einer der zentralen Induktoren und Regulatoren der glomerulären und tubulointerstitiellen Fibrogenese agiert ²⁴⁰. Eine überraschende Wendung brachte die Arbeit von Nlandu-Khodo *et al.*, welche *in vivo* in transgenen Mäusen eine spezifische Deletion des TGF β Rezeptors 2 in proximalen Tubuluszellen (PT) vornahm. Erstaunlicherweise führte dies im Modell der Aristolochiasäure-induzierten chronischen Niereninsuffizienz und im CKD-Modell der Angiotensin-II-vermittelten Niereninsuffizienz zu einer Progression des Tubulusschadens und der tubulointerstitiellen Fibrose. Pathophysiologisch zeigte sich, dass durch die Deletion des TGF β Rezeptors eine Imbalance der Wnt/ β -Catenin Signaltransduktionswege ausgelöst wurde, wodurch vermehrt proximale Tubuluszellen im G2-/M-Zellzyklusarrest verharrten und vermehrt profibrotische Mediatoren exprimiert wurden ²⁴¹. Im Gegensatz hierzu zeigte die Arbeitsgruppe, dass beim akuten Nierenversagen dieselbe Deletion des TGF β Rezeptors in proximalen Tubuluszellen einen protektiven Effekt vermittelte. So zeigte sich ein verminderter Tubulusschaden und eine verbesserte Nierenfunktion, indem es die Tubuluszellen vor Apoptose schützte ²⁴². Diese Arbeiten sind ein Beispiel dafür wie stark abhängig die Effekte der TGF β – Signaltransduktionswege vom Krankheitsmodell und vom jeweiligen Mikromilieu sind. Darüber hinaus demonstrieren sie, wie eng Nierengeneration und Fibrose beieinander liegen. Ein fundamentaler Aspekt bei der Erforschung der renalen Fibrose ist die gewählte Methodik zur Erhebung der Nierenfunktion. Sowohl im klinischen Alltag als auch in der experimentellen Forschung wird meist über die Messung von Kreatinin und Cystatin C im Serum die GFR unter

Anwendung von Näherungsformeln wie der MDRD-, CKD-EPI- oder Schwartz-Formel geschätzt³. Diese Methodik unterliegt einigen Limitationen, so ist der Kreatinin-Wert abhängig von der Muskelmasse des Körpers und wird nicht ausschließlich über den Glomerulus filtriert sondern auch über den proximalen Tubulus sezerniert²²¹. Wir bestimmten in dieser Arbeit ebenfalls das Serum-Kreatinin, womit bereits eine Verbesserung der Nierenfunktion durch die anti-TGF β Therapie gezeigt werden konnte. Zur Erhebung einer möglichst exakten GFR führten wir zudem eine *in vivo* GFR-Messung mithilfe des Fluoreszenz-markierten Filtrationsmarkers FITC-Sinistrin durch¹⁸⁸. Sinistrin wird ausschließlich glomerulär filtriert und wird nach aktuellem Kenntnisstand nicht endogen metabolisiert. Über die Eliminationsrate von FITC-Sinistrin kann die GFR des Versuchstieres berechnet werden. Der große Vorteil dieser Technik besteht darin, dass die Messung im Vergleich zu anderen Methoden an lebendigen sich frei bewegenden Versuchstieren durchgeführt werden kann und nicht unzählige Blut- und Urinproben der Versuchstiere abgenommen werden müssen. Ein Nachteil hierbei ist, dass durch die Aktivität der Versuchstiere u.a. Scherbewegungen zwischen dem Messgerät und der Haut als auch durch die Autofluoreszenz und die Hautdurchblutung Messabweichungen entstehen¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Zudem muss bei der Messung der FITC-Fluoreszenz neben dem Plasmavolumen des Versuchstieres auch der interstitielle Raum und die Kinetik des Injektionsprozesses berücksichtigt werden. Im Gegensatz zum Ein-Kompartimentmodell, welches lediglich das Plasmavolumen berücksichtigt, wandten wir ein neues 3-Kompartiment-Modell an, womit in der finalen GFR-Kalkulation alle eben genannten Faktoren berücksichtigt werden. Hierbei zeigte sich bei Versuchsende an Tag 14 im murinen Modell der Nephrokalzinose, in der Interventionsgruppe mit der vorzeitigen anti-TGF β Behandlung eine relative Verbesserung der GFR um 64,6% (42,6 vs. 120,4 μ l/min/100gKG, $p = 0.0007$). Bei dem verzögerten Therapiebeginn bestand kein signifikanter Unterschied bei der Nierenfunktion zwischen der anti-TGF β Behandlung und der Gabe der Isotypenkontrolle IgG1 (siehe Abbildung 27, 28). Eine Erklärung hierfür könnte der bereits fortgeschrittene Verlust des Gefäßsystems und der Expansion des fibrotischen Gewebes darstellen. Die Wahl einer *in vivo* Messung der GFR mithilfe eines injizierten Filtrationsmarkers ermöglicht es das tatsächliche Ausmaß der Effekte weitaus genauer zu bestimmen. Dies ist bei der Translation in die klinische Patientenversorgung wichtig, da eine möglichst exakte Bestimmung der Nierenfunktion beim Patienten essenziell ist, um ein potenzielles Therapiefenster zum Beginn einer Therapie nicht zu verpassen.

Aus den bisher publizierten Arbeiten geht hervor, dass die Antwort auf die Frage, wie sich eine anti-fibrotische Therapie auf den Erhalt der Nierenfunktion auswirkt, von vielen Faktoren abhängt. Der Effekt einer anti-fibrotischen Therapie ist sowohl vom Pathomechanismus der Nierenschädigung, dem Zeitpunkt des Therapiebeginns und dem jeweiligen medikamentös moduliertem Fibrosierungsmechanismus abhängig. Unsere Arbeit zeigt, dass im Bereich der Nephrokalzinosen eine anti-fibrotische Therapie signifikant zum Erhalt der Nierenfunktion beitragen kann. Beim Studiendesign bei der Erforschung von anti-fibrotischen Therapien sollte aus unserer Sicht die Nierenfunktion, also die tatsächliche GFR, als Maßstab des Therapieerfolgs herangezogen werden.

4.3 Der Einfluss von TGF β auf die Makrophagendifferenzierung

In unserem murinen Modell der chronischen Oxalatnephropathie kommt es durch die Kristallablagerungen zu einer massiven Entzündungsreaktion, gekennzeichnet durch eine Infiltration von Immunzellen und Expression von zahlreichen Entzündungsmediatoren (siehe Abbildung 19, 20). Histologisch und in der Kernspintomographie konnten wir zudem einen weitreichenden fibrotischen Umbau nachweisen (siehe Abbildung 22, 23). Bereits 1999 entdeckten Forscher erstmals, dass Kalziumoxalatablagerungen in der Niere eine Entzündungsreaktion triggern und mit einem zunehmendem fibrotischem Umbau assoziiert sind. Mittels immunhistologischer Analysen, konnte dargestellt werden, dass die Kalziumkristalle vornehmlich von Makrophagen umgeben sind ²⁴³. Die Population der Makrophagen ist gekennzeichnet durch eine Bandbreite an Diversität und Plastizität. Makrophagen können je nach pathogenem Trigger und Mikromilieu zur Abwehr, Elimination von Pathogenen und Gewebeheilung beitragen. Genauso können Sie aber auch unter bestimmten Umständen renale Inflammation und einen fibrotischen Umbau triggern und erhalten ²⁴⁴.

Makrophagen lösen bei Kontakt mit Kristallen über verschiedene Signaltransduktionswege eine Inflamationsreaktion aus. Quarzkristalle können *in vivo* von Makrophagen phagozytiert werden, hierbei kommt es bei der weiteren intrazellulären Prozessierung zur lysosomalen Destabilisierung. Bei Ruptur von Lysosomen infolge einer frustranen Kristalldigestion werden eine Reihe von intralysosomalen Enzymen freigesetzt, welche wiederum das *NLRP3* –

Inflammasome aktivieren ²⁴⁵. Die Aktivierung des *NALP3-Inflammasomes* führt wiederum zur Aktivierung der *Caspase 1*, welche über proteolytische Spaltung von *Pro-Interleukin-1 β* in seine aktive Form *Interleukin-1 β* (IL-1 β) überführt wird. IL-1 β wird in den Extrazellulärraum sezerniert und fungiert dort als potentes pro-inflammatorisches Zytokin. Dieser Mechanismus greift auch bei weiteren Kristallformen ³⁹. Eine Arbeit zeigte zudem, dass durch Phagozytose von Kristallen die Integrität der Lysosomenmembran vorübergehend zerstört wird, wodurch es zur Freisetzung von Proteasen kommt ²⁴⁶. Dies wiederum führt über eine Protease-abhängige Degradation von Proteinen der mitochondrialen Elektronentransportkette zu einer beeinträchtigten Mitochondrienaktivität. Der veränderte Metabolismus führte im Weiteren zu einem veränderten Makrophagenphänotyp ²⁴⁶. Überraschenderweise publizieren wiederholt Forschungsgruppen Ergebnisse, die belegen, dass Kristalle von Oberflächenrezeptoren von Makrophagen erkannt werden. Genau wie organische pathogene Partikel oder Organismen wie beispielsweise Bakterien, weisen Kristalle eine negativ geladene Oberfläche auf. Bisherige Arbeiten zeigen, dass Kristalle über elektrostatische Bindungen von denselben Oberflächenrezeptoren wie organische Pathogene erkannt werden und hierüber verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege aktivieren. Quarzkristalle werden zum Beispiel über die Scavenger-Rezeptoren der Klasse A und B sowie dem MARCO-Rezeptor erkannt. Bei Uratkristallen bindet das enthaltene Monosodium-Urat an den CLEC12A-Rezeptor ²⁴⁷. Darüber hinaus wurde berichtet, dass Uratkristalle und Cholesterolkristalle den Komplementfaktor C5a und dessen Rezeptor aktivieren können ¹⁴⁴.

Der Einfluss von Makrophagen *in vivo* im akuten oder chronischen Nierenversagen wird kontrovers diskutiert. Es liegen sowohl Studien vor, welche einen protektiven Effekt im Rahmen einer Nierenschädigung belegen, als auch Arbeiten, welche eine schädliche Wirkung aufzeigen. Im Modell der renalen Ischämie-Reperfusionsschädigung zeigten Arbeiten, dass eine partielle Depletion der Makrophagenpopulation durch die Gabe von Clodronsäure einen protektiven Effekt erzielte. Das Ausmaß des akuten Nierenversagens und der Tubulusnekrose konnte hierdurch signifikant vermindert werden ^{244,248}. Humane Nierenbiopsien, welche 1 Jahr nach einer Nierentransplantation durchgeführt wurden, deckten auf, dass eine hohe Anzahl an CD206 - positiven Makrophagen mit einem fortschreitenden Tubulusschaden und einer progredienten Fibrose korrelierte ²⁴⁹. Dieses Phänomen ist auch bei weiteren renalen Erkrankungen wie der diabetischen Nephropathie, der IgA-Nephritis zu finden, auch hier korreliert eine zunehmende Infiltration von CD206-, CD204- oder CD136-positiven

Makrophagen mit einer zunehmenden interstitiellen Fibrose und Tubulusatrophie. Hierbei handelt es lediglich um eine Assoziation, ein kausaler Zusammenhang kann hieraus nicht abgeleitet werden ²⁴⁴.

