

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

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Die funktionelle Rolle von membranständig exprimiertem TNF in der Immunkomplex-Glomerulonephritis



Dissertation

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

vorgelegt von

Martin Bernhard Müller

aus Weingarten

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Volker Vielhauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Neuhofer

PD Dr. Michael Schmolke

Prof. Dr. Ludger Klein

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2018

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Die Teilergebnisse dieser Promotionsarbeit wurden bereits als Abstract, Poster und Originalartikel veröffentlicht:

1. Müller MB, Hoppe JM, Bideak A, Lux M, Lindenmeyer MT, Müller S, Eltrich N, Ryffel B, Vielhauer V.
Exclusive expression of transmembrane TNF aggravates acute glomerulonephritis despite reduced leukocyte infiltration and inflammation. *Kidney Int.* 2018; In press corrected proof.
2. Müller MB, Hoppe JM, Bideak A, Eltrich N, Vielhauer V.
Distinct proinflammatory functions of soluble and membrane-bound TNF in murine immune complex glomerulonephritis. Abstracts 26th European Renal Cell Study Group Meeting A05, 2014 (26th European Renal Cell Study Group Meeting, Kelheim 27.03.-30.03.2014, Vortrag)
3. Müller MB, Hoppe JM, Bideak A, Eltrich N, Vielhauer V.
Different functions of soluble and membrane-bound TNF in nephrotoxic serum nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24: 308A, 2013. (Kidney Week 2013, American Society of Nephrology, Atlanta 05.11.-10.11.2013, Poster TH-PO918)
4. Müller M, Hoppe J, Bideak A, Eltrich N, Vielhauer V.
Distinct proinflammatory roles of soluble and membrane-bound TNF in immune complex glomerulonephritis. Abstract-USB Stick 2013. (5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin 05.10.-08.10.2013, Poster P 084)
5. Müller M, Hoppe J, Bideak A, Eltrich N, Vielhauer V.
Unterschiedliche inflammatorische Effekte von löslichem und membranständigem TNF bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. *Nieren Hochdruckkr.* 42: 467-468, 2013. (Symposium "Junge Niere", Regensburg 14.06.-15.06.2013, Vortrag)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ZUSAMMENFASSUNG	IX
ABSTRACT	XI
1. EINLEITUNG	1
1.1. Die chronische Nierenerkrankung	1
1.1.1. Bedeutung der chronischen Nierenerkrankung im Gesundheitssystem	2
1.1.2. Physiologie der Niere	4
1.1.3. Ursachen der chronischen Nierenerkrankung	6
1.2. Die Glomerulonephritis	9
1.2.1. Einteilung und Pathophysiologie der Glomerulonephritiden	9
1.2.2. Das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis	13
1.3. Das Tumornekrosefaktor-System	17
1.3.1. Die biologische Funktion des Tumornekrosefaktors.....	17
1.3.2. Signalübertragung via TNF und seiner beiden Rezeptoren.....	18
1.3.3. Interaktion der beiden TNF-Rezeptoren	26
1.3.4. Die Funktion von membranständig exprimiertem TNF	28
1.4. TNF in entzündlichen Nierenerkrankungen	29
1.5. Hypothese und Fragestellung der Arbeit	33
2. MATERIAL UND METHODEN	35
2.1. Material	35
2.1.1. Geräte	35
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	36
2.1.3. Chemikalien, Puffer und Lösungen	37
2.1.4. Oligonukleotid-Primer für die <i>real-time</i> PCR	42

Inhaltsverzeichnis

2.1.5. Antikörper.....	42
2.1.6. Software.....	44
2.2. Tierexperimentelle Methoden.....	45
2.2.1. Versuchstiere.....	45
2.2.2. Tierhaltung.....	45
2.2.3. Genotypisierung.....	46
2.2.4. Induktion der heterologen nephrotoxischen Serumnephritis (NTN).....	48
2.2.5. Injektionsnarkose bei Mäusen.....	50
2.3. Paramagnetische Isolation und Zellkulturstimulation von glomerulärem und tubulointerstitiellem Gewebe.....	51
2.3.1. Allgemeines Funktionsprinzip.....	51
2.3.2. Zellkulturstimulation von isolierten Glomeruli und Tubulointerstitium.....	54
2.4. Immunologische Methoden.....	55
2.4.1. Durchflusszytometrie.....	55
2.4.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	60
2.5. Molekularbiologische Methoden.....	61
2.5.1. RNA Isolation aus Gewebe.....	61
2.5.2. Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der RNA.....	62
2.5.3. Umschreibung der mRNA zu cDNA durch die Reverse Transkriptase.....	62
2.5.4. Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	63
2.5.5. Western Blot.....	65
2.6. Histologische Analyse.....	67
2.6.1. Histopathologische Untersuchung in der Lichtmikroskopie.....	67
2.6.2. Immunhistochemische Färbungen in der Lichtmikroskopie.....	69
2.6.3. Immunfluoreszenzfärbungen.....	71
2.7. Statistische Methoden.....	73
3. ERGEBNISSE.....	74
3.1. Die mTNF-Maus im Modell der heterologen NTN.....	74
3.1.1. Mortalität und systemische inflammatorische Aktivierung.....	74
3.1.2. Funktionelle Nierenparameter.....	75
3.1.3. Evaluation des glomerulären und tubulointerstitiellen Nierenschadens.....	78
3.1.4. Nekroptose in nephritischen Nieren von Wildtyp- und mTNF-Mäusen.....	88

Inhaltsverzeichnis

3.1.5.	Renale Leukozyteninfiltration in der heterologen NTN	90
3.1.6.	Frühe mTNF-abhängige Effekt im Modell der heterologen NTN	96
3.1.7.	Zytokin- und Chemokin mRNA-Expression im Gesamtnierengewebe	98
3.1.8.	Aktivierung des NFκB-Signalwegs in Nieren von Wildtyp- und mTNF-Mäusen	102
3.1.9.	Zusammenfassung des Phänotyps der mTNF-Mäuse in der NTN	105
3.2.	<i>In vitro</i>-Stimulation von isolierten Glomeruli und tubulointerstitiellem Gewebe	107
3.2.1.	TNF, CCL2/MCP-1 und IL-6 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit IL-1β <i>in vitro</i>	108
3.2.2.	Kompartimentspezifische mRNA-Expression nach Stimulation mit IL-1β <i>in vitro</i>	110
3.2.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse der kompartimentspezifischen Stimulation mit IL-1β <i>in vitro</i> ...	112
4.	DISKUSSION	113
4.1.	Interpretation der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur.....	115
4.1.1.	mTNF-Mäuse zeigen eine erhöhte Mortalität	115
4.1.2.	mTNF-Mäuse entwickeln einen vermehrten funktionellen und morphologischen Nierenschaden.	117
4.1.3.	Molekulare Mechanismen der mTNF-abhängigen renalen Gewebeschädigung.....	123
4.1.4.	mTNF-Mäuse zeigen trotz größerer renaler Gewebeschädigung einen verminderten renalen Leukozyteninflux	125
4.1.5.	mTNF-Mäuse weisen eine abgeschwächte renale NFκB-Aktivierung mit verringerter Expression proinflammatorischer Mediatoren auf.....	128
4.1.6.	Die verringerter Expression proinflammatorischer Mediatoren ist in intrinsischen Nierenzellen nachweisbar und unabhängig von einwandernden Leukozyten	131
4.2.	Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick	133
4.2.1.	Zusammenfassung	133
4.2.2.	Ausblick	135
LITERATURVERZEICHNIS	137	
DANKSAGUNG	148	
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	149	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CGA-Klassifikation nach KDIGO modifiziert nach Geberth und Nowack [aus 4].....	2
Abbildung 2: Aufbau des glomerulären Filtrationsapparats [aus 16].	6
Abbildung 3: Diagnoseverteilung aller von QuaSi-Niere erfassten Dialysepatienten im Jahr 2006 [9]..	7
Abbildung 4: Die zehn häufigsten ICD-10 Hauptdiagnosen bei Neuanmeldung eines Patienten auf der Warteliste für ein Nierentransplantat [18].....	8
Abbildung 5: Morphologische Veränderungen bei entzündlichen Erkrankungen der Glomeruli [aus 23].	11
Abbildung 6: Ablagerung von Immunkomplexen im Glomerulus.	13
Abbildung 7: Pathogenese der heterologen (A, B) und autologen (C, D) NTN nach Hoppe et al. [26].	16
Abbildung 8: Die über TNFR1 vermittelten Signalwege im Überblick [47].	23
Abbildung 9: TNFR2 vermittelten Signalwege im Überblick [47].	25
Abbildung 10: Die Interaktion der beiden TNF-Rezeptoren im Überblick [47].	27
Abbildung 11: Genotypisierung der mTNF ^{Δ1-9,K11E} -Mäuse.....	48
Abbildung 12: Aufbau der druckkontrollierten Perfusionsapparatur [124].	49
Abbildung 13: Ablauf der heterologen NTN mit Probenentnahme an Tag 5.....	50
Abbildung 14: Paramagnetische Isolation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums nach Vielhauer [124].....	52
Abbildung 15: Mikroskopische Ansicht nach Perfusion mit magnetischen Beads [124].	54
Abbildung 16: Gatingstrategie der durchflusszytometrisch bestimmten renalen Leukozytenpopulationen.	59
Abbildung 17: Mortalität und IL-6 Serumspiegel in Wildtyp- und mTNF-Mäusen.....	75
Abbildung 18: Albuminurie im Verlauf der NTN in Wildtyp- und mTNF-Mäusen.....	77
Abbildung 19: Serumharnstoffwerte von Wildtyp- und mTNF-Mäusen an Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN.	78
Abbildung 20: Histologische Evaluation des glomerulären Schadens in Wildtyp- und mTNF-Mäusen.	83
Abbildung 21: Evaluation des tubulointerstitiellen Schadens in Wildtyp- und mTNF-Mäusen.	87
Abbildung 22: Western Blots für gespaltene Caspase-3, RIP1 und RIP3.....	89
Abbildung 23: Renale Leukozyteninfiltration an Tag 5 der NTN (Durchflusszytometrie).	92
Abbildung 24: Glomeruläre und tubulointerstitielle Infiltration unterschiedlicher Leukozytenpopulationen an Tag 5 der heterologen NTN.	95
Abbildung 25: Funktionelle Nierenparameter 2 Stunden nach Induktion der heterologen NTN.	97
Abbildung 26: Frühe renale Leukozyteninfiltration in der Durchflusszytometrie.....	98
Abbildung 27: Renale mRNA-Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen an Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN.	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 28: Renale NF κ B-Aktivierung in Wildtyp- und mTNF-Mäusen an Tag 5 der NTN.	105
Abbildung 29: Kompartimentspezifische TNF, CCL2 / MCP-1, IL-6 Ausschüttung nach Stimulation mit IL-1 β Stimulation <i>in vitro</i>	109
Abbildung 30: Kompartimentspezifische TNF-, CCL2/MCP-1- und IL-6-mRNA-Expression nach Stimulation mit IL-1 β <i>in vitro</i>	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der Aufgaben der Niere nach [16].	4
Tabelle 2: Einteilung der GN nach pathologischer Morphologie, Klinik, Grunderkrankung und Prognose [aus 23].	11
Tabelle 3: Verwendete Real-time PCR Primer zur Expressionsanalyse.....	42
Tabelle 4: Primer zum Nachweis der TNF ^{Δ1-9,K11E} -Gensequenz.....	47
Tabelle 5: PCR-Protokoll zur Genotypisierung der mTNF-transgenen Mäuse	47
Tabelle 6: Dosierungstabelle der Injektionsnarkose	51
Tabelle 7: Parameter des Lightcycler 480 bei der Durchführung der <i>real-time</i> PCR.	65

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Activator protein 1
BSA	Bovines Serum-Albumin
cDNA	Komplementäre DNA
cFLAR (cFLIP)	Caspase8 and FADD-like apoptosis regulator
ciAP	Cellular inhibitor of apoptosis protein
CYLD	Cylindromatosis
DAMP	Danger Associated Molecular Patterns
DC	Dendritische Zelle
DD	Death domain
DGfN	Deutschen Gesellschaft für Nephrologie
DISC	Death-inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalitis
EAU	Experimentelle autoimmune Uveoretinitis
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERA-EDTA	European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association
ESRD	End stage renal disease, terminale Niereninsuffizienz
FABP	Fatty acid-binding protein
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GF	Gesichtsfeld (am Mikroskop)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
GST	Glutathione S-Transferase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
I κ B	Inhibitor of NF κ B
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneale (Injektion)
i.v.	Intravenöse (Injektion)
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KO	Knock-out
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
LUBAC	Linear ubiquitin chain assembly complex
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

Abkürzungsverzeichnis

MCD	Minimal-Change-Glomerulopathie
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MS	Multiple Sklerose
MPGN	Membranoproliferative Glomerulonephritis
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomograph
mTNF	membranständige exprimierte TNF
NFκB	Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells
NEMO	NF-kappa-B essential modulator
NIK	NFκB inducing Kinase
n.s.	Nicht significant
NTN	Nephrotoxische Serumnephritis
PAS	Perjodsäure-Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
real-time PCR	Real-time Polymerase-Kettenreaktion
RIP(K)	Receptor-interacting protein (Kinase)
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Rounds per minute
RPGN	Rapid progressive Glomerulonephritis
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standard Deviation
SEM	Standardfehler
SODD	Silencer of death domains
sTNF	Lösliches TNF
TI	Tubulointerstitium
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
TRADD	TNF-receptor type 1-associated DEATH domain protein
TRAF	TNF receptor associated factor
USRDS	United States renal data system
VCAM	Vascular adhesion molecule
vs	Versus
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

Zusammenfassung

TNF ist ein Zytokin, das bei entzündlichen Nierenerkrankungen wie der Immunkomplex- Glomerulonephritis proinflammatorische Effekte vermittelt. Diese führen bei Glomerulonephritiden nicht selten bis zur chronischen Niereninsuffizienz. Die beiden TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 spielen dabei unterschiedliche Rollen innerhalb dieser Entzündungsreaktion. Unter anderem wurde bereits gezeigt, dass TNFR2 im Gegensatz zu TNFR1 für die Induktion der Immunkomplex- Glomerulonephritis essentiell ist. Membranständiges TNF (mTNF) ist im Gegensatz zu löslichem TNF (sTNF) der bevorzugte Ligand von TNFR2. Daher untersucht die vorliegende Arbeit die funktionelle Rolle von mTNF bei der heterologen nephrotoxischen Serumnephritis (NTN), einem Mausmodell der Immunkomplex- Glomerulonephritis.

Die NTN wurde durch eine intravenöse Injektion von Schafantikörpern induziert, die gegen die glomeruläre Basalmembran der Versuchsmäuse gerichtet sind. Untersucht wurden C57BL/6 Wildtyp-Mäuse und transgene mTNF *knock-in* Mäuse, welche zwei nicht abspaltbare $\Delta 1-9$, K11E TNF-Allele besitzen und dadurch nur membranständiges, aber kein lösliches TNF exprimieren. Am fünften Tag nach Induktion der NTN wurden die funktionellen Nierenparameter, der morphologische Nierenschaden sowie die renale Zytokin- und Chemokinproduktion und die damit verbundene renale Leukozyteninfiltration zwischen den beiden Gruppen verglichen. Darüber hinaus wurde *in vitro* die Expression und Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren an isolierten Glomeruli und tubulointerstitiellem Gewebe aus Wildtyp- und mTNF-Mäusen untersucht.

Die mTNF-Mäuse zeigten an Tag 5 der heterologen NTN einen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren verschlechterten nephritischen Phänotyp, der sich durch eine erhöhte Albuminurie und höhere Serumharnstoffwerte äußerte. Dies korrelierte mit einer vermehrten glomerulären Ablagerung von PAS-positivem Material und verstärktem glomerulären Zelltod und Zellproliferation im mTNF-Genotyp. Der verstärkte Untergang von glomerulären Zellen ging dabei mit der niedrigeren Expression des Endothelzellmarkers CD31 im Glomerulus einher. Als ein Mechanismus der verstärkten glomerulären Schädigung konnte in den mTNF-Mäusen eine vermehrt ablaufende Nekroptose im Nierengewebe nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu wiesen die mTNF-Mäuse mit fehlender Bildung von löslichem TNF überraschenderweise eine signifikant niedrigere renale Leukozyteninfiltration auf. Dies korrelierte mit einer reduzierten mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und einer abgeschwächten NFκB-Aktivierung. Eine geringere glomeruläre Expression von proinflammatorischen Mediatoren in mTNF-transgenen Mäusen konnte anhand von *in vitro*-Stimulationsexperimenten an isolierten Glomeruli, unabhängig von einwandernden Leukozyten, bestätigt werden.

Die erarbeiteten Daten zeigen, dass lösliches TNF nach Aktivierung des NFκB-Signalwegs die renale Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen induziert und damit ein bedeutender Faktor für die Vermittlung der renalen Leukozyteninfiltration darstellt. Andererseits ist membranständig exprimiertes TNF ein wichtiger Mediator für die Schädigung von Nierengewebe in der murinen Glomerulonephritis. Seine übermäßige Expression führt zur Verschlechterung der Nierenfunktion mit größerem renalen Gewebeschaden durch die verstärkte Induktion von Zelltod in Form von Nekroptose und dem vermehrten Untergang von glomerulären Endothelzellen. Diese Ergebnisse unterstreichen den Stellenwert von membranständigem TNF als ein mögliches therapeutisches Zielmolekül in entzündlichen Nierenerkrankungen.

Abstract

TNF is a proinflammatory cytokine mediating inflammatory renal diseases such as immune complex glomerulonephritis. The two TNF receptors TNFR1 and TNFR2 play distinct roles in this process, with TNFR2 strongly required for induction of disease. In contrast to soluble TNF (sTNF), membrane-bound TNF (mTNF) predominantly activates TNFR2. Thus, we examined the functional role specifically of mTNF in heterologous nephrotoxic serum nephritis (NTN), a murine model of immune complex glomerulonephritis.

NTN was induced by intravenous injection of anti-glomerular basement membrane sheep serum into C57BL/6 wild-type and mTNF knock-in mice with two uncleavable $\Delta 1-9$, K11E TNF alleles. These mice express mTNF only, but no sTNF (mTNF mice). At day 5 functional renal parameters, renal histology, leukocyte infiltrates and cytokine production were compared between the two groups. In addition, we performed *in vitro* stimulation experiments with glomeruli and tubulointerstitial tissue isolated from wild-type and mTNF mice.

NTN induced in mTNF mice was exacerbated at day 5 compared to wild-type mice, indicated by worsened functional parameters like increased albuminuria and higher urea serum levels. In line with these findings there was a more pronounced deposition of PAS-positive material, together with a higher number of necrotic and proliferating cells inside glomeruli of mTNF mice. Western Blot analysis identified increased renal expression of RIP1 and RIP3 proteins indicating more necroptosis in kidneys of the mTNF group. This was associated with a higher loss of glomerular endothelial cells compared to the wild-type. Surprisingly, increased renal injury was accompanied by significantly lower renal leukocyte infiltrates in mTNF mice and correlated with reduced renal mRNA expression of proinflammatory cytokines and chemokines. Decreased renal cytokine production was due to weaker NF κ B activation *in vivo* and was also present in isolated mTNF glomeruli stimulated with IL-1 β independent of infiltrating leukocytes.

In summary, we demonstrate that soluble TNF predominantly mediates renal leukocyte recruitment, whereas uncleaved membrane-bound TNF is an important mediator of renal tissue damage by induction of necroptosis and loss of glomerular endothelial cells in murine glomerulonephritis. These findings underline the importance of mTNF in inflammatory kidney disease as a possible therapeutic target.

1. Einleitung

1.1. Die chronische Nierenerkrankung

Mit den im Jahr 2002 herausgegebenen Leitlinien der *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI) der *National Kidney Foundation* wurde der Begriff der chronischen Nierenerkrankungen (Synonym: Chronische Niereninsuffizienz oder chronisches Nierenversagen, kurz CKD) neu definiert [1]. Diese Definition wurde anschließend auch von der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN) übernommen und in einer neuen Ausgabe der *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) im Jahre 2012 zuletzt überarbeitet [2]. Danach liegt eine chronische Nierenerkrankung vor, wenn Abweichungen von der normalen Struktur oder Funktion der Nieren für einen längeren Zeitraum als drei Monate bestehen und diese mit negativen Auswirkungen auf die Gesundheit einhergehen [2]. Dabei ist innerhalb dieser drei Monate einer der beiden folgenden Aspekte für die Diagnosestellung ausreichend:

1. Eine strukturelle oder funktionelle Nierenschädigung, mit oder ohne Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Dies beinhaltet die Marker einer Nierenschädigung im Urin und Blut (Proteinurie, Albuminurie und Hämaturie), Anomalien in bildgebenden Verfahren (Sonographie, Computertomographie, MRT) und strukturelle Veränderungen (Histopathologie).
2. Eine glomeruläre Filtrationsrate von weniger als $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ Körperoberfläche, mit oder ohne nachgewiesener Nierenschädigung.

Die Stadieneinteilung der chronischen Nierenerkrankung erfolgt nach der CGA-Klassifikation anhand der Grunderkrankung (*identify cause of CKD, C*), der glomerulären Filtrationsrate (*assign GFR category, G*) und der Albuminurie (*assign albuminuria category, A*) (siehe Abbildung 1). Das letzte Stadium der chronischen Nierenerkrankung ist das sogenannte terminale Nierenversagen (End stage renal disease, ESRD), das durch eine GFR unter $15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ definiert ist. Es geht mit einer stark erhöhten Mortalität einher und führt letztendlich zur Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie wie der Hämodialyse oder einer Nierentransplantation. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate für Dialysepatienten (adjustiert für

Geschlecht und Alter) beträgt laut der *European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association* (ERA-EDTA) in Europa derzeit nur 60,9 Prozent. [3]

Stadium	GFR [ml/min]	
I	>90	Nierenschädigung mit normaler oder erhöhter GFR
II	60–89	Nierenschädigung mit mild eingeschränkter GFR
IIIa	45–59	Mild bis moderat verminderte GFR
IIIb	30–44	Moderat bis schwer verminderte GFR
IV	15–29	Schwer eingeschränkte GFR
V	<15 oder Nierenersatztherapie	Terminales Nierenversagen
Albuminurie-Stadien		
Stadium	Albumin-Exkretionsrate (mg/24h)	
A1	< 30	Normal bis leicht erhöht
A2	30–300	moderat erhöht
A3	> 300	stark erhöht

KDIGO. Summary of recommendation statements. Kidney Int 2013; 3 (Suppl): 5, National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Am J Kidney Dis 2002; 39 (2 Suppl 1):S1
 GFR = glomeruläre Filtrationsrate

Abbildung 1: CGA-Klassifikation nach KDIGO modifiziert nach Geberth und Nowack [aus 4].

1.1.1. Bedeutung der chronischen Nierenerkrankung im Gesundheitssystem

Die chronische Nierenerkrankung stellt mit einer geschätzten globalen Prävalenz von 6-18 % ein weltweites Problem in der Gesundheitsversorgung dar [5]. Zudem steigt die Prävalenz insbesondere in den Industrienationen durch eine steigende Lebenserwartung und dem häufigeren Auftreten von Diabetes mellitus und der Hypertonie weiter an [2]. Auch die globale Mortalität stieg von 1990 mit 400.000 aufgrund einer CKD verstorbenen Patienten auf 735.000 im Jahr 2010 an [6].

Die aktuellsten statistischen Daten zu Nierenerkrankungen in den USA veröffentlicht das *United States Renal Data System* (USRDS) in einem jährlichen Bericht. Im Bericht des Jahres 2014 wird geschätzt, dass aktuell in den USA mehr Patienten an einer chronischen Nierenerkrankung (13,6 %) als an Diabetes mellitus (12,3 %) leiden [7]. Die Prävalenz des terminalen Nierenversagens in den USA stieg 2012 auf 636.905 Fälle und verdoppelte sich damit im Vergleich zu 1995 mit 280.969 Patienten mit ESRD. Im Jahr 2012 wurden in den

USA 402.514 Patienten mit ESRD hämodialysiert und 175.978 Patienten befanden sich in der Nachbehandlung nach Nierentransplantation [8].

Verlässliche und aktuelle Daten aus Deutschland gibt es aufgrund des Fehlens eines nationalen Dialyseregisters nicht. Laut des letzten QuaSi-Niere Jahresberichts 2006/2007, welcher vom Bundesverband Niere e.V. veröffentlicht wurde, wird die Situation in Deutschland ähnlich wie in den USA eingeschätzt. Die Zahl der Dialysepatienten stieg im Zeitraum von 1995 bis 2006 um mehr als 50 % auf 66.508 Patienten am 31.12.2006 an, wie auch die Zahl der Patienten in der Nachsorge nach einer Nierentransplantation bis 2006 auf 25.201 Patienten kontinuierlich stieg [9].

Mit der steigenden Prävalenz der ESRD und den damit notwendigen Nierenersatztherapien oder Organtransplantationen steigen auch die Kosten für das Gesundheitssystem stark an. Die Therapiekosten für die Dialyse betragen in Deutschland rund 40.000 Euro pro Jahr (je nach Dialyseart) und die kostengünstigere Nachsorge eines nierentransplantierten Patienten schlägt mit noch rund 18.000 Euro pro Jahr zu Buche [10]. Dabei ist in Deutschland die Bereitschaft zur postmortalen Organspende laut der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) in den letzten Jahren stark zurückgegangen. Während im Jahr 2011 noch 2.850 Nieren gespendet und transplantiert wurden, waren es 2016 nur 2.094 [11]. Dadurch übersteigt der Bedarf an Spendernieren das derzeitige Angebot um circa das Vierfache. Zum Stichtag am 31.12.2016 warteten 7.876 dialysepflichtige Patienten auf eine Nierentransplantation [11]. Die chronische Nierenerkrankung und seine Komplikationen sind für den Patienten weiterhin mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden [2]. Die CKD erhöht als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen das Risiko an einem Herzinfarkt oder einem Schlaganfall zu versterben [12, 13]. Vor allem in Entwicklungsländern geht die chronische Niereninsuffizienz und dabei insbesondere das Fortschreiten zur terminalen Niereninsuffizienz mit einer stark erhöhten Letalität einher, da hier die Möglichkeiten der Therapie durch Nierenersatzverfahren oder der Nierentransplantation stark eingeschränkt sind [14].

Angesichts dieser Entwicklung zeigt sich deutlich, dass die Behandlung der chronischen Nierenerkrankung und ihrer Komplikationen in Zukunft von großer Bedeutung für das Gesundheitssystem sein wird. Um der medizinischen Herausforderung gerecht zu werden und die volkswirtschaftliche Belastung durch die Behandlung von Patienten mit einer

chronischen Nierenerkrankung zu senken, wird im Moment intensiv an neuen Behandlungsstrategien geforscht, die vor allem die Entstehung und das Voranschreiten einer chronischen Nierenerkrankung verhindern können.

1.1.2. Physiologie der Niere

Die Nieren haben lebensnotwendige Aufgaben in unserem Körper zu erfüllen. Bis vor wenigen Jahrzehnten war ein völliges Nierenversagen gleichbedeutend mit dem Tod des Betroffenen und die infauste Prognose konnte erst durch das Aufkommen der Nierenersatztherapie, durch Dialyse und die Möglichkeit der Nierentransplantation, entscheidend verbessert werden. Eine der Hauptaufgaben der Niere ist die Filtration des Blutplasmas, im Zuge dessen der Urin entsteht. Damit verbunden ist die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, wie zum Beispiel toxische Endprodukte des Eiweißstoffwechsels oder Medikamente. Außerdem stellt die Niere eines der zentralen Organe für die Aufrechterhaltung der Homöostase dar, durch Regulation von Volumenhaushalt, Elektrolytkonzentrationen und des Säure-Basen-Gleichgewichts, sowie des Blutdrucks. Doch auch nicht so offensichtliche Funktionen der Niere, wie die Hormonbildung als endokrines Organ, der Eingriff in die Hormonregulation durch den Abbau von Peptidhormonen und metabolische Prozesse wie die Glukoneogenese sind in ihrer Gesamtheit unerlässlich für das Überleben. Um diese sehr unterschiedlichen Aufgaben erfüllen zu können, bedarf es eines komplizierten Aufbaus und einer hohen Spezifität der einzelnen Nierenzellen [15-17].

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">- Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, z.B. Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, Medikamente- Homöostase: Regulation von Elektrolytkonzentrationen, Volumenhaushalt, Säure-Basen-Status- Blutdruckregulation- Metabolismus: Proteine, Peptidhormone, Glukoneogenese, Toxine u.a.- Hormonbildung: Calcitriol, Erythropoietin; Renin (Enzym)→Angiotensin- Hormonwirkungen: Antidiuretisches Hormon (ADH), Aldosteron, Adrenalin, Atriopeptin (ANP), Calcitriol, Parathormon (PTH), Prostaglandine u.a |
|--|

Tabelle 1: Zusammenfassung der Aufgaben der Niere nach [16].

Die Filtration des Blutplasmas erfolgt in der Niere im Glomerulus (Nierenkörperchen), das am Anfang der kleinsten funktionellen Niereneinheit, dem Nephron, steht. In jeder Niere befinden sich etwa eine Million Nephrone, die zusätzlich zum Glomerulus noch einen nachgeschalteten Tubulusapparat besitzen. Im glomerulären Knäuel aus 30-40 Kapillarschlingen werden pro Tag 180 Liter des sogenannten Primärharns aus dem Blutplasma abgepresst und landen in einem vom Epithelgewebe der Bowman-Kapsel umgebenen Raum, der den Anfang des ableitenden Systems des Nephrons markiert. Entlang des Tubulussystems und in den anschließenden Sammelrohren wird der Primärharn in seiner Zusammensetzung und Volumen stark verändert. Dies wird durch passiven und aktiven Transport bestimmter Moleküle und Elektrolyte über das Tubulusepithel hinweg erreicht. Dabei kommt es zur Sekretion nicht filtrierbarer Substanzen, die ausgeschieden werden müssen und zur Rückresorption von bereits filtrierten Stoffen, die wertvoll für den Körper sind. Dieses Transportsystem zwischen dem Primärharn, dem interstitiellen Nierengewebe und dem Kapillarnetz des Nierenmarks wird durch ein kompliziertes Gegenstromprinzip aufrechterhalten, das zu einem großen osmotischen Konzentrationsgradienten führt. Das Prinzip basiert auf der parallelen Anordnung des auf- und absteigenden Tubulussystems und der Blutkapillaren bei gleichzeitig gegenläufiger Flussrichtung des Harns. Auf diese Weise ist es möglich, die Zusammensetzung des Endharns ganz den Bedürfnissen des Körpers anzupassen [15-17].

Entscheidend für die Filtrationsfunktion der Niere ist die sogenannte Blut-Harn-Schranke der Glomeruli, die den Übertritt von Blutzellen bestimmten Molekülen, wie zum Beispiel Plasmaproteine, in den Primärharn verhindert. Der glomeruläre Filter besteht dabei aus drei Schichten, beginnend mit dem gefensterten Endothel der Kapillaren, der glomerulären Basalmembran und den Podozytenfortsätzen, die durch die Schlitzmembran aus dem Protein *Nephrin* miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 2). Die glomeruläre Basalmembran wird gemeinsam von Endothelzellen und Podozyten aufgebaut und enthält viele negativ geladene Proteoglykane. Auch die Fußfortsätze der Podozyten sind von einer negativ geladenen Glykokalyx überzogen. Zusätzlich zum mechanischen Filter, der vor allem von der glomerulären Basalmembran gebildet wird, entsteht durch die negative Ladung eine Barriere für die überwiegend negativ geladenen Plasmaproteine. Ohne Probleme abfiltriert werden Moleküle unter 5 kDa Größe, wie zum Beispiel die Stoffwechselprodukte Kreatinin oder Harnstoff, sowie Wasser, Elektrolyte und Glukose. Dagegen ist die Blut-Harn-Schranke in der

physiologischen Situation weitgehend undurchlässig für Blutzellen, Makromoleküle und Plasmaproteine über einem Molekulargewicht von 70 kDa oder 3,5 nm Durchmesser. Das negativ geladene und 69 kDa große Albumin wird aus diesem Grund normalerweise nur minimal ausgeschieden. Jedoch kann es bei glomerulärer Schädigung zu einer pathologischen Filtration von Blutzellen und größeren Albumin- und Proteinmengen kommen [15-17].

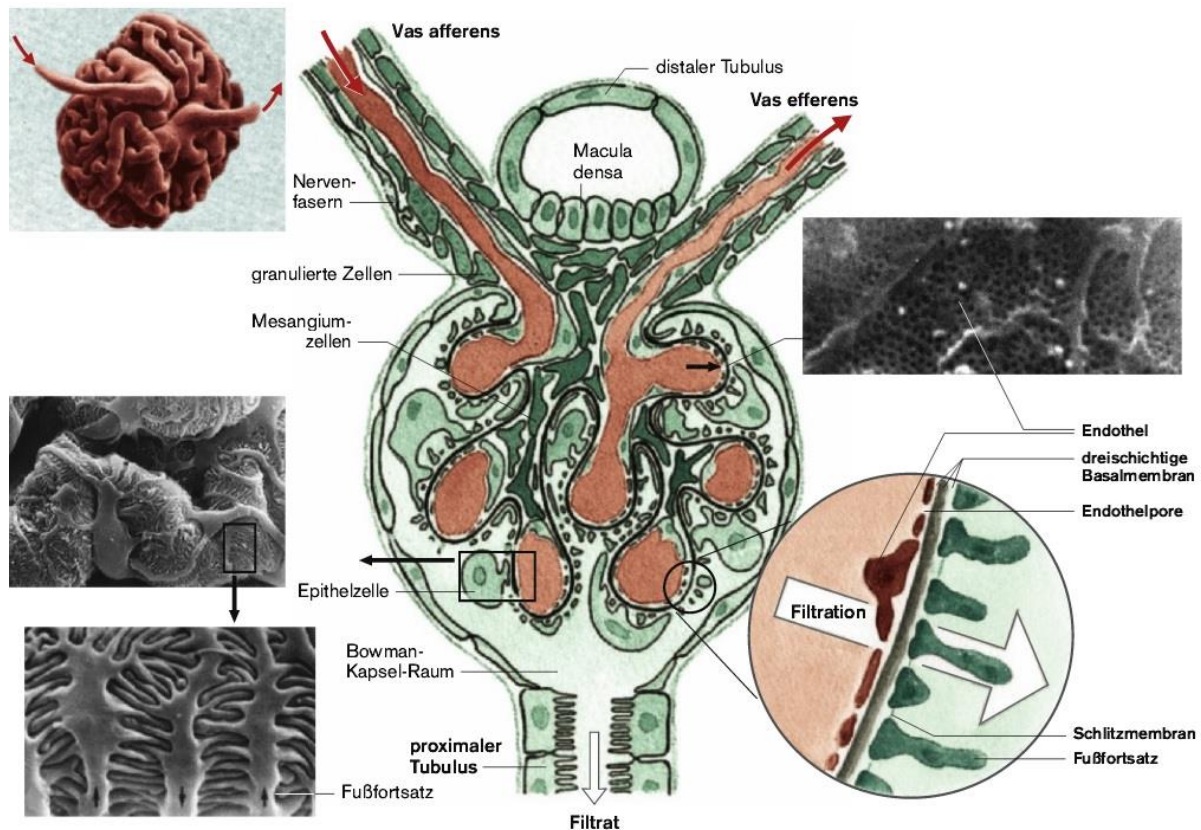


Abbildung 2: Aufbau des glomerulären Filtrationsapparats [aus 16].

1.1.3. Ursachen der chronischen Nierenerkrankung

Die wichtigste Ursache der chronischen Nierenerkrankung sind laut Jahresbericht 2006/2007 QuaSi-Niere des Bundesverbandes Niere e.V. die krankhaften glomerulären Veränderungen infolge einer diabetischen Grunderkrankung. Bei den 48.535 untersuchten Dialysepatienten wurde im Jahr 2006 in 28 % der Fälle ein Diabetes mellitus als Ursache für die Niereninsuffizienz gesehen. An zweiter Stelle der verursachenden Faktoren lag die Glomerulonephritis in 19 % der Fälle, gefolgt von der vaskulären Nephropathie mit 17 % [9]. Die Inzidenz von Patienten mit Nierenersatztherapie aufgrund von Endorganschäden durch

Diabetes und Hypertonie stieg im Verlauf von 1995 bis 2006 an. Während die Diagnoseverteilung zu Beginn der Nierenersatztherapie im Verlauf von 1995 bis 2006 einen Rückgang der Glomerulonephritis als Ursache für eine neubegonnene Dialysetherapie zeigt (siehe Abbildung 3). Trotzdem bleibt in den USA die Glomerulonephritis heutzutage der dritthäufigste Grund für eine langfristige Dialysepflichtigkeit [7].

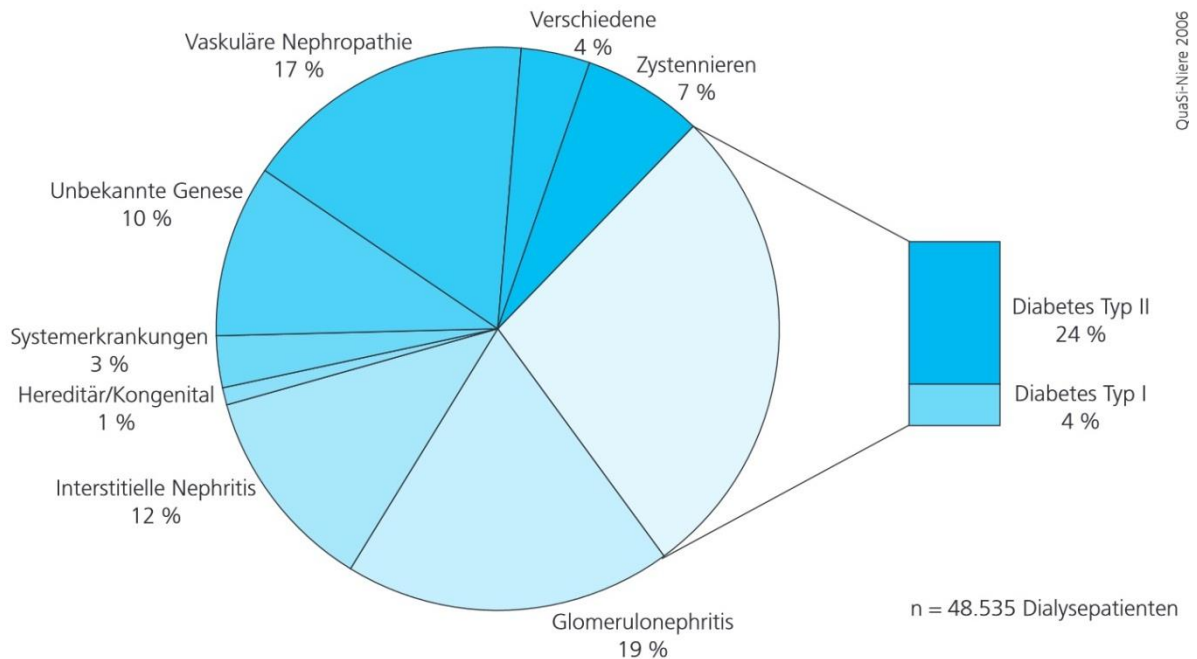


Abbildung 3: Diagnoseverteilung aller von QuaSi-Niere erfassten Dialysepatienten im Jahr 2006 [9].

Des Weiteren waren Glomerulonephritiden, welche unter dem Diagnoseschlüssel des chronischen nephritischen Syndroms zusammengefasst werden, laut der Deutschen Stiftung für Organtransplantation 2013 die Hauptindikation für eine Nierentransplantation (siehe Abbildung 4) [18].



Abbildung 4: Die zehn häufigsten ICD-10 Hauptdiagnosen bei Neuanmeldung eines Patienten auf der Warteliste für ein Nierentransplantat [18].

Bei rund zwei Drittel der Patienten sind Hypertonie, Diabetes und die Glomerulonephritis ursächlich für die chronische Nierenerkrankung. Die ersten beiden Krankheitsbilder werden unter dem Überbegriff des metabolischen Syndroms in Verbindung mit Adipositas zusammengefasst und sind dabei bereits seit Jahrzehnten im Fokus intensiver Forschungsarbeit.

Das Wissen über die Ätiologie und die genauen Pathomechanismen in der Glomerulonephritis sind dagegen weiterhin begrenzt. Deshalb bedarf es dringend weiterer Anstrengungen in diesem Gebiet, um spezifischere Behandlungsmöglichkeiten, unabhängig von Steroiden und Zytostatika, für viele Formen der Glomerulonephritis zu finden. Auf diese Weise könnte das Voranschreiten der Entzündung eingeschränkt werden, um damit die Entstehung einer chronischen Nierenerkrankung und des terminalen Nierenversagens zu verhindern [19].