Neben den potenziell schädlichen Effekten von Makrophagen im Rahmen einer renalen Erkrankung, konnte auch belegt werden, dass Makrophagen in der Phase der Geweberegeneration eine tragende, protektive Rolle spielen. Zhang *et al.* untersuchte in transgenen IL-4/IL-13 – Knockout Mäusen die Makrophagendifferenzierung nach einer Ischämie-/Reperfusionsschädigung. Die Studie ergab, dass IL-4 und IL-13 notwendig für die Differenzierung hin zu einer M2a-Makrophagenpopulation sind und diese eine essenzielle Rolle bei der Geweberegeneration nach einem akuten Nierenversagen spielen. So zeigte sich in Assoziation mit einer IL-4/IL-13-induzierten Reduktion der M2a-Makrophagenpopulation eine Zunahme der interstitiellen Fibrose und ein signifikanter Abfall der Nierenfunktion ²⁵⁰.

Die genannten Arbeiten weisen auf, dass vor allem der vorliegende Makrophagenphänotyp im Rahmen einer renalen Schädigung entscheidend ist, ob Makrophagen eine schädliche oder eine protektive Wirkung vermitteln. Bereits in den ersten immunhistologischen Analysen von Kristall-induzierten Nephropathien konnten Makrophagen als der dominierende Zelltyp in direkter Lokalisation der Kristalle identifiziert werden ²⁴³. Spätere Publikationen deckten auf, dass Kristalle die Differenzierung der Makrophagenpopulation beeinflussen. Arbeiten aus der Gichtforschung zeigten, dass MSU-Kristalle die Differenzierung von infiltrierenden Monozyten hinzu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen induzieren ²⁵¹. Microarray Analysen von Nierenbiopsien von Patienten mit rezidivierender Uro-/Nephrolithiasis zeigten im Bereich der renalen Papille eine erhöhte mRNA-Expression von M1-Makrophagen assoziierten Proteinen wie der NO-Synthase, Interleukin-10, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor 2 (GM-CSF 2) und *C-C chemokine receptor type 2* (CCR2). Proteine wie *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR-γ), CD163 und CD206, welche vorrangig von M2-Makrophagen exprimiert werden, waren deutlich vermindert ²⁵². Unsere Immunphänotypisierung im Modell der chronischen Oxalatnephropathie ergab, dass die infiltrierende renale Monozyten-/Makrophagenpopulation vorrangig zu M1-Makrophagen differenzierte. M1-Makrophagen werden vor allem pro-inflammatorische Effekte zugeschrieben, über Freisetzung von Zytokinen, Sauerstoffradikalen und proteolytischen Enzymen tragen sie nicht nur zur Elimination von Pathogenen bei, sondern können auch

Nephronen schädigen und die Granulombildung begünstigen⁷¹. M2-Makrophagen können drei verschiedenen Subgruppen zugeordnet werden: M2a-Makrophagen, M2b-Makrophagen und M2c-Makrophagen. M2a-Makrophagen vermitteln vor allem eine anti-inflammatorische Wirkung und fördern sowohl den Heilungsprozess als auch die Fibrogenese. M2b-Makrophagen agieren immunmodulierend und M2c-Makrophagen vermitteln einen entzündungshemmenden Effekt und tragen zur Geweberegeneration bei²⁴⁴. Zusammenfassend lassen die eben genannten Arbeiten vermuten, dass eine kristall-induzierte Makrophagenpolarisation hinzu M1-Makrophagen eine zentrale Rolle bei der Initiierung und dem Erhalt der Inflammationsreaktion und Fibrogenese bei der Pathophysiologie von Nephrokalzinosen spielt.

TGF β gilt als potenter pro-fibrotischer Mediator, dessen Effekt zu einem großen Teil über Makrophagen vermittelt wird. Je nach Mikromilieu fungiert TGF β als pro- oder anti-inflammatorisches Zytokin^{179,180}. Wir postulierten, dass die anti-TGF β Therapie die Differenzierung der Makrophagenpopulation zu einem dominierend anti-fibrotischen Phänotyp beeinflussen kann und somit das renale Outcome verbessert. Unter der präemptiven Therapie mit dem anti-TGF-beta Antikörper 1D11 konnte eine Verschiebung der renalen Makrophagenpolarisation weg von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen hin zu M2-Makrophagen induziert werden. Bei detaillierter Phänotypisierung der M2-Makrophagenpopulation zeigte sich vor allem eine Zunahme der M2c-Makrophagen, wohingegen die Population der M2a-Makrophagen nach der präemptiven Therapie in verminderter Anzahl nachweisbar war. Diese Veränderung des Phänotyps der Makrophagenpopulation war assoziiert mit einer Verminderung der tubulointerstitiellen Fibrose und das progressive Fortschreiten des chronischen Nierenversagens konnte deutlich abgeschwächt werden (siehe Abbildung 28). An Tag 14 war die GFR in der Gruppe, welche den anti-TGF β Antikörper 1D11 erhalten hatte mehr als doppelt so hoch als in der Gruppe mit der IgG-Isotypenkontrolle 13C4. Bei Annahme eines linearen Abfalls der GFR konnte somit die Zeit bis zum Eintreten des terminalen Nierenversagens um 10 Tage hinausgezögert werden (siehe Abbildung 28). Zusammenfassend konnte durch die anti-TGF β Therapie bei der chronischen Oxalatnephropathie eine Verschiebung der Makrophagenpopulation von M1-Makrophagen und pro-fibrotischen M2a-Makrophagen hin zu einem anti-inflammatorischen M2c-Makrophagenphänotyp induziert werden. Dieser Effekt war assoziiert mit einer deutlichen Verminderung des Oxalat-induzierten chronischen Nierenversagens. Ein protektiver Effekt bei

Suppression der M1-Makrophagenpopulationen konnte innerhalb der letzten Jahre auch in weiteren Kristallopathien gezeigt werden. So veröffentlicht beispielsweise Liu *et al.* im Jahr 2019 eine Arbeit, die belegte, dass eine Sirt1-induzierte Suppression der M1-Makrophagenpolarisation eine Gichtarthritis verhindern konnte ²⁵³.

TGF β gilt als Masterregulator der renalen Fibrose. Allerdings handelt es sich bei den drei TGF β Formen TGF β 1, 2 und 3 um pleiotrope Zytokine, welche weit über die Makrophagendifferenzierung hinaus eine Vielzahl an Prozessen im Organismus beeinflussen. TGF β spielt darüber hinaus im Rahmen der renalen Fibrogenese eine zentrale Rolle bei der Transition von Makrophagen, Fibrozyten und Tubuluszellen hin zu Myofibroblasten. TGF β interagiert mit einer Vielzahl an Akteuren des Immunsystems, wie beispielsweise den T-Helferzellen, regulatorischen T-Zellen, T-Killerzellen, Natürlichen Killerzellen oder dendritischen Zellen ²⁵⁴. Bei der Kanzerogenese vermittelt TGF β im Tumormikromilieu eine immunsuppressive Wirkung und ermöglicht in einem späteren Stadium eine Immunevasion, wodurch eine Migration von Tumorzellen begünstigt wird ²⁵⁴. Die eben genannten Effekte stellen nur einen kleinen Einblick in die vielschichtige Funktion von TGF β dar. Die Komplexität bei der Erforschung von TGF β besteht zudem in einer stark kontextabhängigen Wirkung. TGF β kann bei variierender Dauer der Aktivierung oder Suppression, veränderter Lokalisation oder in verschiedenen Krankheitsmodellen teilweise gänzlich gegenteilige Effekte zeigen ^{179,254}. Letztendlich konnte sich die anti-TGF β Therapie im Bereich der renalen Fibrose aufgrund des Mangels an Spezifität in klinischen Studien nicht als effektives Therapeutikum behaupten ¹⁷⁹. Hochinteressant und vielversprechend erscheint allerdings die weitere Erforschung der zahlreichen nachgeschalteten Signaltransduktionswege von TGF β , welche als potenzielle therapeutische Angriffspunkte genutzt werden könnten.

Zusammenfassend deckte unsere Arbeit auf, dass ein Shift von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen und pro-fibrotischen M2a-Makrophagen hinzu anti-inflammatorischen M2c-Makrophagen die Progression des Nephroklazino-assozierten CNV deutlich vermindert. Mulay *et al.* untersuchte zeitgleich die zugrunde liegenden Mechanismen der Differenzierung von Makrophagen im murinen Modell der chronischen Oxalatnephropathie. Die Studie zeigte, dass eine Beta-Hydroxybutyrat vermittelte Inhibition des NLRP3-Inflammasoms eine Verschiebung der Makrophagenpopulation von pro-inflammatorischen M1- und pro-fibrotischen M2a-Makrophagen zu anti-inflammatorischen M2c-Makrophagen induzierte ²⁵⁵.

Derselbe Phänotyp, welcher auch durch die Therapie mit dem anti-TGF β Antikörper 1D11 induziert wurde. Die Publikation konnte ebenfalls eine Verbesserung der Nierenfunktion im Rahmen des Nephrokalzinose-assoziierten CNV belegen. Das NLRP3-Inflammasom könnte daher ein vielversprechendes therapeutisches Ziel im Rahmen der Nephrokalzinose darstellen

²⁵⁵.

Eine frustrane Phagozytose von Kristallen mit folgender lysosomaler Destabilisation kann zu einer RIPK3-abhängigen Nekroptose des Makrophagen führen ²⁴⁵. Die daraufhin freigesetzten intrazellulären Zellbestandteile wie Histone, DNA, Alarmine etc. fungieren als DAMPs, welche wiederum über PAMPs eine pro-inflammatorische Wirkung vermitteln und einen Zelltod triggern können. Ein sich selbst erhaltender Kreislauf, der auch als Necroinflammation bekannt ist und als zentraler Mechanismus der kristall-induzierten Inflammation gilt ^{29,40}. Neuere Arbeiten konnten therapeutische Erfolge in murinen Modellen erzielen, indem eine Differenzierung der Makrophagen dahingehend getriggert wurde die Phagozytosekapazität zu stärken. So zeigte Taguchi *et al.*, dass *in vitro* mittels Ko-Inkubation mit IL-4 und IL-13 differenzierte M2-Makrophagen bei Transfusion in hyperoxalurische C57BL/6J-Mäuse die renale Kristallformation verminderten. *In vitro* zeigte sich eine gesteigerte Phagozytose-Kapazität von COM-Kristallen dieser Makrophagen sowie in der Ko-Inkubation mit renalen Tubuluszellen (RTCs) eine verminderte Expression von Kristall-Adhäsionsmolekülen wie CD44 ²⁵⁶. Es folgten weitere Arbeiten, die bei Polarisation hin zu M2-Makrophagen eine verminderte Kristalldisposition und kristall-induzierte Inflammation zeigen konnten. Allerdings fehlt bei den meisten dieser Arbeiten eine detaillierte Immunphänotypisierung der M2-Makrophagensubpopulation. Diese wäre allerdings wünschenswert, da die verschiedenen Subpopulationen eine große Diversität aufweisen und verschiedene Funktionen ausüben ²⁵⁷.

Makrophagen stellen einer der Hauptakteure bei der Kristall-induzierten Nierenschädigung dar, sie können aber auch je nach Phänotyp den Schlüssel zur Heilung darstellen. Die Makrophagenpolarisation beim Nephrokalzinose-assoziierten CNV ist ein Balanceakt zwischen protektiver und schädigender Funktion. Die Erforschung zielgerichteter und effizienter Modulatoren der Makrophagendifferenzierung bergen ein großes Potenzial für neue Therapieoptionen.