1.2. Die Glomerulonephritis

Unter dem Begriff der Glomerulonephritis verbirgt sich eine heterogene Gruppe von entzündlichen Erkrankungen der Glomeruli, welche den Filtrationsapparat der Niere bilden. Die Glomerulonephritiden bilden dabei eine Untergruppe der Glomerulopathien, die zusätzlich die nicht-entzündlichen Veränderungen der Glomeruli unterschiedlicher Ursache beinhaltet. Ursächlich liegen den Glomerulopathien genetische Mutationen, Infektionen, Toxinbelastung, Autoimmunerkrankungen, Arteriosklerose, Hypertension, Embolien, Thrombosen oder Diabetes mellitus zugrunde [15]. Zusammengenommen sind die verschiedenen Typen der Glomerulopathien einschließlich der Glomerulonephritiden ein häufiger Grund für die Entstehung der chronischen Nierenerkrankung.

1.2.1. Einteilung und Pathophysiologie der Glomerulonephritiden

Die Glomerulonephritis (GN) ist eine entzündliche Nierenerkrankung, bei der obligat die Glomeruli (Glomerulitis) und häufig auch sekundär das Niereninterstitium (Nephritis) betroffen sind. Sie basiert häufig auf der Bindung von autoreaktiven Antikörpern gegen glomeruläre Bestandteile oder Immunkomplex-Ablagerungen an den glomerulären Kapillaren. Dies dient als Stimulus für die folgende Komplementaktivierung und führt durch weitere Aktivierung des Immunsystems zu glomerulärer Zellschädigung. Anschließend kommt es zur sekundären Infiltration von Entzündungszellen an den Ort der primären Schädigung. Die genaue Pathogenese bleibt in manchen Subtypen bis heute nur unzureichend geklärt [20, 21].

Generell unterscheidet man eine primäre Glomerulonephritis, die sich unabhängig von einer Systemerkrankung primär im Glomerulus manifestiert, von einer sekundären Form, die sich als renale Beteiligung einer systemischen Erkrankung, wie einer Kollagenose oder Vaskulitis, äußert. Dabei führen primäre und sekundäre Glomerulonephritiden zum Teil zu vergleichbarer glomerulärer Morphologie und klinischer Manifestation [21]. Entsprechend wird die sehr heterogene Gruppe der Glomerulonephritiden unter klinischen, histopathologischen und pathogenetischen Gesichtspunkten in verschiedene Typen eingeteilt, wie dies vereinfacht in Tabelle 2 dargestellt ist.

Klinisch wird zwischen akuten und chronischen Verlaufsformen der Glomerulonephritis unterschieden. Da die chronische Verlaufsform oft nur mit milden Symptomen und mit einem schleichenden glomerulären Funktionsverlust einhergeht, wird sie von den Patienten häufig nicht bemerkt und die Diagnosestellung verzögert sich. Dagegen kommt es bei der besonders aggressiven Form der akuten Glomerulonephritis mit hoher entzündlicher Krankheitsaktivität, die entsprechend ihres klinischen Verlaufs als *rapid progressive Glomerulonephritis* (RPGN) bezeichnet wird, unbehandelt in wenigen Wochen bis Monaten zum kompletten Funktionsverlust der Niere. Sowohl die akuten, wie auch die chronischen Verlaufsformen können sich klinisch durch ein nephritisches oder nephrotisches Syndrom, aber auch nur durch asymptomatische Auffälligkeiten im Urinsediment äußern. Das nephritische Syndrom ist durch eine glomeruläre Hämaturie definiert, begleitend liegt meist eine mäßige Proteinurie ($<3,5$ g/24 h), und ein arterieller Hypertonus vor. In dieser Gruppe finden sich die akute postinfektiöse Glomerulonephritis und die sich als RPGN manifestierenden Glomerulonephritiden. Das nephrotische Syndrom ist durch eine große Proteinurie ($>3,5$ g/24 h), eine Hypalbuminämie, Hyperlipoproteinämie und Ödeme gekennzeichnet und weist in der Regel auf einen chronischen progredienten Verlauf der GN mit erheblicher glomerulärer Schädigung hin. Zur klinisch häufig asymptomatischen Gruppe mit glomerulärer Hämaturie in der Urinanalyse zählen die IgA-Nephropathie und das Alport-Syndrom [22].

Meist ist für eine eindeutige Diagnosestellung eine Nierenbiopsie notwendig. In der histopathologischen und immunhistologischen Untersuchung kann anschließend der glomeruläre Schaden morphologisch charakterisiert und die Ablagerung von Antikörpern oder Immunkomplexen in den Glomeruli nachgewiesen werden. Zwei große Gruppen innerhalb der histologischen Einteilung bilden dabei die proliferativen und nicht-proliferativen Glomerulonephritiden, die mit und ohne Vermehrung der glomerulären Zellzahl durch sich teilende Mesangialzellen, Endothelzellen und infiltrierenden Leukozyten einhergehen. Die verschiedenen morphologischen Aspekte der Glomeruli, die bei der histopathologischen Einteilung eine entscheidende Rolle spielen sind in Abbildung 5 dargestellt [20, 23].

GN-Form	führende morphologische Befunde	klinisches Korrelat	assoziierte Grunderkrankungen bzw. systemische Auffälligkeiten	Prognose
GN mit diffuser Halbmondbildung (diffuse extrakapilläre GN)	Proliferation des Bowman-Kapselepithels (extrakapilläre Halbmondbildung)	rapid-progressiver Verlauf in Richtung terminale Niereninsuffizienz	Wegener-Granulomatose Antibasalmembran-GN (Goodpasture-Syndrom) Lupus erythematodes Purpura Schönlein-Henoch	je nach Therapierbarkeit mehr oder minder rascher Übergang in eine Niereninsuffizienz
Minimal-Change-GN	verbreiteter Abstand der Podozytenfüßchen	nephrotisches Syndrom	keine	heilt meist spontan aus
Membranöse GN	Immunkomplexablagerungen entlang der Außenseite der glomerulären Basalmembran	nephrotisches Syndrom	entzündliche Erkrankungen mit Immunkomplex-Bildung	bei rechtzeitiger Therapie gut
Membrano-proliferative GN	Immunkomplexablagerungen entlang der Innenseite der glomerulären Basalmembran, zusätzlich Zellproliferation im Mesangium	nephrotisches Syndrom	Typ I: zirkulierende Immunkomplexe Typ II: C 3-Konvertase-Antikörper	in Abhängigkeit von der Therapie gehen etwa 50% der Fälle in eine terminale Niereninsuffizienz über
Endokapilläre GN	höckerartige Immunkomplexablagerungen an der Außenseite der Basalmembran („Humps“), geschwollene Endothel- und Mesangiumzellen	nephritisches Syndrom	Poststreptokokkensyndrom	gut
Mesangioproliferative GN (IgA-GN)	Zellproliferation im Mesangium	nephritisches Syndrom	IgA-Immunkomplexe	gut

Tabelle 2: Einteilung der GN nach pathologischer Morphologie, Klinik, Grunderkrankung und Prognose [aus 23].

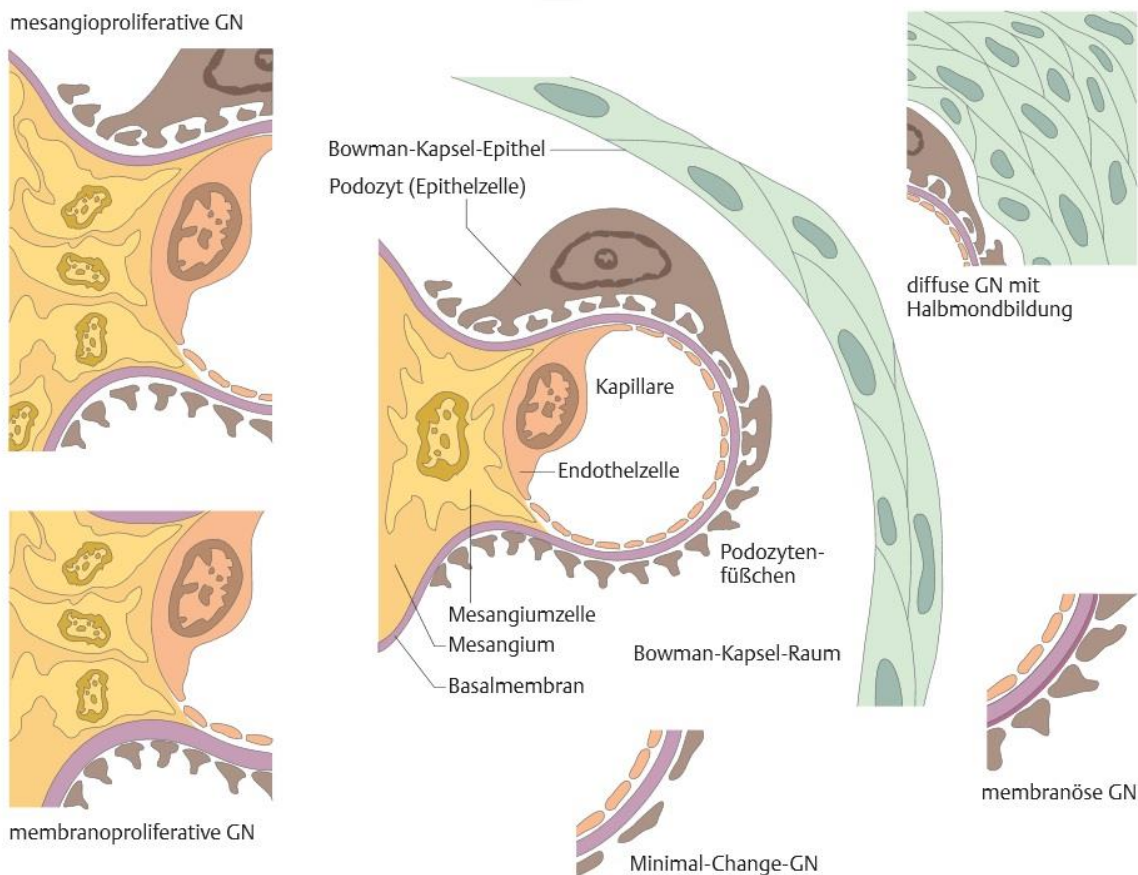


Abbildung 5: Morphologische Veränderungen bei entzündlichen Erkrankungen der Glomeruli [aus 23].

Die immunhistologische und elektronenmikroskopische Untersuchung zeigt, dass es häufig zur Ablagerung von Immunglobulinen und der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, sogenannten Immunkomplexen, im Glomerulus kommt, was die immunologische Genese der GN unterstreicht. Entsprechend kann eine grobe pathogenetische Einteilung der GN in drei Gruppen erfolgen, bei der die ersten beiden Gruppen durch die Ausbildung von Immunkomplexen charakterisiert sind [21].

In der ersten Gruppe kommt es zur Bildung von Antikörpern gegen nicht-glomeruläre endogene Antigene wie körpereigene DNA oder gegen exogene Antigene wie virale oder bakterielle Strukturen. Diese Immunkomplexe bilden sich entweder extrarenal, zirkulieren im Blut und lagern sich entsprechend einer Typ-III-Immunreaktion nach Coombs und Gell granulär in den glomerulären Kapillaren ab oder formieren sich *in situ* im Glomerulus (siehe Abbildung 6 A). Die Immunkomplexablagerungen finden an unterschiedlicher Lokalisation subepithelial bei der akuten postinfektiösen Glomerulonephritis, mesangial bei der IgA-Nephropathie und mesangial und subendothelial bei der Lupusnephritis statt. Anschließend folgt die Aktivierung des Komplementsystems und intrinsischer Nierenzellen. Diese Aktivierung stößt weitere entzündliche Prozesse wie die Infiltration von Leukozyten an, die zur Zellschädigung und zur Ausbildung der Immunkomplex-Glomerulonephritis führt.

Der zweite immunologische Mechanismus, der eine Immunkomplex-Glomerulonephritis verursachen kann, basiert auch auf der Bildung von autoreaktiven Antikörpern. Im Gegensatz zur vorher beschriebenen ersten Gruppe richten sich diese Autoantikörper direkt gegen glomeruläre Bestandteile, wie zum Beispiel gegen die α -3-Kette des Typ IV Kollagens. Dieser Kollagentyp ist ein wesentlicher Bestandteil der glomerulären Basalmembran, weshalb diese Antikörper als Anti-glomeruläre-Basalmembran-Antikörper (Anti-GBM-Antikörper) und die Erkrankung als Anti-GBM-Antikörper-GN bezeichnet wird. Das Ablagerungsmuster entsteht durch die linear entlang der glomerulären Basalmembran gebundenen Antikörper, die zu einer Typ-II-Immunreaktion nach Coombs und Gell führen (siehe Abbildung 6 B). Anschließend folgt wiederum die inflammatorische Aktivierung des Komplements, intrinsischer Nierenzellen und ortsständiger Leukozyten. Da die Basalmembran der Lunge strukturelle Ähnlichkeit mit der glomerulären Basalmembran aufweist, kommt es in über zwei Drittel der Fälle nach Bildung von Anti-GBM-Antikörpern zu einer Lungenbeteiligung mit Hämoptoe, was als *Goodpasture-Syndrom* bezeichnet wird.

Die letzte Gruppe von Glomerulonephritiden entsteht unabhängig von Immunglobulin- und Immunkomplexablagerungen. Beispiele in dieser auch als pauci-immune Glomerulonephritiden bezeichneten Gruppe sind die im Rahmen von Kleingefäßvaskulitiden (Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA-) assoziierte Vaskulitiden) auftretenden Glomerulonephritiden, die durch direkte Schädigung des glomerulären Endothels verursacht werden [21].

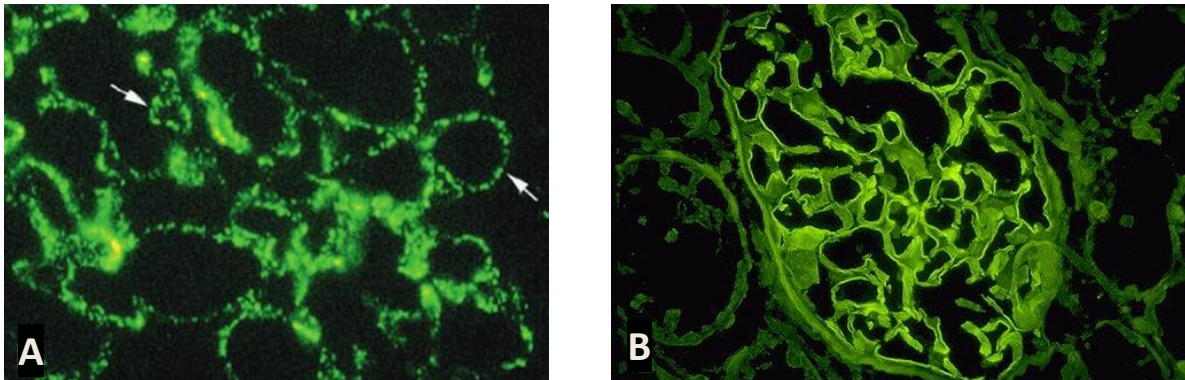


Abbildung 6: Ablagerung von Immunkomplexen im Glomerulus.

Granuläre Ablagerung von Immunkomplexen (A) [aus 20]

vs. lineare Ablagerung von Anti-GBM-Antikörpern bei der Anti-GBM-Antikörper-GN (B) .

1.2.2. Das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis

Die nephrotoxische Serumnephritis (NTN) ist ein etabliertes tierexperimentelles Modell einer durch Immunkomplexe vermittelten Glomerulonephritis. Bereits 1933 wurden die ersten Tierversuche durch den japanischen Pathologen Masugi unternommen und das Modell als Masugi-Nephritis bekannt [24]. Nur kurze Zeit später wurde das Modell von Smadel et al. in Ratten getestet und die pathophysiologischen Mechanismen beschrieben [25]. Heute ist die NTN eines der am meisten benützten Modelle, um immunvermittelte glomeruläre Schädigungen im Tiermodell zu untersuchen.

Im Modell der NTN wird in das Versuchstier (zum Beispiel Maus oder Ratte) ein nephrotoxisches Serum intravenös oder intraperitoneal injiziert. Das nephrotoxische Serum enthält polyklonale Antikörper gegen glomeruläre Strukturen der zu untersuchenden Versuchstierspezies. Diese heterologen Antikörper binden innerhalb von wenigen Minuten ihre Antigene im Glomerulus und führen zur Entstehung von Immunkomplexen. Gewonnen wird das nephrotoxische Serum durch die mehrmalige Immunisierung einer anderen Spezies (Kaninchen oder Schaf) mit glomerulären Proteinen aus der Versuchstierspezies. Da auch

Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran im nephrotoxischem Serum zu finden sind, wird häufig der synonyme Begriff der Anti-GBM-Nephritis verwendet, auch wenn die Immunreaktion zum Teil auf die Antikörperbindung an anderen Strukturen wie zum Beispiel Endothelzellen zurückzuführen ist. Abhängig von der immunisierten Spezies und der Dosis des nephrotoxischen Serums, sowie von einer vorherigen Präimmunisierung gegen das heterologe Immunglobulin, zeigt sich eine große Variabilität in diesem komplexen Modell [26]. Grundsätzlich kann zwischen zwei verschiedenen Phasen im Krankheitsverlauf der NTN unterschieden werden. Dabei spielt zu Beginn der sogenannten heterologen Phase bis zum 7-10 Tag nach Induktion vor allem das unspezifische, angeborene Immunsystem die entscheidende Rolle. Nach dieser initialen Phase kommt es zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems mit Ausbildung einer T-Lymphozyten-abhängigen zellulären und einer B-Lymphozyten-abhängigen humoralen Immunantwort gegen den heterologen Fremdkörper, was als autologe Phase bezeichnet wird. Die nephrotoxische Serumnephritis wird in einer Übersichtsarbeit von Hoppe et al. [26] ausführlich beschrieben und die Pathogenese der heterologen Phase in der folgenden Abbildung 7 A und B und die der autologen in der Abbildung 7 C und D dargestellt.

Nach der initialen Immunkomplexbildung kommt es in der heterologen Phase zur Komplementaktivierung durch Bindung der konservierten Fc-Region auf den Anti-GBM-Antikörpern mit den im Blut zirkulierenden Komplementfaktoren als Teil der unspezifischen Immunantwort. Es wird angenommen, dass die folgende immunvermittelte glomeruläre Schädigung auf der Aktivierung des Komplementsystems und der folgenden Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen basiert, wenngleich es auch Anzeichen für eine direkte Gewebeschädigung durch die Interaktion der heterologen Antikörper mit Podozyten oder Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen gibt. Zusätzlich scheint auch die Aktivierung der *Toll-like-Receptors* (TLR) als Teil des angeborenen Immunsystems einen großen Einfluss auf den Verlauf der heterologen Phase zu haben. Die genannten Mechanismen führen zur Aktivierung von intrinsischen glomerulären Zellen wie Mesangialzellen, Podozyten, Endothelzellen und ortständigen Leukozyten. Dies hat zur Folge, dass eine proinflammatorische Zytokinkaskade angestoßen wird, bei der TNF, Interleukin-1 β und Interferone bedeutende Funktionen haben. Außerdem werden auch Chemokine produziert, die zur vermehrten Einwanderung von Leukozyten in die Glomeruli und in das Tubulointerstitium der Nieren führen [26].

Nach der heterologen Phase folgt bei ausreichender Dosis des nephrotoxischen Serums die autologe Phase der NTN. Diese ist durch die Th1-abhängige Aktivierung von leukozytären Effektorzellen, wie Makrophagen, CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen, und die folgende Gewebeerstörung in Form einer allergischen Reaktion vom Spättyp charakterisiert. Außerdem mündet die T-Zell-vermittelte adaptive Immunantwort in der Aktivierung von spezifischen B-Lymphozyten und Plasmazelle. In deren Endstrecke beginnt die Produktion von autologen Antikörpern, die gegen die spezie fremden Antikörper aus dem nephrotoxischen Serum gerichtet sind. Diese autologen Antikörper sind erst 7-10 Tage nach Induktion im Plasma nachweisbar und führen durch Anlagerung an die heterologen Antikörper im Glomerulus zu großen Immunkomplexen, die die glomeruläre Schädigung weiter verstärken. Damit es zum Übergang von der heterologen Phase in die autologe Phase kommt, müssen entweder ausreichend hohe Dosen des nephrotoxischen Serums verabreicht werden oder eine vorherige Präimmunisierung der Versuchstiere gegen die heterologen Antikörper der Fremdspezies durchgeführt werden. Durch diese Präimmunisierung kommt es zu einer stärkeren Aktivierung des adaptiven Immunsystems, wobei auch eine geringe Dosis des Serums (subnephritische Dosis) ausreicht, um im Verlauf trotz initial geringerem Schaden in der heterologen Phase eine progrediente autologe Glomerulonephritis (autologe NTN) auszulösen [26].

Sowohl die heterologe als auch die progrediente autologe Form der NTN führt zu einer Immunkomplex-induzierten Glomerulonephritis mit Proteinurie, Anstieg der Retentionsparameter, nephritischem und nephrotischem Syndrom, fibrinoider Nekrose, Glomerulosklerose und Halbmondbildung. Sekundär bildet sich eine interstitielle Nephritis mit Schädigung des Tubulussystems, welche durch eine Leukozyteninfiltration, Dilatation und Abflachen der Tubuli, Tubulusnekrose und dem Auftreten von Harnzylindern in den Tubuli gekennzeichnet ist.

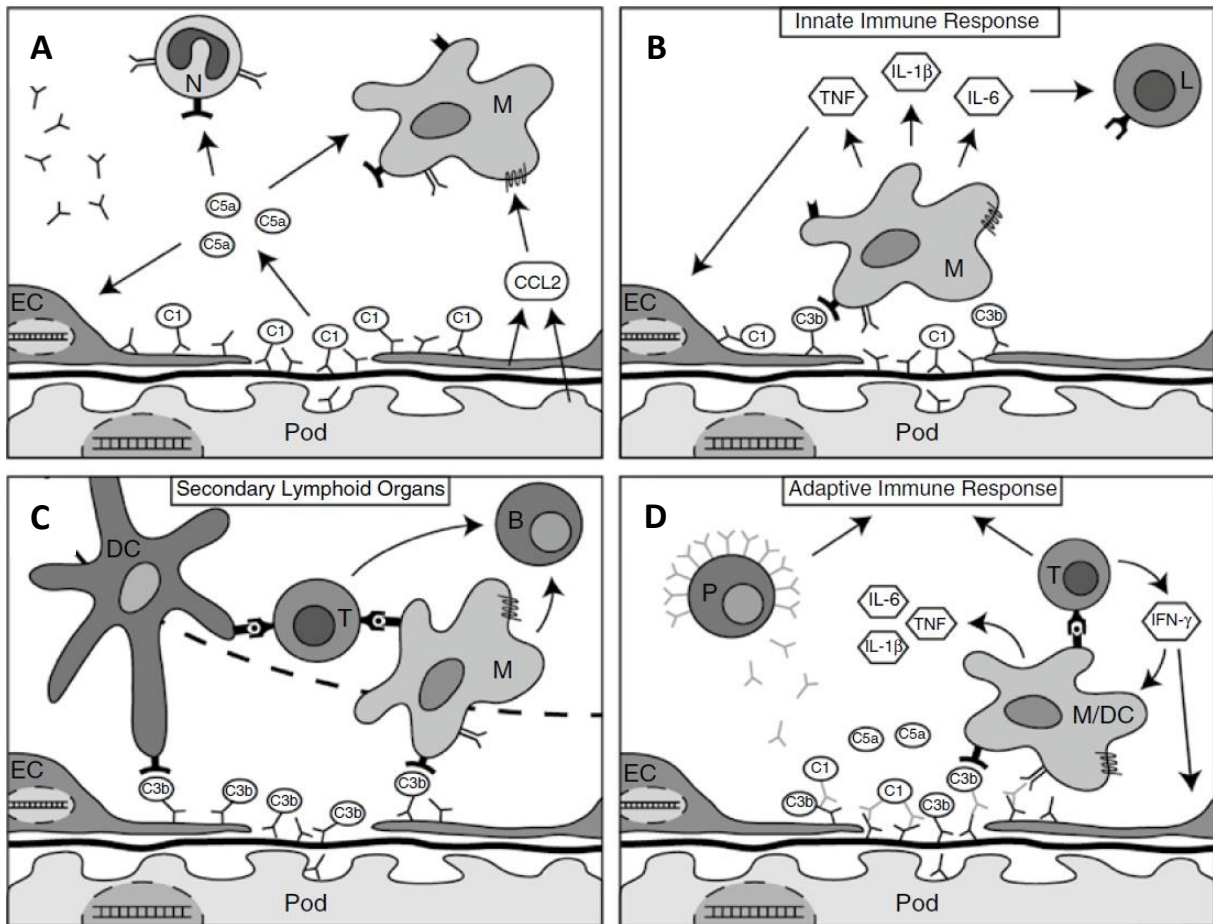


Abbildung 7: Pathogenese der heterologen (A, B) und autologen (C, D) NTN nach Hoppe et al. [26]. (A) Nach der Bindung der heterologen Antikörper aus dem nephrotoxischen Serum an glomeruläre Strukturen wie die Basalmembran (GBM), Endothelzellen (EC) und Podozyten (Pod) kommt es zur Anhaftung der Komplementfaktoren (C1, C3b, C5a) an die konservierte Fc-Region der heterologen Antikörper und zur Bildung von Immunkomplexen. Die Komplementaktivierung führt einerseits zur Einwanderung von Leukozyten wie neutrophilen Granulozyten (N) oder Makrophagen (M) und andererseits zur Aktivierung von intrinsischen Nierenzellen, die Chemokine CCL2/MCP-1 ausschütten und dadurch die Leukozyteneinwanderung noch verstärken. (B) Durch die Internalisierung und Prozessierung der Immunkomplexe durch Makrophagen werden diese aktiviert und setzen vermehrt proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1 β und IL-6 frei. Diese Zytokine führen zu einer proinflammatorischen Signalkaskade durch die zusätzliche Signalmoleküle freigesetzt werden und durch die vermehrt Leukozyten einwandern, was letztendlich zur glomerulären Schädigung führt. (C) In sekundäre lymphatische Organe ausgewanderte Makrophagen und dendritische Zellen präsentieren T-Lymphozyten (T) prozessierte Epitope des heterologen Antikörpers. Die nun aktivierten CD4⁺ T-Zellen setzen die autologe Immunantwort in Gang. (D) Diese beinhaltet die renale Freisetzung des Th-1 Effektorzytokins IFN- γ aus T-Zellen, das Makrophagen stimuliert und eine allergische Reaktion vom Spättyp auslöst. So produzieren die von T-Lymphozyten aktivierten B-Lymphozyten autologe Antikörper, die gegen die heterologen Antikörper aus dem nephrotoxischen Serum gerichtet sind. Durch das Binden der autologen Antikörper bilden sich große Immunkomplexe, die eine verstärkte inflammatorische Reaktion zur Folge haben und dadurch eine progrediente glomeruläre Gewebeschädigung verursachen.

1.3. Das Tumornekrosefaktor-System

1.3.1. Die biologische Funktion des Tumornekrosefaktors

Der Tumornekrosefaktor (TNF, früher TNF- α) ist ein 32 kDa großes homotrimeres Typ-II-Transmembranprotein, dessen humane Gensequenz 1985 entschlüsselt und zehn Jahre zuvor, durch seine namensgebende Fähigkeit hämorrhagische Nekrosen in Sarkomen auszulösen, entdeckt wurde [27]. Am Beginn einer proinflammatorischen Zytokinkaskade stehend, ist es ein entscheidender Mediator systemischer und lokaler Entzündungsreaktionen [28, 29]. Die biologische Aktivität von TNF umfasst die Aktivierung einer großen Bandbreite von verschiedenen, teilweise ambivalenten intrazellulären Signalwegen. Die aktivierten Signalwege können zu Zellproliferation, Differenzierung und Entzündungsantwort auf der einen oder als Mediator des Zelltods zu Apoptose und Nekroptose auf der anderen Seite führen [28, 30].

Die herausragende Rolle von TNF in der Vermittlung verschiedener Entzündungsreaktionen wurde eindrucksvoll in der letzten Dekade durch den erfolgreichen Einsatz TNF-blockierender Biologika wie Etanercept und Infliximab in der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis vulgaris oder des Morbus Crohn bewiesen [16, 31-34]. Andererseits zeigt TNF nicht nur eine proinflammatorische, sondern auch eine gegensätzliche antiinflammatorische Wirkung. Untermauert wird die entzündungshemmende Wirkung durch das Auftreten von lupusartigen Krankheitsbildern mit der Ausbildung von Autoantikörpern oder Glomerulonephritiden in den mit TNF-Blockern behandelten Patienten [35-37]. Außerdem scheint die Blockade von TNF in manchen entzündlichen Erkrankungen zu einer Exazerbation der Entzündungsreaktion zu führen. So ist die antiinflammatorische Wirkung im Besonderen bei Patienten mit Multipler Sklerose und im Tiermodell der Multiplen Sklerose bei der experimentellen allergischen Enzephalitis (EAE) beschrieben, wobei die TNF-Blockade in beiden Fällen mit einem verstärkten Auftreten myelinschädigender Autoreaktivität einherging [38, 39]. Angesichts der Fähigkeit, die Entzündungsreaktion in bestimmten Situationen zu limitieren und autoinflammatorische Prozesse zu unterbinden, stellt TNF einen essentiellen Regulator des immunologischen Gleichgewichts dar [40].

Eine weitere wichtige Stellung nimmt TNF auch in der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen Bakterien, insbesondere intrazelluläre Erreger wie Mykobakterien, und Viren wie zum Beispiel dem HI-Virus, ein [41-43]. Unterstrichen wird dies durch die klinische Beobachtung von Patienten unter TNF-blockierender Therapie, die eine gehäufte Reaktivierung einer latenten Tuberkulose aufweisen [44]. Auch seine proinflammatorische Funktion im durch gramnegativen Bakterien hervorgerufenen septischen Schock verdeutlicht den Stellenwert von TNF sowohl in der Immunabwehr, als auch in der Vermittlung des Gewebeschadens durch körperfremde Erreger [45].

Das Zytokin TNF ist ein Prototyp der TNF-Superfamilie und ist, wie viele andere Vertreter dieser Gruppe, in der Organogenese von lymphatischem Gewebe während der Embryonalentwicklung involviert. Nachgewiesen wurde dies durch das Fehlen oder die unvollständige Entwicklung von lymphatischem Gewebe, wie Peyer'sche Plaques oder Lymphfollikel in TNF-defizienten *Knock-out* Tieren [41, 46].

Damit nimmt TNF eine außerordentliche Stellung innerhalb des Immunsystems in unserem Körper ein. Darüber hinaus mehren sich die Hinweise, dass TNF auch an der Entstehung nicht-entzündlicher Erkrankungen des Menschen wie Diabetes mellitus Typ II, Demenz und Krebserkrankungen, wie akute Leukämie, Glioblastom oder Ovarialkarzinom, beteiligt ist [47].

Diese große Bandbreite an pathophysiologischen Funktionen und den großen Einfluss, den TNF auf viele unterschiedliche biologische Systeme, vom Immunsystem bis hin zur Neurobiologie und Neuropsychiatrie, übernimmt, unterstreicht die Komplexität der TNF-Biologie [48]. Außerdem verdeutlicht dies die Notwendigkeit, ein besseres Verständnis der durch TNF und TNF-Rezeptoren übermittelten Signalwege zu gewinnen. Auf diese Weise könnten spezifischere Angriffspunkte in der zukünftigen Therapie entzündlicher Erkrankungen identifiziert werden, ohne das Auftreten ungewollter Nebenwirkungen in Kauf nehmen zu müssen.

1.3.2. Signalübertragung via TNF und seiner beiden Rezeptoren

Die individuelle Rolle von TNF innerhalb der Entzündungsreaktion ist abhängig von den jeweiligen Rahmenbedingungen innerhalb des Organismus. Die Vermittlung der TNF-spezifischen Effekte beruht dabei auf der Aktivierung zweier funktionell unabhängiger, Typ-

1-Transmembranrezeptoren, TNF-Rezeptor 1 (TNFR1, CD120a, p55) und TNF-Rezeptor 2 (TNFR2, CD120b, p75), die beide Mitglieder der TNFR-Superfamilie sind [41, 47, 49, 50]. Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich deutlich in ihrem Expressionsmuster. Der TNFR1 ist bis auf wenige Ausnahmen wie Erythrozyten auf der Oberfläche aller Zellen konstitutiv exprimiert. Im Gegensatz dazu wird der TNFR2 stark reguliert und vor allem auf Leukozyten, aber auch auf Endothel- und Epithelzellen und auf Podozyten, meist nur nach inflammatorischer Stimulation induziert [30, 48, 51, 52].

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die durch die beiden Rezeptoren vermittelten biologischen Effekte beeinflusst, ist die unterschiedliche Bindungskinetik für ihre Liganden. So wird TNF als stabiles Homotrimer zuerst membranständig exprimiert. Das membranständig exprimierte TNF (mTNF) vermittelt seine biologische Wirkung durch juxtakrine Zell-Zell-Interaktion. Membranständiges TNF wird erst durch die Metalloproteinase *TNF-converting-enzyme* (TACE oder ADAM 17) zum 17 kDa großen, löslichen, parakrin-wirkenden TNF (sTNF) abgespalten [53-57]. Bereits 1995 zeigte Grell et al., dass beide TNF-Rezeptoren eine unterschiedlich starke Affinität zu löslichem und membranständigem TNF besitzen [56]. Dabei bindet lösliches TNF überwiegend an TNFR1 und membranständiges TNF an beide Rezeptoren, wobei nur membranständiges TNF in der Lage ist, den TNFR2 über juxtakrinen interzellulären Kontakt vollständig zu aktivieren. Über die physiologische Relevanz der unterschiedlichen Affinität der Liganden zu beiden Rezeptoren ist noch wenig bekannt [58]. Es wird aber angenommen, dass das membranständige TNF über seine durch Zell-Zell-Kontakt basierende Aktivierung des TNFR2 eine wichtige Rolle in der Vermittlung der lokalen Entzündungsreaktion und damit auch der lokalen Destruktion von Gewebe spielen könnte [50].

Um die TNF-Signalwege und ihre Rolle in der Inflammation näher zu charakterisieren, sind die spezifischen Signalwege der beiden TNF-Rezeptoren zu betrachten. Außerdem kommt der unterschiedlichen Aktivierung der beiden Rezeptoren durch lösliches TNF und membranständiges TNF eine wichtige Rolle zu. Im Folgenden wird auf diese Punkte im Einzelnen eingegangen.

TNFR1-vermittelte Signalwege

Die TNFR1-assoziierten Signalwege führen zu unterschiedlichen biologischen Effekten in der Zelle, die zur Zellproliferation, inflammatorischen Aktivierung oder Zelltod auf der Rezeptor-exprimierenden Zelle führen können [47]. Die Signalübertragung wird nach Bindung des Liganden als lösliches oder membranständiges TNF an das auf der Membran trimerisierte TNFR1-Molekül ausgelöst. In der intrazellulären Region des TNFR1 befindet sich eine sogenannte *Death Domain* (DD), über die das Signal weitergeleitet wird. Es kommt zur Konformationsänderung in der intrazellulären Region, die zum Ablösen des Inhibitorproteins *Silencer of death domain* (SODD) von der *Death Domain* führt. Dieses Protein stellt ein Schutz vor Selbstaktivierung dar und gibt nach seiner Dissoziation die *Death Domain* des TNFR1 frei [59]. Anschließend bindet das Adaptermolekül *TNF-receptor associated death domain protein* (TRADD) an die *Death Domain* und rekrutiert verschiedene weitere intrazelluläre Proteine. Darunter sind der *TNF-receptor associated factor-2* (TRAF2), die *Cellular inhibitor of apoptosis 1* und *2* (cIAP1 und cIAP2) und das *Serin-threonin-kinase receptor interacting protein-1* (RIP1), die zusammen mit TRADD am TNFR1 den intrazellulären Signalkomplex 1 an der Zellmembran bilden [47, 60]. In der Folge kommt es zur Aktivierung von assoziierten Transkriptionsfaktoren wie dem Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFκB) oder dem *Activator protein* (AP-1), die die Genexpression von Mediatoren der Zellproliferation, vor allem aber der Entzündung in Gang setzen.

Der genaue Ablauf der folgenden Signalübermittlung ist nicht abschließend geklärt. Es gibt Anzeichen, dass der erste Schritt in der NFκB-Aktivierung die Bindung von Ubiquitinmolekülen an der K63- oder der linearen Ubiquitin-domäne von RIP1 sein könnte. An dieser Poly-Ubiquitinierung von RIP1 sind verschiedene Proteine aus Komplex 1 wie TRAF2, cIAP1, cIAP2 und der Ubiquitinligase *Linear ubiquitin chain assembly complex* (LUBAC) beteiligt [60]. Die dadurch entstehenden Ubiquitinketten am RIP1-Molekül scheinen als Andockstation oder Gerüst (scaffold) für die Kinasen *Transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase 1* (TAK1) und den *NFκB essential modulator* (NEMO oder IKKγ) zu dienen. Diese Kinasen sorgen über die Aktivierung der *I-κB-Kinasen* IKKα und IKKβ für die Phosphorylierung und dadurch für den anschließenden Abbau des *Inhibitor of NFκB-α* (IκB-α). Nach Ablösen von IκB-α von den Vorläuferproteinen des NFκB-Transkriptionsfaktors sind diese in der Lage Homo- und Heterodimere zu bilden, die abschließend in den Zellkern

gelangen und die Genexpression proliferativer, antiapoptotischer und inflammatorischer Faktoren stimulieren [47, 60, 61]. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der Zellüberleben und Zellproliferation vermittelt und durch TNFR1 aktiviert wird, ist das *Activator protein-1* (AP-1). Hierbei wird der Transkriptionsfaktor durch aktivierte Proteine aus der Familie der MAP-Kinasen (MAPK) wie JNK oder p38-MAPK phosphoryliert und damit zum Eintritt in den Zellkern befähigt. Die MAPK können unter anderem auch von TNFR1 über die oben genannte Kinase TAK1 durch Phosphorylierung aktiviert werden.

Doch TNFR1 vermittelt nicht nur zellerhaltende und proliferative Signale, sondern kann wie oben erwähnt auch regulierten Zelltod wie Apoptose und Nekroptose induzieren. Dies geschieht nach der Internalisierung des an TNFR1 gebundenen Komplex I von der Zellmembran ins Zytosol. Anschließend folgt die Bildung entweder des Signalkomplexes IIa, der über die Aktivierung von Caspasen Apoptose einleitet oder des Komplexes IIb, der bei Blockade dieser Caspasen zur Nekroptose führt. Die genauen Mechanismen, die zur Aktivierung des Zelltods und zum Ausbleiben des antiapoptotischen NFκB-Signalwegs führen sind bis heute noch nicht ganz verstanden.

Ein möglicher Erklärungsansatz liefert die geringere Ubiquitinierung von RIP1 in Abwesenheit der antiapoptotischen Ubiquitinligasen TRAF2 und cAIP1 und 2, oder die Deubiquitinierung durch bestimmte Regulatorproteine wie A20 oder CYLD [62]. Außerdem wurde vor kurzem gezeigt, dass die für die Zelltodinduzierung zwingend erforderliche Internalisierung des Rezeptorkomplexes erst nach Ubiquitinierung des TNFR1 stattfinden kann [63]. Nach der Internalisierung entsteht der Signalkomplex IIa, oder auch *Death-inducing signaling complex* (DISC) genannt, durch Anlagerung des Proteins *Fas-associated death domain* (FADD) an die *Death Domain* von TRADD und die folgende Rekrutierung der Caspase-8. Dieser dimerisiert im entstehenden Komplex IIa und wird zur Autokatalyse angeregt. In Abwesenheit des Apoptoseinhibitors *FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme)-inhibitory protein (c-FLIP)* wird anschließend die Apoptosekaskade durch proteolytische Spaltung bis hin zu den Effektorcaspasen Caspase-3 und Caspase-7 in Gang gesetzt. Wird der Apoptosevorgang blockiert, zum Beispiel durch Hemmung der Caspase-8, kommt es zur Formation von Komplex IIb und der Induktion der Nekroptose, die seit 2009 als alternativer Weg des geplanten Zelltods bekannt ist. Entwicklungsbiologisch wird die Nekroptose als Möglichkeit verstanden, den Zelltod im Falle einer Apoptosehemmung durch virale Proteine einzuleiten.

Im Gegensatz zur Apoptose führt Zelltod durch Nekroptose allerdings zu Freisetzung einer Vielzahl von entzündlichen Mediatoren. Die Nekroptose, wie auch die Apoptose, scheint auch eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung zu spielen, was anhand der frühen Mortalität in *knock-out* Mausmodellen, in denen Schlüsselproteine der Nekroptose wie zum Beispiel RIP1 nicht exprimiert wurden, gezeigt werden konnte [64-66].

Der Signalkomplex IIb wird auch als Nekroptosom bezeichnet und besteht aus RIP1 und zwei weiteren Kinasen, *Serin threonin kinase receptor interacting protein-3* (RIP3) und der *Mixed lineage kinase domain-like* (MLKL). Wird Caspase-8 blockiert, zum Beispiel durch das Protein CrmA, das vom Kuhpocken-Virus produziert wird, folgt die gegenseitige Phosphorylierung von RIP1 und RIP3 [67]. Wird die Kinasefunktion von RIP1 durch den Inhibitor Necrostatin-1 (Nec-1) gehemmt findet keine Nekroptose statt, genauso in RIP3-defizienten Mäusen. Nach der Phosphorylierung von RIP1 und RIP3 folgt die Rekrutierung von MLKL und dessen Phosphorylierung durch RIP3. Es wird angenommen, dass MLKL im phosphorylierten und damit aktivierten Zustand Homotrimere bildet, die an der Zellmembran durch Permeabilisierung zu einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom und damit zum Zelltod führen [62].