4.4 Inhibition von TGF β verhindert den Verlust der β -Oxidation

Kang *et al.* legte einen Meilenstein in der Erforschung der Nierenfibrose als der Veränderungen der renalen β -Oxidation als eine der zentralen Pathomechanismen der renalen Fibrogenese entdeckte ²⁰¹. Proximale Tubuluszellen weisen ähnlich wie Kardiomyozyten einen sehr hohen Energieverbrauch auf. Beide Zelltypen nutzen zur Energiegewinnung bevorzugt die β -Oxidation, da aus freien Fettsäuren deutlich mehr ATP generiert werden kann als beispielsweise bei der Glykolyse ²⁰⁴. Fettsäuren werden über Oberflächenrezeptoren wie den Fettsäuren-Transporter CD36 oder über Endozytose von Albumin-Assoziierten Fettsäuren in die Zelle transportiert ²⁰¹. Intrazelluläre Fettsäuren werden über die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1) in das Mitochondrium geschleust, der Ort an dem die β -Oxidation stattfindet. Kang *et al.* zeigte, dass eine TGF β -induzierte Inhibition der β -Oxidation in proximalen Tubuluszellen zu einer Zunahme der Apoptose und Dedifferenzierung zu einem profibrotischen Phänotyp mit Expression von mesenchymalen Markern führt ²⁰¹. Eine pharmakologische Aktivierung der β -Oxidation in Tubuluszellen verhinderte im murinen Modell des Folsäure-induzierten Nierenversagens und der unilateralen Ureterligatur eine progressive renale Fibrogenese ²⁰¹.

Unsere Arbeit zeigte, dass es auch beim Nephrokalzinose-assoziierten CNV zu einer verminderten Expression von Schlüsselenzymen der β -Oxidation kommt. So war die mRNA-Expression von *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha* (Ppargc1 α) und der *Acyl-CoA Oxidase 1* (ACox1) in der Niere der hyperoxalurischen C57BL/6J-Mäusen signifikant reduziert (siehe Abbildung 16). Pgc1 α kodiert für PGC1 α , welcher als Ko-aktivator für Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppar α) als zentraler regulierender Transkriptionsfaktor für Fettsäuren-Transporter und Enzyme der β -Oxidation agiert ^{202,203}. ACox1 hingegen ist eines der Schlüsselenzyme der β -Oxidation ²⁰¹. Durch Gabe des anti-TGF β Antikörpers 1D11 konnte ein signifikanter Anstieg von Ppargc1 α und ACox1 induziert werden, was mit einer deutlichen Reduktion der renalen Fibrosierung und Verbesserung der Nierenfunktion assoziiert war (siehe Abbildung 16, 26, 28).

Darüber hinaus ist eine Dysregulation der β -Oxidation neben einem Tubulusschaden und Fibrose auch mit einer Inflamationsreaktion assoziiert ²⁰⁴. Insbesondere bei der Makrophagenpopulation zeigt sich ein starker Zusammenhang zwischen dem dominierenden Stoffwechselweg zur Energiegewinnung und dem jeweiligen Phänotyp. M1-Makrophagen

bedienen sich der Fettsäuren vor allem als Vorläufermetaboliten für inflammatorische Moleküle, während zur Energiegewinnung vornehmlich die Glykolyse genutzt wird. M2-Makrophagen gewinnen ihre Energieäquivalente hauptsächlich aus der β -Oxidation, dessen Produkt Acetyl-CoA wiederum der mitochondrialen Atmungskette zugeführt wird und so über die oxidative Phosphorylierung ATP generiert ²⁵⁸. Es liegen zahlreiche Arbeiten vor, welche Hinweise dafür liefern, dass eine Aktivierung der β -Oxidation essenziell für eine M2-Makrophagenpolarisation ist. So zeigte beispielsweise Malandrino *et al.*, dass eine pharmakologische Inhibition des CPT1-Transporters mittels Etomoxir, eine IL-4 – induzierte Differenzierung zu einem M2-Phänotyp blockiert ²⁵⁹. Der CPT1-Transporter transportiert freie Fettsäuren vom Zytosol in das Mitochondrium und stellt somit ein essenzielles Enzym für die mitochondriale β -Oxidation dar ²⁵⁹. Nelson *et al.* zeigten, dass eine Aktivierung von PPARgamma über Fettsäuren die Oxidation von Glutamin, einem zentralen Substrat der mitochondrialen Atmungskette fördert. Diese metabolische Reprogrammierung führt wiederum in Makrophagen zu einer Differenzierung hinzu einem M2-Phänotyp ²⁶⁰.

Allerdings liegen auch Publikationen vor, die den Einfluss der β -Oxidation auf die M2-Makrophagendifferenzierung kontrovers diskutieren. So konnte Nakashira *et al.* belegen, dass Cpt2-defiziente *Bone-marrow derived Macrophages* (BMDMs) keine β -Oxidation betreiben konnten. Die IL-4 getriggerte Differenzierung hinzu M2-Makrophagen war hingegen nicht beeinträchtigt. Weitere Forschungsgruppen deckten auf, dass Etomoxir nicht ausschließlich spezifisch mit CPT1 interagiert und eine Inhibition der M2-Makrophagendifferenzierung vermutlich über veränderte CoA-Level induziert wird ²⁶¹.

Letztendlich bleibt die Frage, ob die metabolischen Unterschiede der Makrophagenphänotypen Ursache oder Folge sind, noch zu großen Teilen ungeklärt. Weitere Forschungsarbeiten sind erforderlich, um die Zusammenhänge zwischen dem Stoffwechsel der Makrophagen und deren Phänotyp und Funktion aufzudecken.

4.5 Limitationen der Arbeit

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterliegen einigen Limitationen. Bei der Immunphänotypisierung der Makrophagenpopulation verwendeten wir das klassische Modell der Einteilung in M1- und M2a, M2b, M2c-Makrophagen. Diese Klassifizierung stellt allerdings

eine starke Vereinfachung dar und wird der Plastizität und Diversität der Makrophagenpopulation nicht gerecht. Die Grundlage für diese Nomenklatur sind *in vitro* Experimente, welche die Genexpression und Funktion von kultivierten Makrophagen nach Inkubation mit verschiedenen Stimuli untersuchten. Die ersten Studien stammen aus den 1990er-Jahren, die zeigten, dass kultivierte Makrophagen nach Inkubation mit Interferon-gamma und /oder LPS unterschiedliche Genexpressionsmuster aufwiesen als nach Inkubation mit IL-4. Einzelzell-RNA-Sequenzierungsanalysen aus Gewebe isolierten Makrophagen deckten auf, dass die einzelnen Makrophagen vielmehr ein Kontinuum an Polarisationsstadien aufweisen ²⁴⁴. Darüber hinaus können Erkenntnisse bei Experimenten mit murinen Makrophagen nur bedingt auf den Menschen übertragen werden. Sowohl die exprimierten Oberflächenmarker, als auch die bevorzugten Stoffwechselwege zur Energiegewinnung und die Reaktion und Immunantwort auf Pathogene unterscheiden sich teilweise fundamental zwischen den Spezies ²⁶².

Weitere limitierende Faktoren bestehen darin, dass bei einigen Experimenten mRNA-Expressionsanalysen durchgeführt wurden. Aufgrund von Mechanismen wie beispielsweise der RNA-Interferenz können mRNA- und Protein-Expressionslevel divergieren. Eine Quantifizierung mittels Western-Blot, Durchflusszytometrie oder Massenspektrometrie sind daher erstrebenswert. Aufgrund der benötigten Menge an Gewebematerial und Verfügbarkeit von Primärantikörpern war dies nicht immer möglich ²⁶³.

Ein weiterer beschränkender Faktor besteht darin, dass die verwendeten Mäuse durch Inzucht einen fast identischen Genotyp aufweisen. Dies wird allerdings der genetischen Diversität der Patientenkohorten nicht gerecht ²⁶⁴. Darüber hinaus sind die Gruppengrößen mit je 5 Versuchstieren klein. Dies birgt die Gefahr, dass einzelnen Ausreißern eine überproportionale Wichtung zukommt. Zudem muss angemerkt werden, dass die Versuchstiere unter streng reglementierten Bedingungen gehalten werden und kein Kontakt zur Umwelt besteht. Dies hat Folgen für die Entwicklung des Immunsystems der Tiere ²⁶⁵.

5 Literaturverzeichnis

1. Romagnani P, Remuzzi G, Glasscock R, et al. Chronic kidney disease. Nature reviews Disease primers 2017;3:17088. (In eng). DOI: 10.1038/nrdp.2017.88.
2. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. Jama 2019;322(13):1294-1304. (In eng). DOI: 10.1001/jama.2019.14745.
3. Group CW. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. . Kidney Int Suppl 3, 1–150 (2013)
4. KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney Int 2024;105(4s):S117-s314. (In eng). DOI: 10.1016/j.kint.2023.10.018.
5. Brück K, Stel VS, Gambaro G, et al. CKD Prevalence Varies across the European General Population. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2016;27(7):2135-47. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2015050542.
6. Locatelli F, Vecchio LD, Pozzoni P. The importance of early detection of chronic kidney disease. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association 2002;17 Suppl 11:2-7. (In eng). DOI: 10.1093/ndt/17.suppl_11.2.
7. Freedman BI, Cohen AH. Hypertension-attributed nephropathy: what's in a name? Nature reviews Nephrology 2016;12(1):27-36. (In eng). DOI: 10.1038/nrneph.2015.172.
8. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet (London, England) 2016;388(10053):1659-1724. (In eng). DOI: 10.1016/s0140-6736(16)31679-8.
9. Babitt JL, Lin HY. Mechanisms of anemia in CKD. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2012;23(10):1631-4. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2011111078.
10. Vos FE, Schollum JB, Coulter CV, Doyle TC, Duffull SB, Walker RJ. Red blood cell survival in long-term dialysis patients. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation 2011;58(4):591-8. (In eng). DOI: 10.1053/j.ajkd.2011.03.031.
11. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what's changed and why it matters. Kidney international 2017;92(1):26-36. (In eng). DOI: 10.1016/j.kint.2017.04.006.
12. Franca Gois PH, Wolley M, Ranganathan D, Seguro AC. Vitamin D Deficiency in Chronic Kidney Disease: Recent Evidence and Controversies. International journal of environmental research and public health 2018;15(8) (In eng). DOI: 10.3390/ijerph15081773.
13. Stevens KK, Patel RK, Mark PB, Delles C, Jardine AG. Phosphate as a cardiovascular risk factor: effects on vascular and endothelial function. Lancet (London, England) 2015;385 Suppl 1:S10. (In eng). DOI: 10.1016/s0140-6736(15)60325-7.
14. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney international 2006;69(11):1945-53. (In eng). DOI: 10.1038/sj.ki.5000414.
15. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. Lancet (London, England) 2010;375(9731):2073-81. (In eng). DOI: 10.1016/s0140-6736(10)60674-5.
16. Briet M, Burns KD. Chronic kidney disease and vascular remodelling: molecular mechanisms and clinical implications. Clinical science (London, England : 1979) 2012;123(7):399-416. (In eng). DOI: 10.1042/cs20120074.
17. Meyer TW, Hostetter TH. Uremia. The New England journal of medicine 2007;357(13):1316-25. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMr071313.
18. Bertram JF, Douglas-Denton RN, Diouf B, Hughson MD, Hoy WE. Human nephron number: implications for health and disease. Pediatric nephrology (Berlin, Germany) 2011;26(9):1529-33. (In eng). DOI: 10.1007/s00467-011-1843-8.

19. De Chiara L, Conte C, Semeraro R, et al. Tubular cell polyploidy protects from lethal acute kidney injury but promotes consequent chronic kidney disease. *Nature communications* 2022;13(1):5805. (In eng). DOI: 10.1038/s41467-022-33110-5.
20. Lazzeri E, Angelotti ML, Peired A, et al. Endocycle-related tubular cell hypertrophy and progenitor proliferation recover renal function after acute kidney injury. *Nature communications* 2018;9(1):1344. (In eng). DOI: 10.1038/s41467-018-03753-4.
21. Peired A, Lazzeri E, Lasagni L, Romagnani P. Glomerular regeneration: when can the kidney regenerate from injury and what turns failure into success? *Nephron Exp Nephrol* 2014;126(2):70. (In eng). DOI: 10.1159/000360669.
22. Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, et al. Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* 2016;375(4):323-34. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMoa1515920.
23. Wheeler DC, Stefánsson BV, Jongs N, et al. Effects of dapagliflozin on major adverse kidney and cardiovascular events in patients with diabetic and non-diabetic chronic kidney disease: a prespecified analysis from the DAPA-CKD trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2021;9(1):22-31. (In eng). DOI: 10.1016/s2213-8587(20)30369-7.
24. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet (London, England)* 2014;383(9927):1490-1502. (In eng). DOI: 10.1016/s0140-6736(13)61649-9.
25. Saran R, Robinson B, Abbott KC, et al. US Renal Data System 2016 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2017;69(3 Suppl 1):A7-a8. (In eng). DOI: 10.1053/j.ajkd.2016.12.004.
26. <https://www.organspende-info.de/organspende/transplantierbareorgane/nierentransplantation.html>.
27. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2011;11(3):450-62. (In eng). DOI: 10.1111/j.1600-6143.2010.03283.x.
28. Rubio CR, Simes JC, Moya M, Soriano F, Palma JA, Campana V. Inflammatory and oxidative stress markers in experimental crystallopathy: their modification by photostimulation. *Photomedicine and laser surgery* 2009;27(1):79-84. (In eng). DOI: 10.1089/pho.2007.2232.
29. Mulay SR, Anders HJ. Crystallopathies. *The New England journal of medicine* 2016;374(25):2465-76. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMra1601611.
30. Leung CC, Yu IT, Chen W. Silicosis. *Lancet (London, England)* 2012;379(9830):2008-18. (In eng). DOI: 10.1016/s0140-6736(12)60235-9.
31. Panh L, Lairez O, Ruidavets JB, Galinier M, Carrié D, Ferrières J. Coronary artery calcification: From crystal to plaque rupture. *Archives of cardiovascular diseases* 2017;110(10):550-561. (In eng). DOI: 10.1016/j.acvd.2017.04.003.
32. al. He. *Innere Medizin*. 2012.
33. Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue-culture studies. *Clinical and experimental nephrology* 2004;8(2):75-88. (In eng). DOI: 10.1007/s10157-004-0292-0.
34. Durbin SD, Feher G. Protein crystallization. *Annu Rev Phys Chem* 1996;47:171-204. (In eng). DOI: 10.1146/annurev.physchem.47.1.171.
35. Sleutel M, Van Driessche AE. Role of clusters in nonclassical nucleation and growth of protein crystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014;111(5):E546-53. (In eng). DOI: 10.1073/pnas.1309320111.
36. Vekilov PG. The two-step mechanism of nucleation of crystals in solution. *Nanoscale* 2010;2(11):2346-57. (In eng). DOI: 10.1039/c0nr00628a.
37. Shen Y, Li S, Xie A, et al. Controlled growth of calcium oxalate crystal in bicontinuous microemulsions containing amino acids. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2007;58(2):298-304. (In eng). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2007.04.004.
38. Thongboonkerd V, Semangoen T, Chutipongtanate S. Factors determining types and morphologies of calcium oxalate crystals: molar concentrations, buffering, pH, stirring and temperature. *Clin Chim Acta* 2006;367(1-2):120-31. DOI: 10.1016/j.cca.2005.11.033.
39. Mulay SR, Anders HJ. Crystal nephropathies: mechanisms of crystal-induced kidney injury. *Nature reviews Nephrology* 2017;13(4):226-240. (In eng). DOI: 10.1038/nrneph.2017.10.
40. Mulay SR, Shi C, Ma X, Anders HJ. Novel Insights into Crystal-Induced Kidney Injury. *Kidney diseases (Basel, Switzerland)* 2018;4(2):49-57. (In eng). DOI: 10.1159/000487671.

41. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010;464(7293):1357-61. (In eng). DOI: 10.1038/nature08938.
42. Baumann DS, McGraw D, Rubin BG, Allen BT, Anderson CB, Sicard GA. An institutional experience with arterial atheroembolism. *Annals of vascular surgery* 1994;8(3):258-65. (In eng). DOI: 10.1007/bf02018173.
43. Sharma PV, Babu SC, Shah PM, Nassoura ZE. Changing patterns of atheroembolism. *Cardiovascular surgery (London, England)* 1996;4(5):573-9. (In eng). DOI: 10.1016/0967-2109(96)00003-8.
44. Hitti WA, Wali RK, Weinman EJ, Drachenberg C, Briglia A. Cholesterol embolization syndrome induced by thrombolytic therapy. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 2008;8(1):27-34. (In eng). DOI: 10.2165/00129784-200808010-00004.
45. Nevelsteen A, Kутten M, Lacroix H, Suy R. Oral anticoagulant therapy: a precipitating factor in the pathogenesis of cholesterol embolization? *Acta chirurgica Belgica* 1992;92(1):33-6. (In eng).
46. Arakawa K, Konoshita T, Makino Y, Ishizuka T. Blue toe in a male with cholesterol embolisation syndrome. *Clinical medicine (London, England)* 2014;14(6):688-9. (In eng). DOI: 10.7861/clinmedicine.14-6-688.
47. Doty JR, Wilentz RE, Salazar JD, Hruban RH, Cameron DE. Atheroembolism in cardiac surgery. *The Annals of thoracic surgery* 2003;75(4):1221-6. (In eng). DOI: 10.1016/s0003-4975(02)04712-4.
48. Warren BA, Vales O. Electron microscopy of the sequence of events in the atheroembolic occlusion of cerebral arteries in an animal model. *British journal of experimental pathology* 1975;56(3):205-15. (In eng).
49. Warren BA, Vales O. The ultrastructure of the reaction of arterial walls to cholesterol crystals in atheroembolism. *British journal of experimental pathology* 1976;57(1):67-77. (In eng).
50. Tunick PA, Nayar AC, Goodkin GM, et al. Effect of treatment on the incidence of stroke and other emboli in 519 patients with severe thoracic aortic plaque. *The American journal of cardiology* 2002;90(12):1320-5. (In eng). DOI: 10.1016/s0002-9149(02)02870-9.
51. Scolari F, Ravani P, Gaggi R, et al. The challenge of diagnosing atheroembolic renal disease: clinical features and prognostic factors. *Circulation* 2007;116(3):298-304. (In eng). DOI: 10.1161/circulationaha.106.680991.
52. Herlitz LC, D'Agati VD, Markowitz GS. Crystalline nephropathies. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2012;136(7):713-20. (In eng). DOI: 10.5858/arpa.2011-0565-RA.
53. Markowitz GS. Dysproteinemia and the kidney. *Advances in anatomic pathology* 2004;11(1):49-63. (In eng). DOI: 10.1097/00125480-200401000-00005.
54. Sanders PW, Booker BB. Pathobiology of cast nephropathy from human Bence Jones proteins. *The Journal of clinical investigation* 1992;89(2):630-9. (In eng). DOI: 10.1172/jci115629.
55. Lin J, Markowitz GS, Valeri AM, et al. Renal monoclonal immunoglobulin deposition disease: the disease spectrum. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2001;12(7):1482-92. (In eng).
56. Sanders PW. Pathogenesis and treatment of myeloma kidney. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1994;124(4):484-8. (In eng).
57. Dimopoulos MA, Roussou M, Gavriatopoulou M, et al. Bortezomib-based triplets are associated with a high probability of dialysis independence and rapid renal recovery in newly diagnosed myeloma patients with severe renal failure or those requiring dialysis. *American journal of hematology* 2016;91(5):499-502. (In eng). DOI: 10.1002/ajh.24335.
58. Hutchison CA, Bradwell AR, Cook M, et al. Treatment of acute renal failure secondary to multiple myeloma with chemotherapy and extended high cut-off hemodialysis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2009;4(4):745-54. (In eng). DOI: 10.2215/cjn.04590908.
59. Hutchison CA, Cockwell P, Stringer S, et al. Early reduction of serum-free light chains associates with renal recovery in myeloma kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2011;22(6):1129-36. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2010080857.
60. Szabo AG, Thorsen J, Iversen KF, et al. Clinically-suspected cast nephropathy: A retrospective, national, real-world study. *American journal of hematology* 2020;95(11):1352-1360. (In eng). DOI: 10.1002/ajh.25959.
61. Bladé J, Fernández-Llama P, Bosch F, et al. Renal failure in multiple myeloma: presenting features and predictors of outcome in 94 patients from a single institution. *Archives of internal medicine* 1998;158(17):1889-93. (In eng). DOI: 10.1001/archinte.158.17.1889.
62. Déret S, Denoroy L, Lamarine M, et al. Kappa light chain-associated Fanconi's syndrome: molecular analysis of monoclonal immunoglobulin light chains from patients with and without intracellular crystals. *Protein Eng* 1999;12(4):363-9. (In eng). DOI: 10.1093/protein/12.4.363.