Der Vorgang, wie Nekroptose letztendlich zum Tod der Zelle führt und was genau die Balance zwischen der Apoptose- und Nekroptoseinduktion hält, ist noch nicht eingehend geklärt. Es wird angenommen, dass sich die beiden Systeme gegenseitig hemmen. So kann die Caspase-8 nach ihrer Aktivierung durch den Kontakt mit FADD zur proteolytischen Spaltung von RIP1 und RIP3 beitragen und auf diese Weise die Nekroptose hemmen [68], während K63-polyubiquitiniertes RIP1 die Anlagerung von FADD und Caspase-8 verhindert und damit die Formation des Komplex IIa und die Apoptoseinduktion hemmt [69]. Außerdem wird durch RIP1-abhängige NF κ B-Aktivierung die Genexpression von antiapoptotischen Faktoren wie cFLIP, cIAP1, cIAP2 und TRAF2 induziert, was zusätzlich sowohl die Apoptose-, als auch die Nekroptoseinduktion unterdrückt.

Obwohl die Signalübermittlung durch den TNFR1 schon seit mehr als 2 Jahrzehnten in zahlreichen *in vitro* Studien und Mausmodellen untersucht wurde, bleiben noch viele Fragen offen. Abbildung 8 zeigt vereinfacht die durch TNFR1 aktivierten Signalwege. Vor allem, welche molekularen Mechanismen das Schicksal der Zellen – entzündliche Zellaktivierung oder Zelltod bestimmen ist unzureichend verstanden.

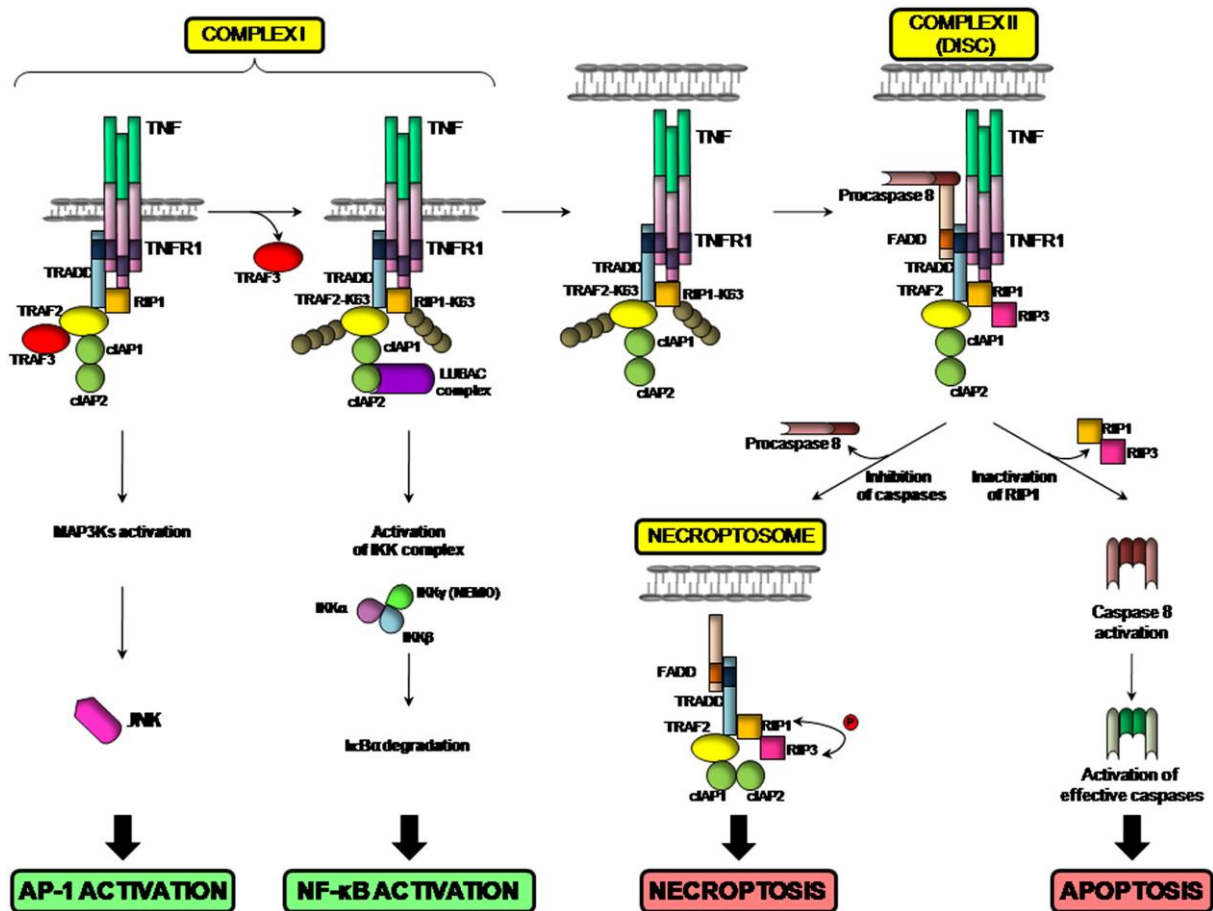


Abbildung 8: Die über TNFR1 vermittelten Signalwege im Überblick [47].

TNFR2 vermittelte Signalwege

Im Gegensatz zum ausführlich untersuchten TNFR1 ist über die Signalübermittlung des TNFR2 weniger bekannt. Dies könnte auch damit zusammenhängen, dass TNFR2 vorrangig über membranständiges TNF aktiviert wird. Die meisten *in vitro*-Stimulationsexperimente zur Erforschung der Funktion des Rezeptors wurden dagegen mit löslichem TNF durchgeführt [58].

Der auffälligste Unterschied zwischen TNFR1 und TNFR2 ist neben der unterschiedlichen Rezeptoraffinität für lösliches oder membranständiges TNF das Fehlen einer *Death Domain* im TNFR2. Nach Bindung des Liganden in Form von membranständigem oder hochkonzentriertem löslichem TNF kommt es zu Trimerisierung des Rezeptors und anschließender Rekrutierung des Adaptermoleküls TRAF2. Die wesentlichen Effekte des TNFR2 werden über TRAF2 und die anschließende Bildung des Signalkomplexes aus den

TRAF2-assoziierten Adaptermolekülen TRAF1 und TRAF3, sowie cIAP1 und cIAP2 vermittelt [58].

TNFR2 ist in der Lage, unabhängig von TNFR1 den NF κ B-Signalweg über IKK α und β zu aktivieren, was genau wie bei der TNFR1 vermittelten Aktivierung über die Phosphorylierung und folgender Degradierung von I κ B- α erfolgt. Im Gegensatz zu TNFR1 ist dieser Prozess von RIP1, NEMO und TAK1 unabhängig und scheint über die Aktivierung der MAP3-Kinase *Phosphatidylinositol-3-Kinase* (PI3K) durch TNFR2 zu erfolgen [70]. Zusätzlich ist TNFR2 nach Aktivierung auch fähig, den sogenannten nichtkanonischen oder alternativen NF κ B-Signalweg zu induzieren [71]. Dieser Weg führt über das Protein *NF κ B-inducing kinase* (NIK) zur Phosphorylierung und Aktivierung der IKK β , die unabhängig von der I κ B- α -Degradation die Prozessierung des NF κ B-p100 Moleküls vermittelt, dem Vorläufermolekül und gleichzeitigen Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF κ B-p52. Nach der Abspaltung von p52 vom p100-Protein kommt es zur Bildung von Homo- oder Heterotrimeren mit dem Faktor RelB, die anschließend in den Zellkern gelangen und die Genexpression steuern. Wie es zur Aktivierung von NIK durch TNFR2 kommt, war lange Zeit ungeklärt. Aktuell geht man davon aus, dass der zytosolische Komplex aus TRAF2, TRAF3 und den angelagerten cIAP1 und cIAP2 zum Abbau von NIK in unstimulierten Zellen führt, was die alternative NF κ B-Antwort begrenzt. Sobald der TNFR2 aktiviert wird, rekrutiert er den TRAF2-Komplex an den Rezeptor an der Zellmembran und hindert ihn dadurch am Abbau von neu synthetisiertem NIK, was den alternativen NF κ B-Signalweg aktiviert.

Zusätzlich spielt die Aktivierung von MAP3-Kinasen, wie beim TNFR1, eine Rolle bei der TNFR2-vermittelten Signalübertragung. So kann es nach Trimerisierung des TNFR2 zur Initiierung der Signalwege über die Autophosphorylierung der MAPK/*extracellular signal-regulated kinase kinase* (MEKK) kommen. Damit stößt der TNFR2 in seiner Endstrecke die Signalkaskaden über die MAPK *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) und p38 an, die die Genexpression über die Transkriptionsfaktoren AP-1 und c-Jun starten [72, 73]. Durch die Aktivierung verschiedener MAP3-Kinasen und sowohl des kanonischen und nicht-kanonischen NF κ B-Signalwegs ist der TNFR2 unabhängig von TNFR1 in der Lage, wichtige Entzündungsmediatoren wie das Chemokin CCL2/MCP-1 und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 oder E-Selektin zu induzieren [50, 74]. Obwohl TNFR2 keine *Death Domain* besitzt wurde gezeigt, dass der Rezeptor teilweise unabhängig von TNFR1 und löslichem TNF auch den

Zelltod durch Apoptose vor allem in Zellen des adaptiven Immunsystems einleiten kann [75, 76]. Zum Beispiel wird in aktivierten $CD8^+$ T-Lymphozyten bei der HIV-Infektion durch TNFR2 und membranständiges TNF Apoptose induziert [77]. Andere Studien sehen in der Aktivierung des TNFR2 über membranständiges TNF einen protektiven Effekt auf autoimmune Prozesse, der zum Beispiel durch die Einleitung der Apoptose in autoreaktiven T-Zellen erklärt werden kann [78]. Inwieweit diese Prozesse TNFR2-spezifisch sind oder auf dem Zusammenwirken der beiden TNF-Rezeptoren und seiner Liganden beruht ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Ein entscheidender Faktor in der biologischen Funktion des TNF-Systems scheint die Fähigkeit von TNFR2 zu sein, die TNFR1-Antwort zu modulieren und kontextspezifisch am Ort einer inflammatorischen Reaktion anzupassen. So zeigen die Signalwege der beiden Rezeptoren zahlreiche molekulare Überschneidungspunkte, auf die im folgenden Kapitel eingegangen wird [47, 58].

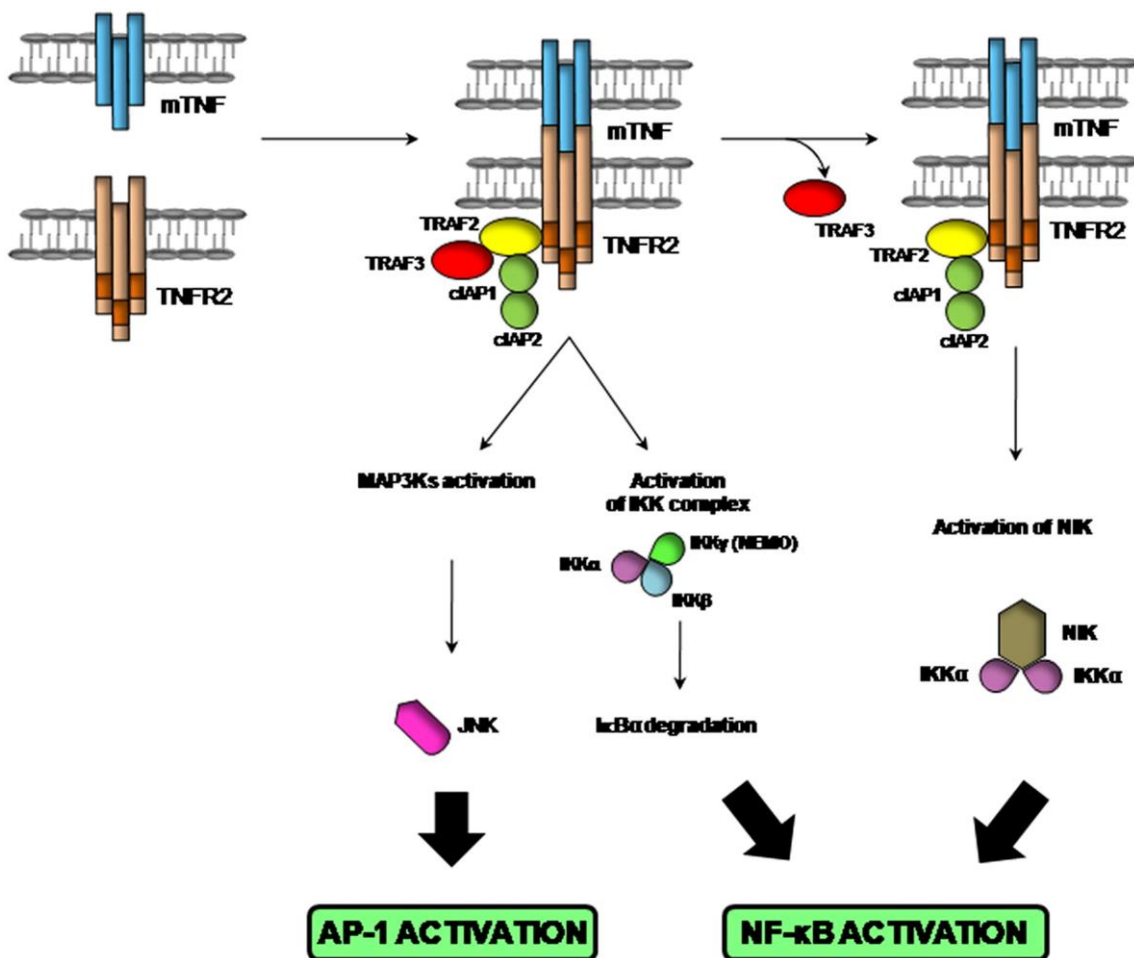


Abbildung 9: TNFR2 vermittelten Signalwege im Überblick [47].

1.3.3. Interaktion der beiden TNF-Rezeptoren

Viele Erkenntnisse zu TNF-Rezeptor-spezifischen Funktionen und der Aktivierung von Signalwegen resultieren aus *in vivo* Experimenten mit *knock-out* Mäusen oder *in vitro* Studien mit Rezeptor-defizienten Zellen, bei denen die Signaltransduktion über einen der beiden Rezeptoren blockiert wurde. Es konnten in den letzten Jahren zunehmend Kenntnisse über die Interaktion der beiden Rezeptoren als physiologischer Regulationsmechanismus im entzündeten Gewebe und zur Feinjustierung der durch TNF ausgelösten Effekte gewonnen werden [47, 58]. Es gibt mehrere Theorien, wie die Interaktion zwischen den Rezeptoren zustande kommt und welche Rolle die unterschiedliche Aktivierungsart der beiden Rezeptoren durch lösliches und membranständiges TNF dabei im Kontext der Entzündungsreaktion spielt.

Zunächst muss man in der Betrachtung des TNF-Systems die Abspaltung der beiden membranständigen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 durch Metalloproteinasen in ihre löslichen Form miteinbeziehen [79]. So können nach deren Aktivierung beide Rezeptoren abgespalten werden, was auch zur Neutralisierung von in der Blutbahn befindlichem löslichem TNF führen könnte. Auf diese Weise könnte auch die Signalübertragung über den Rezeptor terminiert und die TNF-Wirkung als negativer Feedback-Mechanismus begrenzt werden [80]. Durch die Konzentrationsbestimmung der löslichen Rezeptoren im Urin oder Serum, können die abgespalteten Rezeptoren als Marker der TNF-Aktivierung benützt werden [81].

Ein wichtiger Mechanismus der TNF-Rezeptorinteraktion stellt die molekularen Überschneidungspunkte der beiden Rezeptor-Signalwege im Hinblick auf gemeinsame Adaptorproteine dar, die bei beiden Rezeptoren in die Signalübertragung involviert sind. So konnte von Weiss et al. gezeigt werden, dass es nach Aktivierung des TNFR2 zur vermehrten Induktion des Zelltods über TNFR1 durch einen TRAF2-vermittelten Effekt kam [82]. Weitere Studien bestätigten die Interaktion der beiden Rezeptoren bei der Induktion des Zelltods und führten dies auf die Fähigkeit von aktiviertem TNFR2 zurück, das Adaptormolekül TRAF2, das auch eine wichtige Rolle in der durch TNFR1 vermittelten Apoptose und Nekroptose spielt, abzubauen [83-86]. Auch die Aktivierung der kanonischen NF κ B-Antwort wird durch die Depletion von TRAF2 über TNFR2 beeinflusst. So geht die vermehrte Apoptose-Induktion

nach TNFR2-assoziiierter TRAF2-Depletion mit einer geringeren kanonischen NFκB-Antwort und auch JNK-Aktivierung einher, was zu einer geringeren Expression antiapoptotischer Gene führte und zum vermehrten Zelltod beitragen könnte [86, 87].

Zusammenfassend zeigt sich, dass es viele Überschneidungspunkte und Interaktionen der beiden Rezeptoren in Bezug auf ihre Signalübertragung gibt und diese durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Hierzu zählen neben der vorliegenden Form von TNF (lösliches TNF oder membranständiges TNF) auch die Expressionsmuster und die Induzierbarkeit der TNF-Rezeptoren auf verschiedenen Zellen [58]. Dies erklärt die unterschiedlichen Effekte und teils auch gegensätzlichen Funktionen von TNF in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen [88]. Einer dieser beeinflussenden Faktoren ist die Expression des membranständigen TNFs auf Leukozyten und intrinsischen Zellen. Im Gegensatz zum systemisch wirksamen löslichen TNF vermittelt membranständiges TNF seine Funktion durch Zell-Zell-Kontakte, was es vor allem als Mediator der lokalen Entzündungsreaktion und des Gewebeschadens interessant macht. Der Einfluss von membranständig exprimiertem TNF auf das Entzündungsgeschehen wurde bis heute nur in wenigen Modellen untersucht und ist noch nicht abschließend geklärt.

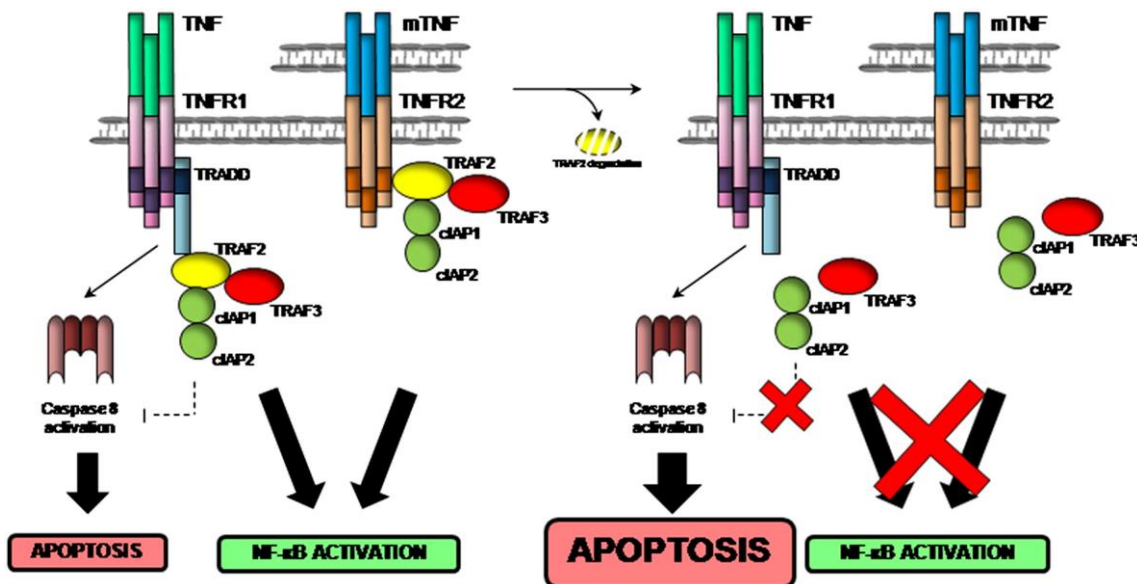


Abbildung 10: Die Interaktion der beiden TNF-Rezeptoren im Überblick [47].