63. Perazella MA. Crystal-induced acute renal failure. *Am J Med* 1999;106(4):459-65. (In eng). DOI: 10.1016/s0002-9343(99)00041-8.
64. Jao J, Wyatt CM. Antiretroviral medications: adverse effects on the kidney. *Advances in chronic kidney disease* 2010;17(1):72-82. (In eng). DOI: 10.1053/j.ackd.2009.07.009.
65. Simon DI, Brosius FC, 3rd, Rothstein DM. Sulfadiazine crystalluria revisited. The treatment of Toxoplasma encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Archives of internal medicine* 1990;150(11):2379-84. (In eng). DOI: 10.1001/archinte.150.11.2379.
66. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* 2006;11(6):694-703. (In eng). DOI: 10.1634/theoncologist.11-6-694.
67. Johnson RJ, Nakagawa T, Jalal D, Sánchez-Lozada LG, Kang DH, Ritz E. Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2013;28(9):2221-8. (In eng). DOI: 10.1093/ndt/gft029.
68. Richette P, Bardin T. Gout. *Lancet (London, England)* 2010;375(9711):318-28. (In eng). DOI: 10.1016/s0140-6736(09)60883-7.
69. Ejaz AA, Johnson RJ, Shimada M, et al. The Role of Uric Acid in Acute Kidney Injury. *Nephron* 2019;142(4):275-283. (In eng). DOI: 10.1159/000499939.
70. Shimada M, Johnson RJ, May WS, Jr., et al. A novel role for uric acid in acute kidney injury associated with tumour lysis syndrome. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2009;24(10):2960-4. (In eng). DOI: 10.1093/ndt/gfp330.
71. Sellmayr M, Hernandez Petzsche MR, Ma Q, et al. Only Hyperuricemia with Crystalluria, but not Asymptomatic Hyperuricemia, Drives Progression of Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2020;31(12):2773-2792. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2020040523.
72. Badve SV, Pascoe EM, Tikun A, et al. Effects of Allopurinol on the Progression of Chronic Kidney Disease. *The New England journal of medicine* 2020;382(26):2504-2513. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMoa1915833.
73. Topaloglu R. Nephropathic cystinosis: an update on genetic conditioning. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 2021;36(6):1347-1352. (In eng). DOI: 10.1007/s00467-020-04638-9.
74. Elmonem MA, Veys KR, Soliman NA, van Dyck M, van den Heuvel LP, Levtchenko E. Cystinosis: a review. *Orphanet J Rare Dis* 2016;11:47. (In eng). DOI: 10.1186/s13023-016-0426-y.
75. Principe G, Caiello I, Cherqui S, et al. Inflammasome activation by cystine crystals: implications for the pathogenesis of cystinosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2014;25(6):1163-9. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2013060653.
76. Elmonem MA, Veys KRP, Principe G. Nephropathic Cystinosis: Pathogenic Roles of Inflammation and Potential for New Therapies. *Cells* 2022;11(2) (In eng). DOI: 10.3390/cells11020190.
77. Brodin-Sartorius A, Tête MJ, Niaudet P, et al. Cysteamine therapy delays the progression of nephropathic cystinosis in late adolescents and adults. *Kidney international* 2012;81(2):179-89. (In eng). DOI: 10.1038/ki.2011.277.
78. Oliveira B, Kleta R, Bockenhauer D, Walsh SB. Genetic, pathophysiological, and clinical aspects of nephrocalcinosis. *American journal of physiology Renal physiology* 2016;311(6):F1243-f1252. (In eng). DOI: 10.1152/ajprenal.00211.2016.
79. Meehan AD, Udumyan R, Kardell M, Landén M, Järhult J, Wallin G. Lithium-Associated Hypercalcemia: Pathophysiology, Prevalence, Management. *World journal of surgery* 2018;42(2):415-424. (In eng). DOI: 10.1007/s00268-017-4328-5.
80. Duarte CG, Winnacker JL, Becker KL, Pace A. Thiazide-induced hypercalcemia. *The New England journal of medicine* 1971;284(15):828-30. (In eng). DOI: 10.1056/nejm197104152841506.
81. Legha SS, Powell K, Buzdar AU, Blumenschein GR. Tamoxifen-induced hypercalcemia in breast cancer. *Cancer* 1981;47(12):2803-6. (In eng). DOI: 10.1002/1097-0142(19810615)47:12<2803::aid-cnrcr2820471208>3.0.co;2-a.
82. Pérez-Barrios C, Hernández-Álvarez E, Blanco-Navarro I, Pérez-Sacristán B, Granado-Lorencio F. Prevalence of hypercalcemia related to hypervitaminosis D in clinical practice. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 2016;35(6):1354-1358. (In eng). DOI: 10.1016/j.clnu.2016.02.017.
83. Ratcliffe WA, Hutchesson AC, Bundred NJ, Ratcliffe JG. Role of assays for parathyroid-hormone-related protein in investigation of hypercalcaemia. *Lancet (London, England)* 1992;339(8786):164-7. (In eng). DOI: 10.1016/0140-6736(92)90220-w.

84. Rosol TJ, Capen CC. Mechanisms of cancer-induced hypercalcemia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1992;67(6):680-702. (In eng).
85. Sharma OP. Vitamin D, calcium, and sarcoidosis. *Chest* 1996;109(2):535-9. (In eng). DOI: 10.1378/chest.109.2.535.
86. Auron A, Alon US. Hypercalcemia: a consultant's approach. *Pediatr Nephrol* 2018;33(9):1475-1488. (In eng). DOI: 10.1007/s00467-017-3788-z.
87. Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N Engl J Med* 2009;361(1):62-72. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMr0801327.
88. Markowitz GS, Stokes MB, Radhakrishnan J, D'Agati VD. Acute phosphate nephropathy following oral sodium phosphate bowel purgative: an underrecognized cause of chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005;16(11):3389-96. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2005050496.
89. Davison AM CJ, Grünfeld J, et al. *Nephrocalcinosis in Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. Oxford University Press 2005:p. 1375.
90. Hernandez JD, Ellison JS, Lendvay TS. Current Trends, Evaluation, and Management of Pediatric Nephrolithiasis. *JAMA pediatrics* 2015;169(10):964-70. (In eng). DOI: 10.1001/jamapediatrics.2015.1419.
91. Fisang C, Anding R, Müller SC, Latz S, Laube N. Urolithiasis--an interdisciplinary diagnostic, therapeutic and secondary preventive challenge. *Deutsches Arzteblatt international* 2015;112(6):83-91. (In eng). DOI: 10.3238/arztebl.2015.0083.
92. Gambaro G, Croppi E, Bushinsky D, et al. The Risk of Chronic Kidney Disease Associated with Urolithiasis and its Urological Treatments: A Review. *The Journal of urology* 2017;198(2):268-273. (In eng). DOI: 10.1016/j.juro.2016.12.135.
93. Teichman JM, Long RD, Hulbert JC. Long-term renal fate and prognosis after staghorn calculus management. *The Journal of urology* 1995;153(5):1403-7. (In eng).
94. Howles SA, Thakker RV. Genetics of kidney stone disease. *Nature reviews Urology* 2020;17(7):407-421. (In eng). DOI: 10.1038/s41585-020-0332-x.
95. Coe FL, Worcester EM, Evan AP. Idiopathic hypercalciuria and formation of calcium renal stones. *Nature reviews Nephrology* 2016;12(9):519-33. (In eng). DOI: 10.1038/nrneph.2016.101.
96. Goldfarb DS. A woman with recurrent calcium phosphate kidney stones. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2012;7(7):1172-8. (In eng). DOI: 10.2215/cjn.00560112.
97. Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. *The Journal of clinical investigation* 2005;115(10):2598-608. (In eng). DOI: 10.1172/jci26662.
98. Williams JC, Jr., Matlaga BR, Kim SC, et al. Calcium oxalate calculi found attached to the renal papilla: Preliminary evidence for early mechanisms in stone formation. *Journal of endourology* 2006;20(11):885-90. (In eng). DOI: 10.1089/end.2006.20.885.
99. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. Family history and risk of kidney stones. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1997;8(10):1568-73. (In eng).
100. Oddsson A, Sulem P, Helgason H, et al. Common and rare variants associated with kidney stones and biochemical traits. *Nature communications* 2015;6:7975. (In eng). DOI: 10.1038/ncomms8975.
101. Türk C, Petřík A, Sarica K, et al. EAU Guidelines on Diagnosis and Conservative Management of Urolithiasis. *Eur Urol* 2016;69(3):468-74. (In eng). DOI: 10.1016/j.eururo.2015.07.040.
102. Yang Y, Sharma PD, Nair V, et al. Kidney oxalate crystal deposition in adult patients: A relatively common finding *Clinical nephrology* 2020;93(5):243-250. (In eng). DOI: 10.5414/cn109980.
103. van der Hoeven SM, van Woerden CS, Groothoff JW. Primary hyperoxaluria type 1, a too often missed diagnosis and potentially treatable cause of end-stage renal disease in adults: results of the Dutch cohort. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012;27(10):3855-62. (In eng). DOI: 10.1093/ndt/gfs320.
104. Lieske JC, Monico CG, Holmes WS, et al. International registry for primary hyperoxaluria. *American journal of nephrology* 2005;25(3):290-6. (In eng). DOI: 10.1159/000086360.
105. van Woerden CS, Groothoff JW, Wanders RJ, Davin JC, Wijburg FA. Primary hyperoxaluria type 1 in The Netherlands: prevalence and outcome. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2003;18(2):273-9. (In eng). DOI: 10.1093/ndt/18.2.273.
106. Hoppe B, Latta K, von Schnakenburg C, Kemper MJ. Primary hyperoxaluria--the German experience. *American journal of nephrology* 2005;25(3):276-81. (In eng). DOI: 10.1159/000086358.

107. Buyschaert B, Aydin S, Morelle J, Gillion V, Jadoul M, Demoulin N. Etiologies, Clinical Features, and Outcome of Oxalate Nephropathy. *Kidney international reports* 2020;5(9):1503-1509. (In eng). DOI: 10.1016/j.ekir.2020.06.021.
108. Lumlertgul N, Siribamrungwong M, Jaber BL, Susantitaphong P. Secondary Oxalate Nephropathy: A Systematic Review. *Kidney international reports* 2018;3(6):1363-1372. (In eng). DOI: 10.1016/j.ekir.2018.07.020.
109. Hoppe B, Kemper MJ, Bökenkamp A, Portale AA, Cohn RA, Langman CB. Plasma calcium oxalate supersaturation in children with primary hyperoxaluria and end-stage renal failure. *Kidney international* 1999;56(1):268-74. (In eng). DOI: 10.1046/j.1523-1755.1999.00546.x.
110. Nicholas Cossey L, Dvanajscak Z, Larsen CP. A diagnostician's field guide to crystalline nephropathies. *Seminars in diagnostic pathology* 2020;37(3):135-142. (In eng). DOI: 10.1053/j.semmp.2020.02.002.
111. Nasr SH, D'Agati VD, Said SM, et al. Oxalate nephropathy complicating Roux-en-Y Gastric Bypass: an underrecognized cause of irreversible renal failure. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2008;3(6):1676-83. (In eng). DOI: 10.2215/cjn.02940608.
112. Morfin J, Chin A. Images in clinical medicine. Urinary calcium oxalate crystals in ethylene glycol intoxication. *The New England journal of medicine* 2005;353(24):e21. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMicm050183.
113. Nankivell BJ, Murali KM. Images in clinical medicine. Renal failure from vitamin C after transplantation. *The New England journal of medicine* 2008;358(4):e4. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMicm070984.
114. Dobbins JW, Binder HJ. Importance of the colon in enteric hyperoxaluria. *The New England journal of medicine* 1977;296(6):298-301. (In eng). DOI: 10.1056/nejm197702102960602.
115. Dobbins JW, Binder HJ. Effect of bile salts and fatty acids on the colonic absorption of oxalate. *Gastroenterology* 1976;70(6):1096-1100. (In eng).
116. Robijn S, Hoppe B, Vervaet BA, D'Haese PC, Verhulst A. Hyperoxaluria: a gut-kidney axis? *Kidney international* 2011;80(11):1146-58. (In eng). DOI: 10.1038/ki.2011.287.
117. Siener R, Bangen U, Sidhu H, Hönow R, von Unruh G, Hesse A. The role of *Oxalobacter formigenes* colonization in calcium oxalate stone disease. *Kidney international* 2013;83(6):1144-9. (In eng). DOI: 10.1038/ki.2013.104.
118. Canales BK, Hatch M. *Oxalobacter formigenes* colonization normalizes oxalate excretion in a gastric bypass model of hyperoxaluria. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery* 2017;13(7):1152-1157. (In eng). DOI: 10.1016/j.soard.2017.03.014.
119. PeBenito A, Nazzari L, Wang C, et al. Comparative prevalence of *Oxalobacter formigenes* in three human populations. *Scientific reports* 2019;9(1):574. (In eng). DOI: 10.1038/s41598-018-36670-z.
120. Cochat P, Rumsby G. Primary hyperoxaluria. *The New England journal of medicine* 2013;369(7):649-58. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMra1301564.
121. Cochat P, Deloraine A, Rotily M, Olive F, Liponski I, Deries N. Epidemiology of primary hyperoxaluria type 1. Société de Néphrologie and the Société de Néphrologie Pédiatrique. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1995;10 Suppl 8:3-7. (In eng). DOI: 10.1093/ndt/10.suppl8.3.
122. Minatogawa Y, Tone S, Allsop J, et al. A serine-to-phenylalanine substitution leads to loss of alanine:glyoxylate aminotransferase catalytic activity and immunoreactivity in a patient with primary hyperoxaluria type 1. *Human molecular genetics* 1992;1(8):643-4. (In eng). DOI: 10.1093/hmg/1.8.643.
123. Hoppe B. Evidence of true genotype-phenotype correlation in primary hyperoxaluria type 1. *Kidney international* 2010;77(5):383-5. (In eng). DOI: 10.1038/ki.2009.471.
124. Cregeen DP, Williams EL, Hulton S, Rumsby G. Molecular analysis of the glyoxylate reductase (GRHPR) gene and description of mutations underlying primary hyperoxaluria type 2. *Human mutation* 2003;22(6):497. (In eng). DOI: 10.1002/humu.9200.
125. Belostotsky R, Seboun E, Idelson GH, et al. Mutations in DHAPSL are responsible for primary hyperoxaluria type III. *American journal of human genetics* 2010;87(3):392-9. (In eng). DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.07.023.
126. Riedel TJ, Knight J, Murray MS, Milliner DS, Holmes RP, Lowther WT. 4-Hydroxy-2-oxoglutarate aldolase inactivity in primary hyperoxaluria type 3 and glyoxylate reductase inhibition. *Biochimica et biophysica acta* 2012;1822(10):1544-52. (In eng). DOI: 10.1016/j.bbdis.2012.06.014.
127. Belostotsky R, Pitt JJ, Frishberg Y. Primary hyperoxaluria type III--a model for studying perturbations in glyoxylate metabolism. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2012;90(12):1497-504. (In eng). DOI: 10.1007/s00109-012-0930-z.

128. Riedel TJ, Johnson LC, Knight J, Hantgan RR, Holmes RP, Lowther WT. Structural and biochemical studies of human 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase: implications for hydroxyproline metabolism in primary hyperoxaluria. *PloS one* 2011;6(10):e26021. (In eng). DOI: 10.1371/journal.pone.0026021.
129. Harambat J, van Stralen KJ, Espinosa L, et al. Characteristics and outcomes of children with primary oxalosis requiring renal replacement therapy. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2012;7(3):458-65. (In eng). DOI: 10.2215/cjn.07430711.
130. van Woerden CS, Groothoff JW, Wijburg FA, Annink C, Wanders RJ, Waterham HR. Clinical implications of mutation analysis in primary hyperoxaluria type 1. *Kidney international* 2004;66(2):746-52. (In eng). DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00796.x.
131. Yuan A, Ehlers JP. Crystalline retinopathy from primary hyperoxaluria. *Retina (Philadelphia, Pa)* 2012;32(9):1994-5. (In eng). DOI: 10.1097/IAE.0b013e3182695a5b.
132. Bakshi NA, Al-Zahrani H. Bone marrow oxalosis. *Blood* 2012;120(1):8. (In eng). DOI: 10.1182/blood-2011-12-400192.
133. Mookadam F, Smith T, Jiamsripong P, et al. Cardiac abnormalities in primary hyperoxaluria. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2010;74(11):2403-9. (In eng). DOI: 10.1253/circj.cj-10-0107.
134. Beck BB, Hoyer-Kuhn H, Göbel H, Habbig S, Hoppe B. Hyperoxaluria and systemic oxalosis: an update on current therapy and future directions. *Expert opinion on investigational drugs* 2013;22(1):117-29. (In eng). DOI: 10.1517/13543784.2013.741587.
135. Bergstralh EJ, Monico CG, Lieske JC, et al. Transplantation outcomes in primary hyperoxaluria. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2010;10(11):2493-501. (In eng). DOI: 10.1111/j.1600-6143.2010.03271.x.
136. Shah VN, Pyle L. Lumasiran, an RNAi Therapeutic for Primary Hyperoxaluria Type 1. *The New England journal of medicine* 2021;385(20):e69. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMc2107661.
137. Marangella M, Bagnis C, Bruno M, Vitale C, Petrarulo M, Ramello A. Crystallization inhibitors in the pathophysiology and treatment of nephrolithiasis. *Urologia internationalis* 2004;72 Suppl 1:6-10. (In eng). DOI: 10.1159/000076583.
138. Cochat P, Hulton SA, Acquaviva C, et al. Primary hyperoxaluria Type 1: indications for screening and guidance for diagnosis and treatment. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012;27(5):1729-36. (In eng). DOI: 10.1093/ndt/gfs078.
139. Mulay SR, Desai J, Kumar SV, et al. Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL-mediated necroptosis. *Nature communications* 2016;7:10274. (In eng). DOI: 10.1038/ncomms10274.
140. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *The New England journal of medicine* 2009;361(16):1570-83. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMr0901217.
141. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature reviews Immunology* 2013;13(10):738-53. (In eng). DOI: 10.1038/nri3523.
142. Rosin DL, Okusa MD. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2011;22(3):416-25. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2010040430.
143. Mulay SR, Linkermann A, Anders HJ. Necroinflammation in Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2016;27(1):27-39. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2015040405.
144. Nakayama M. Macrophage Recognition of Crystals and Nanoparticles. *Frontiers in immunology* 2018;9:103. (In eng). DOI: 10.3389/fimmu.2018.00103.
145. Palecanda A, Paulauskis J, Al-Mutairi E, et al. Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. *The Journal of experimental medicine* 1999;189(9):1497-506. (In eng). DOI: 10.1084/jem.189.9.1497.
146. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nature immunology* 2013;14(8):812-20. (In eng). DOI: 10.1038/ni.2639.
147. Levin R, Grinstein S, Canton J. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunological reviews* 2016;273(1):156-79. (In eng). DOI: 10.1111/imr.12439.
148. Canton J. Phagosome maturation in polarized macrophages. *Journal of leukocyte biology* 2014;96(5):729-38. (In eng). DOI: 10.1189/jlb.1MR0114-021R.

149. Sun M, Wang S, Jiang L, et al. Patulin Induces Autophagy-Dependent Apoptosis through Lysosomal-Mitochondrial Axis and Impaired Mitophagy in HepG2 Cells. *Journal of agricultural and food chemistry* 2018;66(46):12376-12384. (In eng). DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03922.
150. Mulay SR, Steiger S, Shi C, Anders HJ. A guide to crystal-related and nano- or microparticle-related tissue responses. *The FEBS journal* 2020;287(5):818-832. (In eng). DOI: 10.1111/febs.15174.
151. Campden RI, Zhang Y. The role of lysosomal cysteine cathepsins in NLRP3 inflammasome activation. *Archives of biochemistry and biophysics* 2019;670:32-42. (In eng). DOI: 10.1016/j.abb.2019.02.015.
152. McComb S, Shutinoski B, Thurston S, Cessford E, Kumar K, Sad S. Cathepsins limit macrophage necroptosis through cleavage of Rip1 kinase. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2014;192(12):5671-8. (In eng). DOI: 10.4049/jimmunol.1303380.
153. Zhang X, Zhang H, Xu C, et al. Ubiquitination of RIPK1 suppresses programmed cell death by regulating RIPK1 kinase activation during embryogenesis. *Nature communications* 2019;10(1):4158. (In eng). DOI: 10.1038/s41467-019-11839-w.
154. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *The New England journal of medicine* 2014;370(5):455-65. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMr1310050.
155. Choi ME, Price DR, Ryter SW, Choi AMK. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI insight* 2019;4(15) (In eng). DOI: 10.1172/jci.insight.128834.
156. Tampe D, Zeisberg M. Potential approaches to reverse or repair renal fibrosis. *Nature reviews Nephrology* 2014;10(4):226-37. (In eng). DOI: 10.1038/nrneph.2014.14.
157. Zeisberg M, Kalluri R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *American journal of physiology Cell physiology* 2013;304(3):C216-25. (In eng). DOI: 10.1152/ajpcell.00328.2012.
158. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine* 2012;18(7):1028-40. (In eng). DOI: 10.1038/nm.2807.
159. Bohle A, Mackensen-Haen S, von Gise H, et al. The consequences of tubulo-interstitial changes for renal function in glomerulopathies. A morphometric and cytological analysis. *Pathology, research and practice* 1990;186(1):135-44. (In eng). DOI: 10.1016/s0344-0338(11)81021-6.
160. Humphreys BD. Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annual review of physiology* 2018;80:309-326. (In eng). DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034227.
161. Anders HJ. 2018 update in basic kidney research: fibrosis, inflammation, glomerular filtration and kidney disease progression. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2019;34(5):719-723. (In eng). DOI: 10.1093/ndt/gfz006.
162. Schnaper HW. The Tubulointerstitial Pathophysiology of Progressive Kidney Disease. *Advances in chronic kidney disease* 2017;24(2):107-116. (In eng). DOI: 10.1053/j.ackd.2016.11.011.
163. Bechtel W, McGoochan S, Zeisberg EM, et al. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nature medicine* 2010;16(5):544-50. (In eng). DOI: 10.1038/nm.2135.
164. Kaissling B, Lohr M, Kriz W. Renal epithelial injury and fibrosis. *Biochimica et biophysica acta* 2013;1832(7):931-9. (In eng). DOI: 10.1016/j.bbdis.2013.02.010.
165. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney international* 2009;75(11):1145-1152. (In eng). DOI: 10.1038/ki.2009.86.
166. Boor P, Konieczny A, Villa L, et al. PDGF-D inhibition by CR002 ameliorates tubulointerstitial fibrosis following experimental glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2007;22(5):1323-31. (In eng). DOI: 10.1093/ndt/gfl691.
167. Ninichuk V, Gross O, Segerer S, et al. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney international* 2006;70(1):121-9. (In eng). DOI: 10.1038/sj.ki.5001521.
168. King TE, Jr., Bradford WZ, Castro-Bernardini S, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine* 2014;370(22):2083-92. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMoa1402582.
169. Park HS, Bao L, Kim YJ, et al. Pirfenidone suppressed the development of glomerulosclerosis in the FGS/Kist mouse. *Journal of Korean medical science* 2003;18(4):527-33. (In eng). DOI: 10.3346/jkms.2003.18.4.527.