1.3.4. Die Funktion von membranständig exprimiertem TNF

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Rolle von membranständig exprimiertem TNF in der renalen Entzündungsreaktion, über die bis jetzt nur wenig bekannt ist. Dies liegt hauptsächlich an der generellen Verwendung von löslichem TNF als proinflammatorisches Stimulans bei der Untersuchung der Entzündungsreaktion in *in vitro* stimulierten Zellen oder Tiermodellen. Ein passendes Ligandensystem, das *in vitro* Zellen durch membranständiges TNF als Ligand unabhängig von löslichem TNF aktiviert, ist bisher nur schwierig zu realisieren.

Ein anderer Punkt, der die Untersuchung der spezifischen Rolle des membranständigen TNFs erschwert, ist die Beeinflussung des Systems durch die Fähigkeit von membranständigem TNF, als Rezeptor auf den exprimierenden Zellen zu fungieren. Auf diese Weise kann membranständiges TNF nach Bindung an die beiden TNF-Rezeptoren sogenannte *Outside-inside* Signale induzieren, was als *Reverse signaling* bezeichnet wird [49, 89, 90]. Es wird angenommen, dass das *Reverse* und das entsprechende *Forward signaling* durch membranständiges TNF unterschiedliche Effekte auf die NFκB-Aktivierung zeigt, je nachdem ob membranständiges TNF als Ligand oder Rezeptor agiert. So wurde beschrieben, dass membranständiges TNF über *Reverse signaling* einerseits zu einer vermehrten NFκB-Aktivierung führt, die mit einer erhöhten Überlebensrate von Lymphomzellen einhergeht, aber es auf der anderen Seite über *Forward signaling* die konstitutive NFκB-Aktivierung auf der TNF-Rezeptor tragenden Zelle hemmt [91]. Im Kontrast dazu zeigte eine andere Studie, dass membranständiges TNF, exprimiert auf Monozyten, in der Lage ist, durch *Reverse signaling* die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1β und IL-6, aber auch dem immunoregulatorischen IL-10, zu hemmen [92].

Auch die Daten aus *in vivo* Studien, die mit unterschiedlichen Strategien Effekte von membranständigem TNF hemmen oder verstärken, sind nicht eindeutig und unterscheiden sich grundlegend je nach organspezifischem Modell oder der eingesetzten Methode. *In vivo* Daten zur Funktionsweise des membranständigen TNFs gibt es bis jetzt nur in wenigen Krankheitsentitäten der Lunge [93, 94], der Leber [95, 96], des Herzens [97, 98], des Darms [99] und am Auge [100]. Dabei zeigte sich in verschiedenen Modellen, dass membranständiges TNF die Ausbildung der interstitiellen Lungenentzündung, der Colitis, der kardiale Hypertrophie und der Uveitis vorantreibt. Jedoch gibt es andererseits Studien, die einen gegenteiligen Effekt für membranständiges TNF beschreiben. Dabei wurde

membranständigem TNF kein Effekt bei der Vermittlung der Gewebeschädigung in der LPS-induzierten Hepatitis zugeschrieben [101]. Im Kontrast dazu werden auch neuroprotektive Effekte für membranständiges TNF und TNFR2 in Modellen der multiplen Sklerose in der Literatur beschrieben [102]. Auch bei der infektionsvermittelten Reaktion von membranständigem TNF auf bakterielle Infekte, wie dem Toxic-Schock-Syndrom, weist membranständiges TNF eine protektive Funktion auf [103]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass membranständiges TNF auch in Abwesenheit von löslichem TNF ausreicht, um die systemische Abwehrreaktion gegen eine Infektion mit *Mycobakterium tuberculosis* oder Listerien einzuleiten [102, 104].

In jedem Fall stellt membranständiges TNF ein interessantes Zielmolekül einer spezifischen Blockade in entzündlichen Erkrankungen dar, ohne die eventuellen Nebenwirkungen einer Immunsuppression durch vollständige Blockade des TNF-Systems in Kauf nehmen zu müssen. Doch aufgrund seiner ambivalenten Rolle in unterschiedlichen organspezifischen Krankheitsmodellen muss die genaue Funktion von membranständig exprimiertem TNF auch in Modellen renaler Erkrankungen weiter untersucht werden.

1.4. TNF in entzündlichen Nierenerkrankungen

Auch bei entzündlichen Nierenerkrankungen wie der Immunkomplex-Glomerulonephritis spielen TNF-abhängige proinflammatorische Effekte eine entscheidende Rolle [105-107]. Allerdings sind bis heute noch keine Therapien mit Zytokin-hemmenden Antikörpern als Alternative zur konventionellen Immunsuppression mit nebenwirkungsreichen Kortikosteroiden oder Zytostatika bei der Behandlung von Glomerulonephritiden in Menschen etabliert [19].

TNF wird von einer Vielzahl von Zellen als Antwort auf Entzündung, Infektion, Gewebeschädigung und Veränderungen des sie umgebenden Milieus, insbesondere von aktivierten Makrophagen und Monozyten, sowie anderen Leukozyten wie Lymphozyten, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten, exprimiert [27]. Aber auch andere nicht-leukozytäre Zellen sind in der Lage TNF zu bilden, darunter sind Endothelzellen, Myozyten, Fibroblasten und Osteoklasten, sowie intrinsische Nierenzellen [27, 30]. TNF wird

in der Niere nicht konstitutiv gebildet, sondern nur unter inflammatorischen Bedingungen, nachdem die Zellen durch einen proinflammatorischen Stimulus wie Lipopolysaccharid (LPS), Interleukine (IL-1 β , IL-6), Interferone (IFN- γ) oder TNF selbst aktiviert wurden. Diese initial aktivierende Freisetzung von oben genannten Entzündungsmediatoren geschieht häufig durch gewebständige Leukozyten oder geschädigte intrinsische Nierenzellen am Ort der Gewebeschädigung und setzt durch Aktivierung weiterer botenstoffproduzierender Zellen eine Zytokinkaskade in Gang. Es kommt innerhalb kurzer Zeit zur Akkumulation proinflammatorischer Zytokine und chemotaktischer Botenstoffe (Chemokine). Dies führt in der Folge zur sekundären Rekrutierung weiterer Leukozyten aus der Blutbahn an den Ort der Gewebeschädigung, was eine wichtige pathophysiologische Funktion von TNF in der Entzündungsreaktion darstellt. Vermittelt wird diese Leukozyteninfiltration durch eine unter anderem durch TNF vermittelte Expressionsänderung von Oberflächenmolekülen auf aktivierten Endothelzellen und im Blut zirkulierenden Leukozyten. So werden Zelladhäsionsmoleküle wie *Intercellular adhesion molecules* (ICAM) und *Vascular cell adhesion molecules* (VCAM) auf Endothelzellen und Selektine und Integrine auf Leukozyten vermehrt auf der Zellmembran exprimiert. Diese Moleküle interagieren und führen zuerst zur Verlangsamung, dann zum Anhaften von Leukozyten an Endothelzellen und später zum Übertritt der Leukozyten aus der Blutbahn ins entzündete Gewebe [29, 108-110]. Von dort aus folgen die Leukozyten dem Konzentrationsgradienten der leukotaktischen Chemokine an den Ort der Gewebeschädigung, werden dort aktiviert und führen durch die Sezernierung weiterer Mediatoren letztendlich zur chronischen Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion [29]. In seiner Endstrecke mündet dieser langanhaltende entzündliche Prozess im Umbau des zerstörten Gewebes in fibrotisches und funktionsloses Narbengewebe.

Die beiden TNF-Rezeptoren werden auch in der Niere vor allem im Glomerulus auf Endothelzellen und im Mesangium, wie auch auf Podozyten exprimiert [111-113]. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit zeigte sich dabei eine 30-fach höhere glomeruläre TNFR1 mRNA-Expression im Vergleich zum TNFR2 in gesunden Mäusenieren [113]. Nach Stimulation mit TNF und IFN- γ konnte in diesen *in vitro* Experimenten der TNFR2 aber auf glomerulären Mesangialzellen sehr schnell und stärker als TNFR1 induziert werden. Dies deckt sich mit der Erkenntnis aus humanen Nierenbiopsien und Mausmodellen, dass die Transkription von TNFR2 in einer Vielzahl von Nierenerkrankungen speziell am Ort der

Schädigung induziert wird [111-115]. Dies legt eine spezifische Funktion von TNFR2 vor allem in der pathologischen Situation nach inflammatorischer Stimulation nahe [30].

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis von Vielhauer et al. bereits gezeigt, dass TNFR2 eine essentielle Rolle bei der TNF-vermittelten Inflammation und Schädigung in Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritiden spielt. In diesem autologen NTN-Modell mit endogener Antikörper-Produktion waren TNFR2-defiziente Mäuse gegen die Nephritis geschützt. Die *knock-out* Mäuse entwickelten keine Proteinurie und zeigten weder eine vermehrte renale Leukozyteninfiltration, noch eine erhöhte renale Gewebeschädigung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen [116]. TNFR1-defiziente Mäuse wiesen dagegen nur zu frühen Zeitpunkten im Verlauf der Glomerulonephritis einen abgeschwächten nephritischen Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf, der von einer geringeren adaptiven Immunantwort begleitet wurde. Der Krankheitsverlauf näherte sich jedoch zu späteren Zeitpunkte wieder dem der Wildtyp-Tiere mit vermehrter Proteinurie und Leukozyteninfiltration an, was durch eine starke Akkumulation von T-Zellen in der Niere und ausbleibende Apoptose dieser Zellen erklärt werden konnte [116].

Nicht nur die TNF-Rezeptoren sind in intrinsischen Nierenzellen exprimiert, auch die Produktion von TNF selbst findet, außer in einwandernden Leukozyten [117], in residenten Nierenzellen wie Podozyten, Mesangial- und tubulären Epithelzellen statt [118-120]. Interessanterweise zeigten Arbeiten mit murinen Knochenmarkchimären von Tipping et al., dass eine TNF-Expression in intrinsischen Nierenzellen, nicht aber in Leukozyten vorrangig für den glomerulären Schaden und Funktionsverlust sowie die renale Entzündungsreaktion in einer Immunkomplex-Glomerulonephritis verantwortlich ist [121]. So zeigten knochenmarkchimäre Mäuse mit abwesender Produktion von TNF in intrinsischen Nierenzellen, aber vorhandener leukozytärer TNF-Produktion eine deutlich abgeschwächte Nephritis, vergleichbar mit der Nephritis in komplett TNF-defizienten Mäusen. Im Kontrast dazu war in Mäusen mit normaler TNF-Ausschüttung in Nierenzellen und TNF-defizienten Leukozyten der nephritischen Phänotyp im Vergleich zu Tieren mit normaler TNF-Expression unverändert. Analog zu diesen Ergebnissen war in der Arbeit von Vielhauer et al. die TNFR2-Expression auf intrinsischen Nierenzellen im Gegensatz zur Expression auf einwandernden Leukozyten essentiell für die Induktion einer Glomerulonephritis [116]. Außerdem wurde in

Podozytenzelllinien *ex vivo* eine wichtige Rolle des TNFR2 für die Entstehung von charakteristischen Pathologien in Podozytopathien nachgewiesen [112]. Im Gegensatz dazu ist die Bildung des bei der Glomerulonephritis wichtigen Zytokins Il-1 β nur in einwandernden Leukozyten von entscheidender Bedeutung bei der Entwicklung einer Immunkomplex-Glomerulonephritis [116].

Zusammenfassend legen diese Daten die Hypothese nahe, dass intrinsische Nierenzellen wie Mesangialzellen über ihre Expression von membranständigem TNF und der darauffolgenden juxtakrinen Aktivierung des TNFR2 auf benachbarten Nierenzellen, beispielsweise glomeruläre Endothelzellen, die renale Schädigung in Glomerulonephritiden auslösen könnten.

Da die Wirkung von membranständigem TNF in der Niere bisher weder *in vivo* noch *in vitro* beschrieben wurde, ist es das Ziel dieser Arbeit, die funktionelle Rolle von membranständig exprimiertem TNF in der murinen nephrotoxischen Serumnephritis als Modell einer Immunkomplex-Glomerulonephritis zu untersuchen und die zugrundeliegenden Mechanismen zu erforschen. Dazu wurden transgene Mäuse mit veränderter TNF-Expression verwendet, die nur membranständiges, aber kein lösliches TNF bilden.

1.5. Hypothese und Fragestellung der Arbeit

TNF ist ein wichtiger Mediator entzündlicher Nierenerkrankungen. In zahlreichen humanen und murinen Studien konnte seine pathophysiologische Rolle unter anderem in der Immunkomplex-Glomerulonephritis nachgewiesen werden. Obwohl eine Therapie mittels TNF-Blockade in vielen entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder der Psoriasis vulgaris bereits etabliert ist, scheiterte bislang der klinische Einsatz dieser Biologika bei entzündlichen Nierenerkrankungen durch die Ausbildung autoinflammatorischer Nebenwirkungen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass TNF neben der proinflammatorischen Funktion auch die Fähigkeit besitzt, immunoregulatorisch zu wirken, wobei es auf diese Weise die Entzündungsreaktion steuert und autoimmune Prozesse unterbindet. Welche weitreichenden Konsequenzen ein Eingriff in dieses System durch TNF-blockierende Medikamente hat, zeigt sich außerdem an deren Nebenwirkungen wie der Immunsuppression, die unter anderem zum Aufflammen einer latenten Tuberkulose führen kann. So wird deutlich, dass eine spezifischere TNF-Blockade im klinischen Einsatz erstrebenswert wäre, welche einerseits den schädigenden Einfluss von TNF reduziert, jedoch andererseits die autoinflammatorischen Nebenwirkungen vermeidet und weiterhin eine ausreichende Infektabwehr gewährleistet. Um dieser Herausforderung gerecht zu werden, ist es wichtig, einen besseren Einblick in die spezifischen Funktionen und Mechanismen innerhalb des komplexen TNF-Systems zu erlangen.

In diesem Kontext ist zu bedenken, dass die beiden die biologische Wirkung von TNF vermittelnden TNF-Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, große Unterschiede sowohl in ihrer Ligandenaffinität und Signaltransduktion, als auch in ihrem Expressionsmuster aufweisen. Außerdem ist bekannt, dass die beiden Rezeptoren miteinander interagieren und je nach Gewebetyp, involvierten Zellen und Umgebungsbedingungen unterschiedliche Signale übermitteln können. Ein wichtiger Schlüssel zur Erklärung dieser lokal unterschiedlich ablaufenden Reaktion ist das membranständig exprimierte TNF, das seine biologische Wirkung durch Zell-Zell-Interaktion nur auf benachbarte Zellen ausübt. Das membranständige TNF wird von einer Vielzahl von Zellen, unter anderem auch in der Niere gebildet, bevor es durch Metalloproteinasen von der Zelloberfläche abgespalten wird und in die lösliche TNF-Form übergeht. Welche Signale von membranständigem TNF während der

inflammatorischen Reaktion übermittelt werden und welche pathophysiologische Stellung es in diesem Prozess einnimmt, ist bis heute nur in wenigen *in vivo* Modellen mit zum Teil widersprüchlichen Resultaten untersucht worden. Auch in der Niere gibt es bislang keine Studien zu diesem Thema, weshalb die Fragestellung dieser Arbeit wie folgt lautet:

Welche funktionelle Rolle besitzt membranständig exprimiertes TNF in der Immunkomplex-
Glomerulonephritis?

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass der TNFR2 essentiell für die Vermittlung des renalen Gewebeschadens in der Immunkomplex-Glomerulonephritis ist und TNFR2-defiziente Mäuse keine Nephritis entwickeln [116]. Interessanterweise wird TNFR2 vorrangig durch membranständiges TNF und nicht durch lösliches TNF vollständig aktiviert, im Gegensatz zu TNFR1, der beide Varianten als Ligand bindet. Außerdem wiesen Experimente mit knochenmarkchimären Mäusen nach, dass sowohl TNF aus intrinsischen Nierenzellen, als auch der TNFR2 auf diesen Zellen für die Pathologie in diesem Modell verantwortlich ist [116, 121]. Im Gegensatz dazu spielte TNF, welches aus einwandernden Leukozyten stammte, nur eine geringe Rolle für den Krankheitsverlauf. Dies geht Hand in Hand mit der Tatsache, dass sich TNFR2 zwar zu einem geringeren Ausmaß auf gesunden intrinsischen Nierenzellen befindet, sich im Falle einer proinflammatorischen Stimulation aber stärker als TNFR1 induzieren lässt. Diese Daten legen nahe, dass bei der Glomerulonephritis membranständiges TNF vor allem im entzündeten Milieu seine Wirkung über Zell-Zell-Interaktion über TNFR2 entfaltet und auf diese Weise zur renalen Parenchymschädigung beiträgt.

Aus diesem Grund liegt dieser Arbeit die Hypothese zugrunde, dass im Verlauf einer Glomerulonephritis membranständiges TNF auf intrinsischen Nierenzellen über seine juxtakrine Wirkung auf den von intrinsischen Nierenzellen exprimierten TNFR2 glomerulären Schaden vermittelt und zu einer Verschlechterung des nephritischen Phänotyps führt. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden gentechnisch veränderte *Knock-in* Mäuse mit zwei nichtabspaltbaren TNF-Allelen verwendet, bei denen der Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis als Modell einer Immunkomplex-Glomerulonephritis untersucht wurde. Diese Mäuse exprimieren nur membranständiges TNF, jedoch kein lösliches TNF, weshalb eine Charakterisierung der spezifischen Funktion von membranständigem TNF in diesem Modell möglich ist.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Durchflusszytometer

FACSCalibur Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

ELISA

ELISA-Reader Tecan, GENios Plus Tecan, Crailsheim,

ELISA Micoplate Strip Washer ELx50 BioTek, Bad Friedrichshall

Mikroskope

Lichtmikroskop Leica DM RBE Leica Microsysteme, Wetzlar

Lichtmikroskop Leica DM IL Leica Microsysteme, Wetzlar

Leica DC 300F Leica Microsystems, Wetzlar

Lichtmikroskop Zeiss Axioplan 2 Carl-Zeiss AG, Oberkochen

Axiocam HR Carl-Zeiss AG, Oberkochen

Pipetten

Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml BD, Heidelberg

Pipetten Pipetman Gilson, Middleton, WI, USA

Multikanalpipette Eppendorf AG, Hamburg

Pipettierhilfe Pipetus-classic Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Pipettenspitzen 1 - 1000 µl TypGilson Peske, Aindling-Arnhofen

Pipettenspitzen epT.I.P.S Eppendorf AG, Hamburg

Real-time PCR

Nano drop PEQLAB Biotechnology, Erlangen

LightCycler 480 Real-Time PCR System Roche, Basel, CH

LightCycler 480 Multiwell-Platte 96 Roche, Basel, CH

Thermocycler

Mastercycler Vapo-Protect Eppendorf, Hamburg

Waagen

BP 110 S Sartorius, Göttingen

Mettler PJ 3000 Mettler-Toledo, Greifensee, CH

Zentrifugen

Zentrifuge 5415 C Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge 5418 C Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Zentrifuge Heraeus, Minifuge T	Heraeus Sepatech, Osterode
Sonstiges	
Autoklav 23	Melag Medizintechnik, Berlin
miniVE Vertical Electrophoresis System	Amersham, GE, Freiburg
Immobilon PVDF Transfermembran	Millipore, Schwalbach
Magnet Cell Separation Magnet	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotom HM340E	Microm, Heidelberg
Mikrotom RM2125	Leica Microsystems, Bensheim
Perfusionsgerät	Eigenkonstruktion
pH-Meter WTW	WTW, Weilheim
Sicherheitswerkbank Microflow	Nunc GmbH, Wiesbaden
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultracut	Leica Microsysteme, Wetzlar
UV-Licht	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad HI 1210	Leica Microsystems, Bensheim

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Type B5060 EC-CO2	Heraeus Sepatech, München
Steril Card Hood Class II Typ A/B3	Baker Company, Sanford, ME, USA
12-Well-Platten (Zellkulturschalen)	Nunc, Wiesbaden
6-Well-Platten (Zellkulturschalen)	Nunc, Wiesbaden
24-Well-Platten (Zellkulturschalen)	Nunc, Wiesbaden
Primaria 100mm Standard Cell Culture Dish	Corning B.V., Amsterdam, NL
Zellkulturschale 96 x 21 mm	TPP, Trasadingen, CH
Zellschaber 24 cm	TPP, Trasadingen, CH
Kryovials	A Laboratories, Eastleigh, UK
CoolCell Einfrierboxen	Biocision, Larkspur, USA
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Dynabeads M-450 Epoxy	Invitrogen, Karlsruhe
Gewebekassetten Histosette-II	NeoLab, Heidelberg
Kanülen 19 G, 26 G und 30 G	Becton Dickinson, Heidelberg
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Petrischalen Ø 60 und 96 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz

Skalpelle No. 11 und 20	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Spritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Super Frost Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml, 2 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen 12 ml mit rundem Boden	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb 70 µm und 100 µm	Becton Dickinson, Heidelberg
Albumstix Teststreifen	Bayer, Leverkusen

2.1.3. Chemikalien, Puffer und Lösungen

Allgemeine Chemikalien

30%-H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Aceton	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Probetex Sheep Anti-Rat	Probetex, San Antonio, USA
Glomeruli GBM Serum #PTX 001-S	
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roche, Mannheim
Diaminobenzidin	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formalin	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma, Deisenhofen
Methylgrün	Sigma, Deisenhofen
NaCl	B. Braun, Melsungen
Ni ₂ Cl	Sigma, Deisenhofen
Xylol	Merck, Darmstadt

Chemikalien und Puffer für die Genotypisierung

10x PCR-Puffer	Minerva BioLabs, Berlin
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe

dNTP	GE Healthcare, München
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Hexanukleotide	Roche, Mannheim
KCl	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NP40	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Proteinase K	Merck, Darmstadt
PCR Direkt	Peqlab, Erlangen
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
TRIS	Roth, Karlsruhe
TRIS-HCl	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe

6x Glycerinaldehydpuffer:

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

10x TBE-Puffer:

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

Chemikalien für die RNA-Isolierung und die Umschreibung in cDNA und RT-PCR

Ethanol	Merck, Darmstadt
PureLink RNA Mini Kit	Ambion, Darmstadt
RNasin (40 U/μl)	Promega, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
RNase free Spray	Gene Choice, Frederick, USA
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
Linear Acrylamid	Ambion, Darmstadt
DTT (0,1M)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs (25nM)	GE Healthcare, München
Hexanukleotide	Roche, Mannheim
5x First strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
MgCl ₂ (25mM)	Fermentas, St. Leon-Rot

10x Taq Puffer ohne Detergenz	Fermentas, St. Leon-Rot
SYBR Green Dye Detection	Applied Biosystems, Norwalk, USA
BioStab PCR Optimizer	Bitop, Witten
Taq DNA Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
RNA loading buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Mastermix für real-time PCR (10ml):

Tag Puffer 10x without detergent (2ml), dNTP 25mM (150µl), BioStab PCR optimizer (4ml), Bovines Serumalbumin, 20mg/ml (200µl), SYBR Green I (40µl), MgCl₂ 25mM (2,4ml), H₂O (1210µl)

Chemikalien für die Zellkultur und Glomerulusisolation

EBM Basal Medium 500ml	Lonza Group Ltd, Basel, Ch
EGM-MV BulletKit	Lonza Group Ltd, Basel, Ch
DMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Fetales bovines Serum (FBS)	Summit Biotechnology, Fort Collins, USA
HEPES, 1M buffer solution	Invitrogen, Karlsruhe
HyClone Fetal Bovine Serum	Thermo Scientific, Rockford, USA
Collagenase A	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin (PS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Irvine Scientific, Santa Ana, USA
Natriumbikarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsine/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RM Interleukin 1β	Immunotools, Friesoythe
LPS, Standard, E. coli K12	InvivoGen, Toulouse, France
Advanced Glycation Endproduct-(AGE)	Calbiochem (Merck), Darmstadt, D
Insulin aus Rinderpankreas	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glukose 5%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Chemikalien für die Immunhistologie

Antigen unmasking Solution	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
----------------------------	--

Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Torrance, CA, USA
Avidin/Biotin Blocking Kit V	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
VectaMount	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Vectastain Elite ABC	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Chemikalien für die Durchflusszytometrie

PBS (Phosphate Buffered Saline)	Pan Biotech, Aidenbach
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
DNase Typ IV	Sigma, Deisenhofen
Kollagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen
Normal Mouse Serum	Jackson, West Grove, PA, USA
Normal Rat Serum	Jackson, West Grove, PA, USA

10x HBSS (Hank's Balanced Salt Solution):

4 g KCl, 0,6 g KH_2PO_4 , 80 g NaCl, 0,621 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,5 g NaHCO_3 , 1,4 g CaCl_2 , 1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g D-Glukose, auf 1000 ml H_2O aufgefüllt

10x HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} :

4 g KCl, 0,6 g KH_2PO_4 , 80 g NaCl, 0,621g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ auf 1000 ml H_2O aufgefüllt

Paris Puffer:

20 mM Tris-HCl, 125 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM Na-Azetat, 5 mM D-Glukose
auf 1000 ml mit H_2O aufgefüllt

Kollagenase / DNase:

10 mg Kollagenase Typ I, 1 mg DNase Typ IV in 10 ml HBSS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})

2 mM EDTA / HBSS-Lösung:

100 μl 0,2 EDTA-Stammlösung in 10 ml HBSS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})

FACS-Puffer:

500 ml 1x PBS, 0,2 % BSA, 0,1 % Na-Azid

Chemikalien für den Western-Blot

Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	BioRad, München
Tween 20	Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
30 % Acrylamide (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Bio-Rad Protein Assay	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ECL Prime	Amersham, GE, Freiburg
TEMED	BioRad, München

Tris Buffered Saline (TBS):

50 mM Tris, 150 mM NaCl mit H₂O auf 1000 ml (pH 7,6) auffüllen

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

0,1% Tween-20 in TBS

Laufpuffer:

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

Transferpuffer:

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

Trennpuffer:

18,2 g Tris (1,5mM), 0,4 g SDS, mit H₂O auf 100 ml (pH 8,8) auffüllen

Sammelpuffer:

6,05 g Tris (0,5 mM), 0,4 g SDS, mit H₂O auf 100 ml (pH 6,8) auffüllen

10 x Ladepuffer (nach Lämmli) für 10 ml:

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

1,5 ml H₂O

Die Chemikalien zur Herstellung der Puffer wurden, falls nicht anderweitig beschrieben, von Merck bezogen.

2.1.4. Oligonukleotid-Primer für die *real-time* PCR

Tabelle 3: Verwendete Real-time PCR Primer zur Expressionsanalyse.

Gen	Forward-Primer	Reverse-Primer
Murines TNF- α	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'	5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'
Murines IL-1 β	5'-TTCCTTGTCGAAGTGTCTGAAG-3'	5'-CACTGTCAAAGGTGGCATT-3'
Murines IL-6	5'-TGATGCACTTGCAAGAAACA-3'	5'-ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC-3'
Murines IL-10	5'-ATCGATTTCTCCCTGTGAA-3'	5'-TGCAAATTCATTCATGGCCT-3'
Murines CCL2 (MCP-1)	5'-CCTGCTGTTACAGTTGCC-3'	5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3'
Murines CCL5	5'-CCACTTCTTCTGGGTTGG-3'	5'-GTGCCACGTCAAGGAGTAT-3'
Murines CXCL-5	5'-CAGAAGGAGGTCTGTCTGGA-3'	5'-TGTATTCCGCTTAGCTTTCT-3'
Murines CXCL-10	5'-GGCTGGTCACCTTTCAGAAG-3'	5'-ATGGATGGACAGCAGAGAGC-3'
Murines TNFR1	5'-GCAACAGCACCGCAGGAGCTGA-3'	5'-GTGCGTCCCTTGACGCCACT-3'
Murines TNFR2	5'-CAAGACAACCTGGGTGGGCA-3'	5'-CTGGGTGCGCTGGTCTTGC-3'
Murines L-FABP	5'-AGGAGTGCACCTGGAGACCAT-3'	5'-GCTCCATTGAGTTCAGTCACGG-3'
Murines α -GST	5'-CAATGGCCGGGAAGCCGTG-3'	5'-CTTCAAACCTCCACCCTGCTGC-3'
Murines Selektin E	5'-CCATGTGCCTTCTTACAACG-3'	5'-TTAAGCAGGCAAGAGGAACC-3'
Murines VCAM-1	5'-GCTATGAGGATGGAAGACTCTGG-3'	5'-ACTTGTGCAGCCACCTGAGATC-3'
Murines IFN- γ	5'-ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT-3'	5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3'
Murines IFN- β	5'-CTCAGGGTGTGATGAGGTC-3'	5'-CCCAGTGCTGGAGAAATTGT-3'
Murines Nephren	5'-ACCCTCCATTAACCTGTCCTTGG-3'	5'-ATGCAGCGGAGCCCTTGA-3'
Murines cIAP1	5'-TGATGGTGGCTTCAGATG-3'	5'-CCCTCCATCCGTATCAAG-3'
Murines XIAP	5'-CATCCGGGAGCAGCTATCTA-3'	5'-TCTTGTAGGCGCCTTAGCTG-3'
Murines I κ B- α	5'-CAGCAGCTCACGGAGGAC-3'	5'-GTCTCCCTTACCTGACCAA-3'
Murines A20	5'-CAGAAGGAGGTCTGTCTGGA-3'	5'-TGCATTCCGCTTAGCTTTCT-3'
18s	5'-GCAATTATCCCATGAACG-3'	5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'

2.1.5. Antikörper

Fluorochrom-konjugierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Hamster anti-Maus CD3e-Alexa Fluor® 488, Klon 145-2C11	BD, Heidelberg
Hamster anti-Maus CD11c-FITC, Klon HL3	BD, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD4-Alexa Fluor® 647, Klon RM4-5	BD, Heidelberg

Ratte anti-Maus CD45-PE, Klon 30-F11	BD, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD8a-PerCP-Cy® 5.5, Klon 53-6.7	BD, Heidelberg
Ratte anti-Maus Ly6-G-FITC, Klon 1A8	BD, Heidelberg
Ratte anti-Maus F4/80-APC, Klon Cl:A3-1	AbD Serotec, Düsseldorf
Isotyp APC Ratte IgG2b	BD, Heidelberg
Isotyp FITC Hamster IgG1	BD, Heidelberg
Isotyp FITC Ratte IgM	BD, Heidelberg

Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Biotinylierter Kaninchen anti-Ratte IgG, polyklonales Serum	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Biotinylierter Ratte anti-Ziege IgG, polyklonales Serum	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Biotinylierter Ziege anti-Kaninchen IgG, polyklonales Serum	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus F4/80, Klon Cl:A3-1	AbD Serotec, Oxford, UK
Ratte anti-Maus Ly-6B.2, Klon 7/4	AbD Serotec, Oxford, UK
Ratte anti-Mensch CD3, Klon CD3-12	AbD Serotec, Oxford, UK
Ziege anti-C3d, polyklonales Serum	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Ratte anti-Maus Mac2, Klon M3/38	Cederlane, Ontario, Kanada
Hamster anti-Nephrin, polyklonales Serum	Acris Antibodies, Herford
Kaninchen anti-WT1, polyklonales Serum	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Anti-PCNA Maus mAb, Klon PC-10	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
In Situ Cell Death Detection Kit (TUNEL)	Roche, Mannheim
Ratte anti-Maus CD31, Klon RM0032-1D12	Abcam, Cambridge, UK
Ziege anti-Ratte Alexa Fluor® 555	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ziege anti-Hamster Alexa Fluor® 488	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ziege anti-Kaninchen Cy®3	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Streptavidin, Alexa Fluor® 555 konjugiert	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Western Blot

Kaninchen anti-Phospho-IkB- α , Klon 14/D4	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Kaninchen anti-NF- κ B2 p100/p52, Klon 18/D10	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Kaninchen anti-cleaved Caspase 3 (Asp175), polyklonales Serum	
	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Maus anti-RIP1, Klon 7/H10	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-RIP3, polyklonales Serum	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti- β -Actin, polyklonales Serum	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Anti-Kaninchen IgG, HRP, polyklonales Serum	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Anti-Maus IgG, HRP, polyklonales Serum	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK

2.1.6. Software

LightCycler 480 Software, Version 1.2.9.11	Roche, Mannheim
CellQuest	Becton Dickinson, Heidelberg
Endnote X7	Thomson Reuters, New York, NY, USA
InStat 3.05	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Office 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
QWin	Leica Microsystems, Bensheim
Image J	Open Source
Windows XP Professional und 7	Microsoft, Redmond, WA, USA

2.2. Tierexperimentelle Methoden

2.2.1. Versuchstiere

C57BL/6J Wildtyp	Jackson Laboratory, bezogen über Charles River Laboratories, Sulzfeld
mTNF ^{Δ1-9,K11E} (C57BL/6J Hintergrund)	Professor Dr. Bernhard Ryffel, Dagger Laboratory of Molecular Immunology and Embryology, University of Orléans, France

Die in den Versuchen verwendeten Wildtyp-Kontrolltiere waren entweder in eigener Züchtung aus Wildtyp-Tieren von Jackson Laboratory hervorgegangen oder aus mTNF-Mäusen rückgekreuzte Wildtyp-Mäuse. Die mTNF-Mäuse wurden uns mit freundlicher Unterstützung von Professor Dr. Bernhard Ryffel zur Verfügung gestellt. Bei diesen transgenen Tieren wurde gezielt durch *knock-in* des TNF^{Δ1-9,K11E}-Allels die physiologische Regulation der TNF-Sekretion beeinflusst. Das TNF^{Δ1-9,K11E}-Allel kodiert für ein TNF-Molekül, das zwar als biologisch aktives membranständiges TNF an die Zellmembran gelangt, dort aber nicht proteolytisch durch das *TNF-alpha converting enzyme* (TACE oder ADAM17) zu löslichem TNF abgespalten werden kann, da durch die Δ1-9-Deletion die Bindungsstelle für TACE fehlt. Auf diese Weise exprimieren mTNF-Mäuse nur membranständiges TNF, das in der Lage ist, durch juxtakrine Zell-Zell-Interaktion Nachbarzellen zu stimulieren, aber kein lösliches TNF, welches seine Wirkung durch parakrine Signalübertragung entfalten würde. Die mTNF-Mäuse wurden direkt im C57BL/6J-Hintergrund generiert und zeigen eine mit Wildtyp-Tieren vergleichbare basale membranständige TNF-Expression, sowie eine vergleichbare basale Zytokin- Chemokinproduktion, sind phänotypisch unauffällig und haben eine normale Lebenserwartung [122].

2.2.2. Tierhaltung

Die Zucht der Versuchstiere erfolgte in der zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) des Klinikums der Universität München, Standort Innenstadt, in der Nussbaumstraße 20 und in der Tierhaltung der Medizinischen Klinik IV in der Schillerstraße 42. Diese Einrichtungen

ermöglichten die Haltung und Züchtung der Mauslinien unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF), wobei regelmäßig mikrobiologische Kontrolluntersuchungen zur Einhaltung dieser Vorgaben durchgeführt wurden. Zur artgerechten Haltung der Tiere dienten autoklavierte Macrolone Typ II L Käfige mit Filterdeckel, maximal fünf Tiere in einem Käfig. Es herrschten konstante Bedingungen unter einem Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden und uneingeschränktem Zugang zu autoklaviertem Trinkwasser, Trockenpelletsfutter (ssniff®) und Nestbaumaterial, sowie einer Raumtemperatur von 22-23°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Die Jungtiere wurden nach 21 Tagen nach Geschlecht abgesetzt und durch eine Lochmarkierung an den Ohren gekennzeichnet. Alle aufgeführten tierexperimentellen Methoden wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Alle Tierversuche waren durch die Regierung von Oberbayern im Vorfeld genehmigt worden.

2.2.3. Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps wurde bei jedem Versuchstier eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, mit dem Ziel, die Gensequenz des membranständigen TNFs im Genom nachzuweisen. Als Material für die PCR diente genomische DNA aus Schwanzspitzen der Tiere. Die geschnittenen Schwanzspitzen (1-2 mm Länge) wurden in 200 µl 1x PCR-Direct® mit 1,5 µl Proteinase K (Konzentration 20 mg/ml) bei 56 °C im Thermomixer für 4 Stunden unter ständigem Rütteln (750 U/min) verdaut. Um die Proteinase K zu inaktivieren wurden die Proben auf 85°C für 45 Minuten erhitzt und anschließend für 5 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene genomische DNA (1 µl) wurde zu 25 µl eines PCR-Mix gegeben.

PCR-Mix:

15 µl H₂O, 2,5 µl 10x-Puffer, 4 µl dNTP (Konzentration 300 µM), 0,5 µl Taq-Polymerase (5.000 U/ml), 2 µl mTNF^{Δ1-9,K11E} Primer (je 1 µl, 10pM)

Tabelle 4: Primer zum Nachweis der TNF^{Δ1-9,K11E}-Gensequenz

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
Murines mTNF	5'-GCGTCCAGCTGACTAAACATCCTTC-3'	5'-ACCACTAGTTGGTTGCTTTGAGAT-3'

Anschließend erfolgte die Amplifikation im Mastercycler ® mit dem in Tabelle 5 angegebenen Protokoll.

Tabelle 5: PCR-Protokoll zur Genotypisierung der mTNF-transgenen Mäuse

	Dauer	Temperatur (°C)	
Vorabdenaturierung	5min	94	
Denaturierung	1min	94	35x Wiederholung
Annealing	1min	60	
Elongation	2min	72	
Polymerisation	5min	72	
	ENDE	4	

Um im nächsten Schritt die amplifizierte DNA ihrer Länge und Ladungseigenschaften nach aufzutrennen wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurde das Elektrophoresegel durch Lösen und Erhitzen von 1,5 % Agarose in 1x-TBE-Puffer hergestellt. Anschließend wurden 7 µl Ethidiumbromid (Konzentration 10 mg/ml) zugegeben und das Gel in eine Form gegossen. Bevor das Gel aushärten konnte wurde ein Kamm eingedrückt, um Taschen für das Beladen des Gels mit den Proben zu schaffen. Anschließend wurden die Proben (25 µl) mit der bereits amplifizierte DNA mit jeweils 5 µl des 6x-Glycerinladepuffers verdünnt. Von diesem Mix aus Probe und Ladepuffer wurden 5 µl in die Probestaschen des Gels pipettiert. Um die Größe der amplifizierten DNA-Abschnitte verifizieren zu können wurde eine 1 kb-DNA Leiter als Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne Taq-Polymerase, um eine mögliche Kontamination der Reagenzien auszuschließen.

Während der Elektrophorese liefen die DNA-Abschnitte bei einer Spannung von 150 Volt und einer Stromstärke von 400 mA für 45 Minuten durch das Gel. Abschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert (Abbildung 11). Das amplifizierte PCR-Produkt hat bei Vorliegen des TNF-Wildtypallels eine Größe von 1000 bp, bei Vorliegen des mutierten mTNF^{Δ1-9,K11E}-Allels eine Größe von 1100 bp. Das um 100 bp größere PCR-Produkt im deletierten mTNF^{Δ1-9,K11E}-Allel resultiert aus der Insertion einer langen Intron-Sequenz im ausgetauschten Genabschnitt [122].

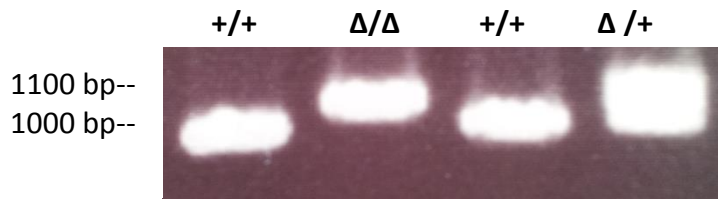


Abbildung 11: Genotypisierung der mTNF^{Δ1-9,K11E}-Mäuse

2.2.4. Induktion der heterologen nephrotoxischen Serumnephritis (NTN)

Das Modell beruht auf der Induktion einer angeborenen, nicht adaptiven Immunantwort in Reaktion auf die Ablagerung von heterologen Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran und dadurch stattfindende Bildung von Immunkomplexen in den Glomeruli der Versuchstiere. Diese Anti-Basalmembran-Antikörper befinden sich im Serum von Schafen (nephrotoxisches Serum), die zuvor mit Strukturen der glomerulären Basalmembran aus Ratten immunisiert wurden. Um eine heterologe Immunantwort, ohne die Bildung von autologen Antikörpern zu induzieren, wird eine nephritische Dosis des nephrotoxischen Schaf Anti-GBM-Serums (100 μ l *Sheep anti-Rat glomeruli serum* von Probetex INC, PTX-001) intravenös in die Schwanzvene von männlichen Wildtyp- und mTNF-Mäusen im Alter von 8-10 Wochen injiziert. Nach Bindung der Antikörper an die glomeruläre Basalmembran wird das Komplementsystem aktiviert und innerhalb von wenigen Tagen eine akute Glomerulonephritis ausgelöst, die mit einer renalen Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen einhergeht [26, 123].