170. Cho ME, Smith DC, Branton MH, Penzak SR, Kopp JB. Pirfenidone slows renal function decline in patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2007;2(5):906-13. (In eng). DOI: 10.2215/cjn.01050207.
171. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *The Journal of biological chemistry* 1983;258(11):7155-60. (In eng).
172. Yan X, Chen YG. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- β signalling. *The Biochemical journal* 2011;434(1):1-10. (In eng). DOI: 10.1042/bj20101827.
173. Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature* 1990;346(6282):371-4. (In eng). DOI: 10.1038/346371a0.
174. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *The Journal of clinical investigation* 1993;92(6):2597-601. (In eng). DOI: 10.1172/jci116874.
175. Robertson IB, Horiguchi M, Zilberberg L, Dabovic B, Hadjiolova K, Rifkin DB. Latent TGF- β -binding proteins. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2015;47:44-53. (In eng). DOI: 10.1016/j.matbio.2015.05.005.
176. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113(6):685-700. (In eng). DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00432-x.
177. Sarraj MA, Escalona RM, Western P, Findlay JK, Stenvers KL. Effects of TGFbeta2 on wild-type and Tgfb3 knockout mouse fetal testis. *Biology of reproduction* 2013;88(3):66. (In eng). DOI: 10.1095/biolreprod.112.102194.
178. Vander Ark A, Cao J, Li X. TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cellular signalling* 2018;52:112-120. (In eng). DOI: 10.1016/j.cellsig.2018.09.002.
179. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nature reviews Nephrology* 2016;12(6):325-38. (In eng). DOI: 10.1038/nrneph.2016.48.
180. Travis MA, Sheppard D. TGF- β activation and function in immunity. *Annual review of immunology* 2014;32:51-82. (In eng). DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120257.
181. Chaiyarit S, Mungdee S, Thongboonkerd V. Non-radioactive labelling of calcium oxalate crystals for investigations of crystal-cell interactions and internalization. *Analytical Methods* 2010;2(10):1536-1541. DOI: 10.1039/c0ay00321b.
182. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2010;8(6):e1000412. (In eng). DOI: 10.1371/journal.pbio.1000412.
183. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2020;18(7):e3000410. (In eng). DOI: 10.1371/journal.pbio.3000410.
184. Knauf F, Asplin JR, Granja I, et al. NALP3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy. *Kidney international* 2013;84(5):895-901. (In eng). DOI: 10.1038/ki.2013.207.
185. Mulay SR, Eberhard JN, Pfann V, et al. Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice. *American journal of physiology Renal physiology* 2016;310(8):F785-f795. (In eng). DOI: 10.1152/ajprenal.00488.2015.
186. Liang X, Schnaper HW, Matsusaka T, Pastan I, Ledbetter S, Hayashida T. Anti-TGF-beta Antibody, 1D11, Ameliorates Glomerular Fibrosis in Mouse Models after the Onset of Proteinuria. *PLoS one* 2016;11(5):e0155534. DOI: 10.1371/journal.pone.0155534.
187. Schreiber A, Shulhevich Y, Geraci S, et al. Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *American journal of physiology Renal physiology* 2012;303(5):F783-8. DOI: 10.1152/ajprenal.00279.2012.
188. Pill J, Kraenzlin B, Jander J, et al. Fluorescein-labeled sinistrin as marker of glomerular filtration rate. *Eur J Med Chem* 2005;40(10):1056-61. (In eng). DOI: 10.1016/j.ejmech.2005.03.020.
189. Buclin T, Pechere-Bertschi A, Sechaud R, et al. Sinistrin clearance for determination of glomerular filtration rate: a reappraisal of various approaches using a new analytical method. *J Clin Pharmacol* 1997;37(8):679-92. (In eng). DOI: 10.1002/j.1552-4604.1997.tb04355.x.
190. Tett SE, Kirkpatrick CM, Gross AS, McLachlan AJ. Principles and clinical application of assessing alterations in renal elimination pathways. *Clin Pharmacokinet* 2003;42(14):1193-211. (In eng). DOI: 10.2165/00003088-200342140-00002.

191. Schock-Kusch D, Xie Q, Shulhevich Y, et al. Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-sinistrin disappearance curves. *Kidney international* 2011;79(11):1254-8. (In eng). DOI: 10.1038/ki.2011.31.
192. Steiger S, Grill JF, Ma Q, et al. Anti-Transforming Growth Factor beta IgG Elicits a Dual Effect on Calcium Oxalate Crystallization and Progressive Nephrocalcinosis-Related Chronic Kidney Disease. *Frontiers in immunology* 2018;9:619. (In eng). DOI: 10.3389/fimmu.2018.00619.
193. Friedemann J, Heinrich R, Shulhevich Y, et al. Improved kinetic model for the transcutaneous measurement of glomerular filtration rate in experimental animals. *Kidney international* 2016;90(6):1377-1385. (In eng). DOI: 10.1016/j.kint.2016.07.024.
194. Fu DA, Campbell-Thompson M. Periodic Acid-Schiff Staining with Diastase. *Methods Mol Biol* 2017;1639:145-149. (In eng). DOI: 10.1007/978-1-4939-7163-3_14.
195. Pizzolato P. Mercurous nitrate as a histochemical reagent for calcium phosphate in bone and pathological calcification and for calcium oxalate. *The Histochemical journal* 1971;3(6):463-9. (In eng). DOI: 10.1007/bf01014785.
196. Mulay SR, Eberhard JN, Pfann V, et al. Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice. *American journal of physiology Renal physiology* 2016;310(8):F785-f795. (In eng). DOI: 10.1152/ajprenal.00488.2015.
197. Salerno M, Kramer CM. Advances in parametric mapping with CMR imaging. *JACC Cardiovascular imaging* 2013;6(7):806-22. (In eng). DOI: 10.1016/j.jcmg.2013.05.005.
198. Durrbaum D, Rodgers AL, Sturrock ED. A study of crystal matrix extract and urinary prothrombin fragment 1 from a stone-prone and stone-free population. *Urological research* 2001;29(2):83-8. (In eng). DOI: 10.1007/s002400000163.
199. Sheng X, Ward MD, Wesson JA. Crystal surface adhesion explains the pathological activity of calcium oxalate hydrates in kidney stone formation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005;16(7):1904-8. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2005040400.
200. Mulay SR, Eberhard JN, Desai J, et al. Hyperoxaluria Requires TNF Receptors to Initiate Crystal Adhesion and Kidney Stone Disease. *J Am Soc Nephrol* 2017;28(3):761-768. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2016040486.
201. Kang HM, Ahn SH, Choi P, et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med* 2015;21(1):37-46. (In eng). DOI: 10.1038/nm.3762.
202. Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Molecular metabolism* 2014;3(4):354-71. (In eng). DOI: 10.1016/j.molmet.2014.02.002.
203. Li SY, Susztak K. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 α (PGC-1 α) in Kidney Disease. *Seminars in nephrology* 2018;38(2):121-126. (In eng). DOI: 10.1016/j.semnephrol.2018.01.003.
204. Noels H, Lehrke M, Vanholder R, Jankowski J. Lipoproteins and fatty acids in chronic kidney disease: molecular and metabolic alterations. *Nature reviews Nephrology* 2021;17(8):528-542. (In eng). DOI: 10.1038/s41581-021-00423-5.
205. Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nature reviews Drug discovery* 2018;17(6):395-412. (In eng). DOI: 10.1038/nrd.2018.45.
206. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews Rheumatology* 2016;12(1):49-62. (In eng). DOI: 10.1038/nrrheum.2015.169.
207. Lech M, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochimica et biophysica acta* 2013;1832(7):989-97. (In eng). DOI: 10.1016/j.bbdis.2012.12.001.
208. Puck A, Küning S, Modak M, et al. The soluble cytoplasmic tail of CD45 regulates T-cell activation via TLR4 signaling. *European journal of immunology* 2021 (In eng). DOI: 10.1002/eji.202149227.
209. Waddell LA, Lefevre L, Bush SJ, et al. ADGRE1 (EMR1, F4/80) Is a Rapidly-Evolving Gene Expressed in Mammalian Monocyte-Macrophages. *Frontiers in immunology* 2018;9:2246. (In eng). DOI: 10.3389/fimmu.2018.02246.
210. Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(2):1336-45. (In eng). DOI: 10.1074/jbc.M406968200.
211. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *Journal of leukocyte biology* 2012;92(6):1177-86. (In eng). DOI: 10.1189/jlb.0512231.
212. Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. *International journal of molecular sciences* 2018;19(12) (In eng). DOI: 10.3390/ijms19123805.

213. Gajko-Galicka A. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Acta biochimica Polonica* 2002;49(2):433-41. (In eng).
214. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *Journal of cell science* 2002;115(Pt 20):3861-3. (In eng). DOI: 10.1242/jcs.00059.
215. Hayashi I, Tome Y, Shimosato Y. Thiosemicarbazide used after periodic acid makes methenamine silver staining of renal glomerular basement membranes faster and cleaner. *Stain technology* 1989;64(4):185-90. (In eng). DOI: 10.3109/10520298909106997.
216. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002;62(1):237-44. (In eng). DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x.
217. Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Crit Care* 2013;17(1):R25. (In eng). DOI: 10.1186/cc12503.
218. Levey AS. Measurement of renal function in chronic renal disease. *Kidney Int* 1990;38(1):167-84. (In eng). DOI: 10.1038/ki.1990.182.
219. Sherman DS, Fish DN, Teitelbaum I. Assessing renal function in cirrhotic patients: problems and pitfalls. *Am J Kidney Dis* 2003;41(2):269-78. (In eng). DOI: 10.1053/ajkd.2003.50035.
220. Levey AS, Stevens LA. Estimating GFR using the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation: more accurate GFR estimates, lower CKD prevalence estimates, and better risk predictions. *Am J Kidney Dis* 2010;55(4):622-7. (In eng). DOI: 10.1053/j.ajkd.2010.02.337.
221. Heymsfield SB, Arteaga C, McManus C, Smith J, Moffitt S. Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method. *Am J Clin Nutr* 1983;37(3):478-94. (In eng). DOI: 10.1093/ajcn/37.3.478.
222. Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP, Myers BD. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int* 1985;28(5):830-8. (In eng). DOI: 10.1038/ki.1985.205.
223. Keppler A, Gretz N, Schmidt R, et al. Plasma creatinine determination in mice and rats: an enzymatic method compares favorably with a high-performance liquid chromatography assay. *Kidney Int* 2007;71(1):74-8. (In eng). DOI: 10.1038/sj.ki.5001988.
224. Evan AP. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatr Nephrol* 2010;25(5):831-41. (In eng). DOI: 10.1007/s00467-009-1116-y.
225. Khan SR, Hackett RL. Crystal-matrix relationships in experimentally induced urinary calcium oxalate monohydrate crystals, an ultrastructural study. *Calcif Tissue Int* 1987;41(3):157-63. (In eng). DOI: 10.1007/bf02563796.
226. Govindaraj A, Selvam R. An oxalate-binding protein with crystal growth promoter activity from human kidney stone matrix. *BJU Int* 2002;90(3):336-44. (In eng). DOI: 10.1046/j.1464-410x.2002.02849.x.
227. Viswanathan P, Rimer JD, Kolbach AM, Ward MD, Kleinman JG, Wesson JA. Calcium oxalate monohydrate aggregation induced by aggregation of desialylated Tamm-Horsfall protein. *Urol Res* 2011;39(4):269-82. (In eng). DOI: 10.1007/s00240-010-0353-7.
228. McKee MD, Nanci A, Khan SR. Ultrastructural immunodetection of osteopontin and osteocalcin as major matrix components of renal calculi. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1995;10(12):1913-29. (In eng). DOI: 10.1002/jbmr.5650101211.
229. Hess B, Nakagawa Y, Coe FL. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *The American journal of physiology* 1989;257(1 Pt 2):F99-106. (In eng). DOI: 10.1152/ajprenal.1989.257.1.F99.
230. Rimer JD, Kolbach-Mandel AM, Ward MD, Wesson JA. The role of macromolecules in the formation of kidney stones. *Urolithiasis* 2017;45(1):57-74. (In eng). DOI: 10.1007/s00240-016-0948-8.
231. Kumar V, Farrell G, Deganello S, Lieske JC. Annexin II is present on renal epithelial cells and binds calcium oxalate monohydrate crystals. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(2):289-97. (In eng). DOI: 10.1097/01.asn.0000046030.24938.0a.
232. D'Amico G, Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney international* 2003;63(3):809-25. (In eng). DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00840.x.
233. Marschner JA, Mulay SR, Steiger S, et al. The Long Pentraxin PTX3 Is an Endogenous Inhibitor of Hyperoxaluria-Related Nephrocalcinosis and Chronic Kidney Disease. *Frontiers in immunology* 2018;9:2173. (In eng). DOI: 10.3389/fimmu.2018.02173.
234. Kanevets U, Sharma K, Dresser K, Shi Y. A role of IgM antibodies in monosodium urate crystal formation and associated adjuvant activity. *J Immunol* 2009;182(4):1912-8. (In eng). DOI: 10.4049/jimmunol.0803777.

235. Garrelfs SF, Frishberg Y, Hulton SA, et al. Lumasiran, an RNAi Therapeutic for Primary Hyperoxaluria Type 1. *N Engl J Med* 2021;384(13):1216-1226. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMoa2021712.
236. Voelker J, Berg PH, Sheetz M, et al. Anti-TGF- β 1 Antibody Therapy in Patients with Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2017;28(3):953-962. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2015111230.
237. Buchtler S, Grill A, Hofmarksrichter S, et al. Cellular Origin and Functional Relevance of Collagen I Production in the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2018;29(7):1859-1873. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2018020138.
238. Zhang Y, Dai Y, Raman A, et al. Overexpression of TGF- β 1 induces renal fibrosis and accelerates the decline in kidney function in polycystic kidney disease. *American journal of physiology Renal physiology* 2020;319(6):F1135-f1148. (In eng). DOI: 10.1152/ajprenal.00366.2020.
239. McGaraughty S, Davis-Taber RA, Zhu CZ, et al. Targeting Anti-TGF- β Therapy to Fibrotic Kidneys with a Dual Specificity Antibody Approach. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2017;28(12):3616-3626. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2017010013.
240. Basile DP, Mehrotra P. Surprising Enhancement of Fibrosis by Tubule-Specific Deletion of the TGF- β Receptor: A New Twist on an Old Paradigm. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2017;28(12):3427-3429. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2017080947.
241. Nlandu-Khodo S, Neelisetty S, Phillips M, et al. Blocking TGF- β and β -Catenin Epithelial Crosstalk Exacerbates CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2017;28(12):3490-3503. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2016121351.
242. Gewin L, Vadivelu S, Neelisetty S, et al. Deleting the TGF- β receptor attenuates acute proximal tubule injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012;23(12):2001-11. (In eng). DOI: 10.1681/asn.2012020139.
243. de Water R, Noordermeer C, van der Kwast TH, et al. Calcium oxalate nephrolithiasis: effect of renal crystal deposition on the cellular composition of the renal interstitium. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1999;33(4):761-71. (In eng). DOI: 10.1016/s0272-6386(99)70231-3.
244. Tang PM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nature reviews Nephrology* 2019;15(3):144-158. (In eng). DOI: 10.1038/s41581-019-0110-2.
245. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008;9(8):847-56. (In eng). DOI: 10.1038/ni.1631.
246. Bussi C, Heunis T, Pellegrino E, et al. Lysosomal damage drives mitochondrial proteome remodelling and reprograms macrophage immunometabolism. *Nature communications* 2022;13(1):7338. (In eng). DOI: 10.1038/s41467-022-34632-8.
247. Neumann K, Castiñeiras-Vilariño M, Höckendorf U, et al. Clec12a is an inhibitory receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death. *Immunity* 2014;40(3):389-99. (In eng). DOI: 10.1016/j.immuni.2013.12.015.
248. Ferenbach DA, Sheldrake TA, Dhaliwal K, et al. Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int* 2012;82(8):928-33. (In eng). DOI: 10.1038/ki.2012.207.
249. Toki D, Zhang W, Hor KL, et al. The role of macrophages in the development of human renal allograft fibrosis in the first year after transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2014;14(9):2126-36. (In eng). DOI: 10.1111/ajt.12803.
250. Zhang MZ, Wang X, Wang Y, et al. IL-4/IL-13-mediated polarization of renal macrophages/dendritic cells to an M2a phenotype is essential for recovery from acute kidney injury. *Kidney international* 2017;91(2):375-386. (In eng). DOI: 10.1016/j.kint.2016.08.020.
251. Martin WJ, Shaw O, Liu X, Steiger S, Harper JL. Monosodium urate monohydrate crystal-recruited noninflammatory monocytes differentiate into M1-like proinflammatory macrophages in a peritoneal murine model of gout. *Arthritis Rheum* 2011;63(5):1322-32. (In eng). DOI: 10.1002/art.30249.
252. Singhto N, Sintiprungrat K, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V. Proteome changes in human monocytes upon interaction with calcium oxalate monohydrate crystals. *J Proteome Res* 2010;9(8):3980-8. (In eng). DOI: 10.1021/pr100174a.
253. Liu L, Zhu X, Zhao T, Yu Y, Xue Y, Zou H. Sirt1 ameliorates monosodium urate crystal-induced inflammation by altering macrophage polarization via the PI3K/Akt/STAT6 pathway. *Rheumatology (Oxford)* 2019;58(9):1674-1683. (In eng). DOI: 10.1093/rheumatology/kez165.

-
254. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 2019;50(4):924-940. (In eng). DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.024.
255. Anders HJ, Suarez-Alvarez B, Grigorescu M, et al. The macrophage phenotype and inflammasome component NLRP3 contributes to nephrocalcinosis-related chronic kidney disease independent from IL-1-mediated tissue injury. *Kidney international* 2018;93(3):656-669. (In eng). DOI: 10.1016/j.kint.2017.09.022.
256. Taguchi K, Okada A, Hamamoto S, et al. M1/M2-macrophage phenotypes regulate renal calcium oxalate crystal development. *Scientific reports* 2016;6:35167. (In eng). DOI: 10.1038/srep35167.
257. Taguchi K, Okada A, Unno R, Hamamoto S, Yasui T. Macrophage Function in Calcium Oxalate Kidney Stone Formation: A Systematic Review of Literature. *Frontiers in immunology* 2021;12:673690. (In eng). DOI: 10.3389/fimmu.2021.673690.
258. Batista-Gonzalez A, Vidal R, Criollo A, Carreño LJ. New Insights on the Role of Lipid Metabolism in the Metabolic Reprogramming of Macrophages. *Frontiers in immunology* 2019;10:2993. (In eng). DOI: 10.3389/fimmu.2019.02993.
259. Malandrino MI, Fucho R, Weber M, et al. Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015;308(9):E756-69. (In eng). DOI: 10.1152/ajpendo.00362.2014.
260. Nelson VL, Nguyen HCB, García-Cañaveras JC, et al. PPAR γ is a nexus controlling alternative activation of macrophages via glutamine metabolism. *Genes Dev* 2018;32(15-16):1035-1044. (In eng). DOI: 10.1101/gad.312355.118.
261. Divakaruni AS, Hsieh WY, Minarrieta L, et al. Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis. *Cell Metab* 2018;28(3):490-503.e7. (In eng). DOI: 10.1016/j.cmet.2018.06.001.
262. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014;41(1):14-20. (In eng). DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
263. Alshaer W, Zureigat H, Al Karaki A, et al. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *Eur J Pharmacol* 2021;905:174178. (In eng). DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174178.
264. Watkins-Chow DE, Pavan WJ. Genomic copy number and expression variation within the C57BL/6J inbred mouse strain. *Genome Res* 2008;18(1):60-6. (In eng). DOI: 10.1101/gr.6927808.
265. Masopust D, Sivula CP, Jameson SC. Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2017;199(2):383-388. (In eng). DOI: 10.4049/jimmunol.1700453.

6 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter, Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Stefanie Steiger bedanken. Ihre fachliche Expertise, ihre unermessliche Unterstützung und ihre enorme Begeisterung für die Forschung haben mich bis heute inspiriert. Dank ihrer intensiven Betreuung erhielt ich eine fundierte Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und hatte die Möglichkeit, mich sowohl fachlich als auch persönlich weiterzuentwickeln. Darüber hinaus ermöglichte Sie mir die Teilnahme an Kongressen und unterstützte mich auch noch nach Abschluss meiner Doktorarbeit in meinem weiteren Weg.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Professor Maciej Lech. Seine wissenschaftliche Expertise, seine wertvollen Anregungen und seine äußerst konstruktiven Rückmeldungen waren mir eine große Hilfe.

Ein besonderer Dank geht zudem an Herrn Professor Hans-Joachim Anders für sein Mentoring und die Chance in seinem Labor ein Forschungsprojekt durchführen zu dürfen. Er ist mir bis heute ein großes Vorbild und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite. An kritischen Zeitpunkten in meinem Projekt zeigte er mir oft in einem ausführlichen Gespräch eine neue Richtung auf und förderte mich auch auf meinem weiteren akademischen Weg.

Des Weiteren möchte ich allen Mitgliedern des Labors für die gute Zusammenarbeit und die tatkräftige Hilfe bei den vielen Methoden danken. Besonders bedanke ich mich bei Dr. med. Anais Rocanin-Arjo und Dr. rer. nat. Julian Marschner, die mich in die tierexperimentellen Methoden einführten sowie Claudia Böhland, die mich grundlegende Techniken biochemischer Versuche lehrte. Ein großer Dank geht zudem an Dr. rer. nat. Simone Romoli sowie an Dr. rer. nat. Santosh Kumar, Dr. rer. nat. Satish Kumar Devarapu, Professor Shrikant Mulay, Dr. Daigo Nakazawa, Tomoyuki Fujikura, Dr. Dr. Marc Weidenbusch und Dr. Dr. Alexander Holderied. Außerdem geht mein Dank an Janina Mandelbaum und Dan Draganovic für die hervorragende technische Unterstützung. Daneben gilt mein Dank Dr. med. Alexander Blaut, Dr. med. Franziska Kraft und Dr. med. Kristina Fleckinger für den Zusammenhalt und die emotionale Unterstützung. Zuletzt möchte ich meiner Familie für die Geduld und die Unterstützung danken und vor allem meinem Mann Severin, den ich während meiner Arbeit kennen lernen durfte.

7 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird hier kein Inhalt angezeigt.

8 Publikationsliste

Publikationen:

Steiger S, **Grill JF**, Ma Q, Bäuerle T, Jordan J, Smolle M, Böhland C, Lech M, Anders HJ (2018). Anti-TGF β IgG elicits a dual effect on calcium oxalate crystallization and progressive nephrocalcinosis-related chronic kidney disease. *Frontiers in Immunology*.

Devarapu SK, **Grill JF**, Xie J, Weidenbusch M, Honarpisheh M, Vielhauer V, Anders HJ, Mulay SR (2017). Tumor necrosis factor superfamily ligand mRNA expression profiles differ between humans and mice during homeostasis and between various murine kidney injuries. *J Biomed Sci*

Marczak H, Krenke K, Griesse M, Peradzyńska J, Lange J, Kulus M, Grochowska M, Seidl E, Dubus JC, **Rodler J**, Schwerk N, Carlens J, Breuer O, Hevroni A, Castillo-Corullón S, Aldeco M, Buchvald FF, Nielsen KG, Mayell S, Torrent A, Bravo-López M, Regamey N, Stehling F, Latzin P, Zschocke A, Hatziagorou E, Ayats R, Eyüboğlu TŞ, Erdem E, Proesmans M, Cunningham S, Moriki D, Pekcan S, Cobanoglu N, Naehrlich L, Lex C, Ullmann N, Baden W, Krikovszky D, Gaboli M, Monge ND, Vivas DN, Rubak SLM, Willemse B, Petrarca L, Wiemers A, Schramm D, Mueller C, Prenzel F, Koucky V, López-Andreu JA, Nathan N (2025). Diagnostic Evaluation and Clinical Findings in Children with Persistent Tachypnea of Infancy and Neuroendocrine Cell Hyperplasia of Infancy: A European Multicenter Retrospective Study. *Chest*.

9 Übereinstimmungserklärung

Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Rodler, Julia

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Die Rolle des Transforming Growth Factor β (TGF β) bei der chronischen
Oxalatnephropathie**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 18.01.2026

Ort, Datum

Julia Felicitas Rodler

Julia Felicitas Rodler