Nach der Induktion der Nephritis wurde der gesundheitliche Status der Mäuse täglich kontrolliert und an Tag 0, 2, 5 und 7 Urin abgenommen, welcher mit Albuminstix Schnellteststreifen untersucht wurde und später zur genauen Bestimmung der Albuminurie mittels ELISA-Verfahren diente. Am fünften Tag post injektionem, dem Zeitpunkt der größten gemessenen Albuminurie, wurde der Versuch mit der Entnahme der Nieren zur Gewinnung von Material für die Durchflusszytometrie und RNA-Analyse, sowie Gewebeschnitte für die histologische Aufarbeitung und Serumproben für die Nierenfunktionsdiagnostik beendet. Dabei wurden die Tiere wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben mit einer intraperitonealen Injektionsnarkose anästhesiert und die Narkosetiefe mithilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft. Nach dieser Testung wurde mit einer Glaskapillare der

retroorbitale Venenplexus punktiert und die Blutropfen in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Nach abgeschlossener Gerinnung wurden die Proben bei 15.000 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand als Serumproben abpipettiert. Anschließend erfolgte die Harnstoffbestimmung aus 200 µl Serumprobe durch das Labor der SynLab.vet GmbH & Co. KG in Augsburg.

Zur Aufbereitung des Nierengewebes wurden die tief narkotisierten Versuchstiere desinfiziert, ein Hautschnitt durchgeführt, thorakotomiert und das Herz freipräpariert. Um Blutzellen aus dem Nierengewebe zu entfernen wurden die Nieren über den linken Herzventrikel mit 40 ml auf 37°C vorgewärmter PBS-Lösung perfundiert. Durch eine Perfusionsapparatur, wie von Vielhauer in [124] beschrieben, konnte nach vorheriger Durchtrennung der Vena cava inferior der linke Herzventrikel punktiert und anschließend die PBS-Lösung mithilfe eines an die Apparatur angebrachten Manometers unter konstantem Druck von 60-80 mmHg perfundiert werden (siehe Abbildung 12). Die Nieren wurden anschließend aus dem Gewebe frei präpariert, die Kapsel entfernt und das Gewebe auf eisgekühlten Petrischalen für die jeweilige Analysemethode, wie in Abbildung 13 beschrieben, vorbereitet oder archiviert.

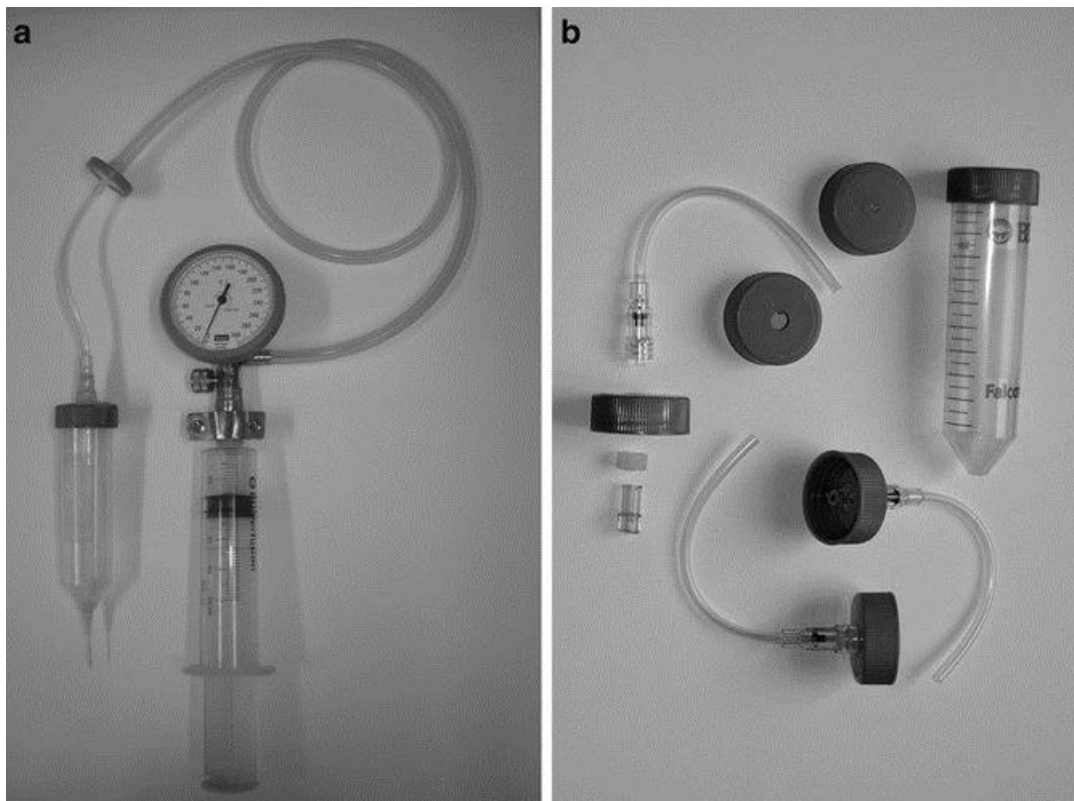


Abbildung 12: Aufbau der druckkontrollierten Perfusionsapparatur [124].

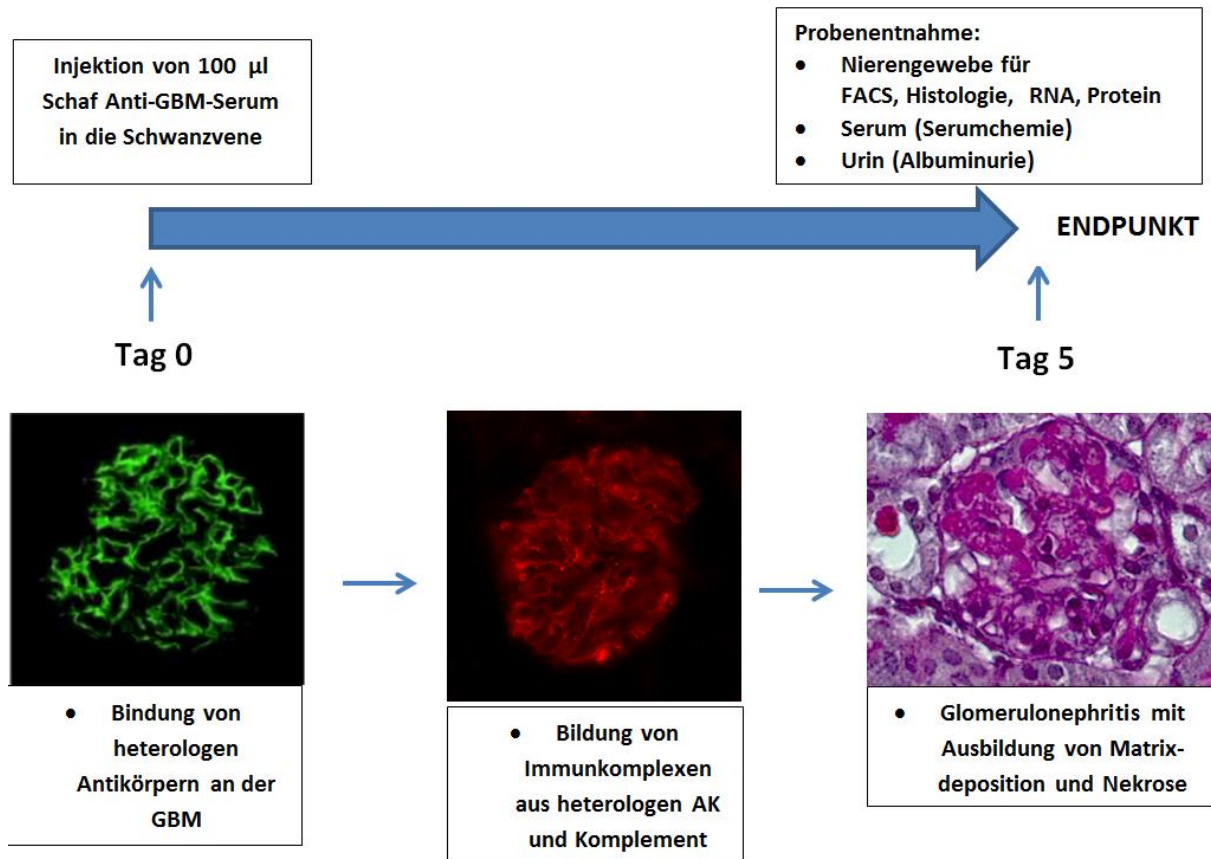


Abbildung 13: Ablauf der heterologen NTN mit Probenentnahme an Tag 5.

2.2.5. Injektionsnarkose bei Mäusen

Die Injektionsnarkose wurde durch die intraperitoneale Injektion einer Mischung aus folgenden Hypnotika und Analgetika induziert:

Injektionsnarkose

2 ml Fentanyl (Fentanyl, 0,05 mg/ml)

2 ml Dormicum (Midazolam, 5mg/ml)

1 ml Medetomidin (Dormitor, 1mg/ml)

Dosierung des Narkosemix

Fentanyl 0,05 mg/kg KG

Dormicum 5 mg/kg KG

Medetomidin 0,5 mg/kg KG

Tabelle 6: Dosierungstabelle der Injektionsnarkose

Gewicht in Gramm	Injektion Narkosemix ip (µl)
20	130
21	137
22	143
23	150
24	156
25	163
26	169
27	176
28	182
29	189
30	195

Alle Narkosemedikamente wurden über den Tierschutzbeauftragten bezogen. Die Narkose wurde durch eine intraperitoneale Injektion des errechneten Volumens durchgeführt. Das Erreichen der vollständigen Narkosetiefe wurde durch einen negativen Zwischenzehenreflex bestätigt.

2.3. Paramagnetische Isolation und Zellkulturstimulation von glomerulärem und tubulointerstitiellem Gewebe

2.3.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Die kompartimentspezifischen Gewebeisolation der Niere mittels magnetischer Beads wurde als erstes im Jahre 2002 von Takemoto et al. beschrieben [125]. Diese Methode ermöglicht es, durch ein paramagnetisches Verfahren das Nierengewebe in Glomeruli und Tubulointerstitium aufzutrennen. Dem Isolationsverfahren liegt dabei der anatomische Aufbau der Blutversorgung der Nieren zu Grunde, welcher mit den Glomeruluskapillaren und dem später folgenden peritubulären Kapillarnetz in Rinde und Mark über zwei hintereinander geschaltete Kapillarnetze verfügt. Durch die von Takemoto beschriebene Methode gelingt es, die Nieren über die Nierenarterien mit ferromagnetischen Mikropartikeln (Beads) zu perfundieren [113]. Diese Beads sind in ihrer Größe so gewählt,

dass sie in den Kapillaren des Glomerulus stecken bleiben und sich dort präferenziell anreichern. Nach erfolgter Perfusion und Entnahme der Nieren erfolgt ein Kollagenaseverdau des Nierengewebes, der das Niereninterstitium in kleine Gewebefragmente und Einzelzellen separiert und magnetische Beads, die in tubulointerstitiellen Kapillaren stecken geblieben sind, freisetzt. Das glomeruläre Gefäßkonvolut (nicht aber die umgebende Bowmansche Kapsel) ist dagegen gegenüber dem Kollagenaseverdau resistent. Nachdem das umliegende tubulointerstitielle Nierengewebe durch Kollagenase verdaut wurde, können nun die intakten Glomeruli mit den steckengebliebenen magnetischen Beads in Richtung eines starken Magneten gezogen werden. Nach dem ersten Waschschrift konnten die Glomeruli vom tubulointerstitiellem Gewebe getrennt werden. Mithilfe weiterer Waschschriftre konnten die Glomeruli auf einen Reinheitsgrad von 95% gebracht werden. Das Prinzip der Methode ist in Abbildung 14 zusammengefasst.

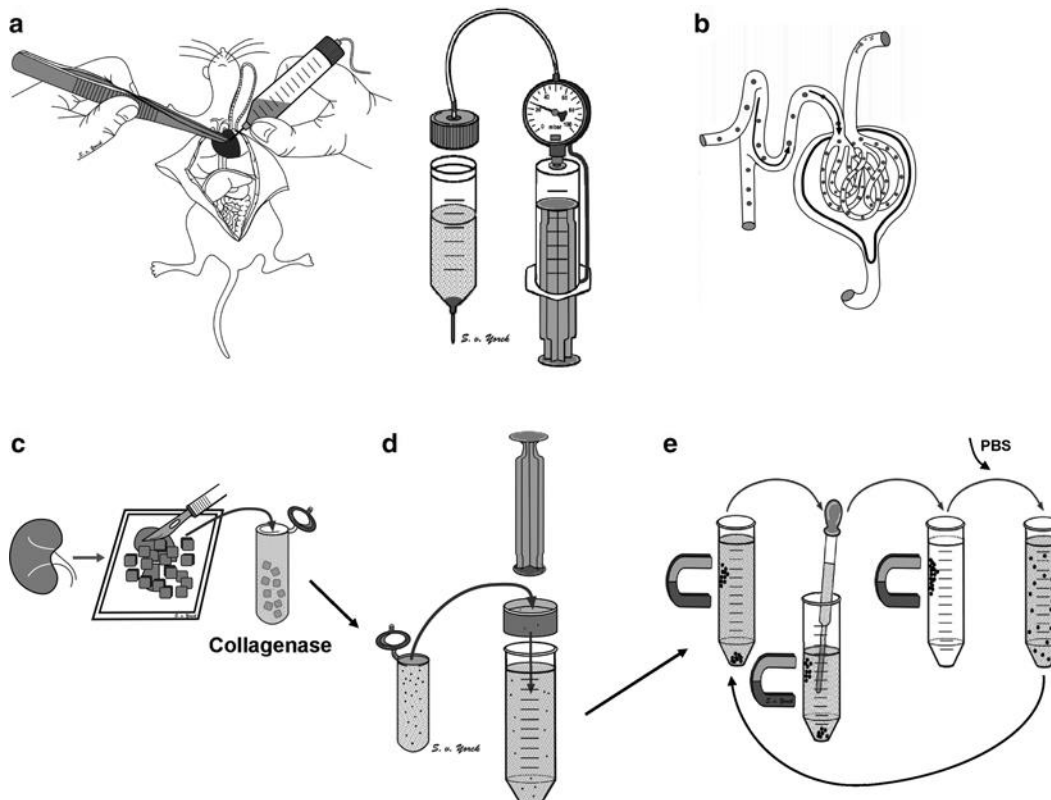


Abbildung 14: Paramagnetische Isolation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums nach Vielhauer [124]. (a) Perfusion von Beads in den linken Ventrikel mithilfe einer druckkontrollierten Perfusionsapparatur. (b) Feststeckende Beads in glomerulären Kapillaren. (c) Herausnehmen der Nieren, Zerkleinerung in 1 mm³ große Stücke und Kollagenaseverdau. (d) Filtration des verdauten Gewebes durch einen 100 µm Zellfilter. (e) Aufteilung der Glomeruli mithilfe eines magnetischen Teilchenverdichters und anschließendes Waschen.

Für die Gewebeisolation wurden Wildtyp- und mTNF-Mäuse wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben narkotisiert und nacheinander in tiefer Narkose für die Perfusion mittels Desinfektion, Hautschnitt, Thorakotomie und Freipräparierung des Herzens vorbereitet. Die für die Perfusion benötigten Beads (M-450 Epoxy Dynabeads, Durchmesser 4,5 μm , Invitrogen, Karlsruhe) wurden den Herstellerangaben entsprechend geblockt und dann jeweils 200 μl der Lösung (8×10^7 Beads) mit 40 ml auf 37°C vorgewärmtem PBS vermischt. Dieses Gemisch wurde in die Perfusionsapparatur gefüllt. Mit dieser Apparatur war es mithilfe eines angeschlossenen Manometers möglich die in PBS gelösten Beads unter konstantem Druck in den linken Herzventrikel zu perfundieren. Dazu wurde zuerst die Vena cava inferior herznah durchtrennt, um dem infundierten PBS eine Abflussmöglichkeit zu geben. Dann wurde das Herz beweglich präpariert, mit einer Pinzette fixiert und mit der an der Spitze der Perfusionsapparatur befindlichen Kanüle in den linken Ventrikel gestochen. Die Perfusion wurde dann mit 20 mmHg Druck begonnen und langsam auf 60 mmHg gesteigert. Nachdem die gesamte Lösung von 40 ml perfundiert war, zeigten sich die Nieren sowie auch die Leber gelblich bräunlich entfärbt. Die Nieren wurden freipräpariert und die Kapsel entfernt. Nach grober Zerkleinerung durch ein Skalpell in 1 mm^3 große Stücke, wurde das Gewebe für 30 Minuten bei 37°C im Thermomixer mit 2 ml Kollagenase A (1 mg/ml gelöst in HBSS) in 2 ml Eppendorfgefäßen verdaut. Anschließend wurde das Gewebe mit dem Spritzenpistill einer 5 ml Spritze durch ein 100 μm Sieb gedrückt, welches dann mit 7 ml eisgekühltem PBS ausgewaschen wurde. Die gesiebte Zellsuspension wurde nun in 15 ml Zentrifugenröhrchen mit rundem Boden überführt und für 7 Minuten in eine Magnethalterung (Cell Separation Magnet, BD IMagTM, BD Biosciences, Heidelberg) gestellt. In dieser Halterung kam die Suspension unter den Einfluss des Magnetfeldes eines Stabmagneten, wobei die mit ferromagnetischen Beads gefüllten Glomeruli sich an der dem Magneten zugerichteten Wand des 15 ml Zentrifugenröhrchens absetzten. Nun konnte mit einer Pasteurpipette der Überstand mit nichtglomerulären Nierengewebe vorsichtig, ohne die mit Glomeruli belegte Seite zu berühren, in ein weiteres Zentrifugenröhrchen abpipettiert werden. Dieser erste Überstand entspricht der tubulointerstitiellen Fraktion (siehe Abbildung 15 A), welche nun durch ein 70 μm Sieb pipettiert und bei 4°C für 3 Minuten und 200 g zentrifugiert wurde. Nachdem der Überstand verworfen war, wurde das Tubulointerstitium mit dem entsprechendem Puffer resuspendiert. Das Sediment aus dem ersten 15 ml Zentrifugenröhrchen entspricht der glomerulären Fraktion. Diese wurde nach Entfernung

aus der Magnethalterung mit 10 ml 4°C kaltem PBS vom Rand des Zentrifugenröhrchens gelöst, gemischt und nochmals für 7 Minuten in die Magnethalterung gebracht. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Sediment wieder mit 4 ml 4°C PBS gelöst und die Lösung mit einem 100 µm Sieb ohne Einsatz des Pistills gesiebt und mit 6 ml PBS aufgefüllt. Es folgten drei weitere Waschschrirte in der Magnethalterung. Letztendlich erfolgte die Reinheitskontrolle der glomerulären Fraktion unter dem Mikroskop (siehe Abbildung 15 B).

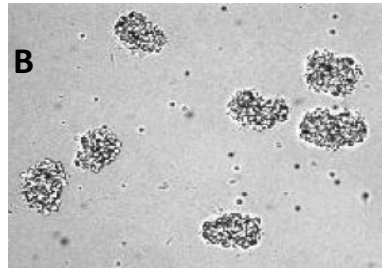
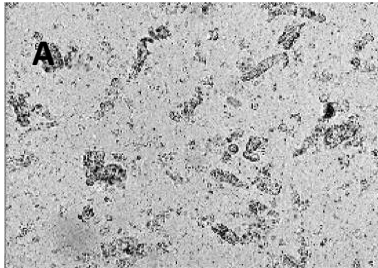


Abbildung 15: Mikroskopische Ansicht nach Perfusion mit magnetischen Beads [124].
(A) tubulointerstitielle Fraktion.
(B) glomeruläre Fraktion.

2.3.2. Zellkulturstimulation von isolierten Glomeruli und Tubulointerstitium

Direkt im Anschluss an die paramagnetische Gewebeauftrennung von Glomeruli und Tubulointerstitium aus Wildtyp- und mTNF- Mäusen wurden beide Fraktionen in RPMI 1640-Zellkulturmedium resuspendiert. Zusätzlich enthielt das Medium 15% FCS, 15 mM HEPES-Puffer (Invitrogen), 0,66 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin, 100 µl Streptomycin. Die Menge des Puffers richtete sich in der Glomerulusfraktion nach der enthaltenen Glomeruluszahl, die in Aliquots unter dem Mikroskop gezählt wurde. Dabei wurde eine Konzentration von 2.500 Glomeruli pro Milliliter Medium angestrebt, bei einer Gesamtmenge zwischen 10.000 und 15.000 Glomeruli pro Versuchstier. Für die Stimulation wurden 5.000 Glomeruli in jeweils einem Well einer 6-Well-Platte ausplatiert und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Nach 24 Stunden wurde auf FCS-freies Medium gewechselt und zur Stimulation 10 ng/ml Interleukin 1β (IL-1β) oder als Negativkontrolle PBS darin gelöst. Nach 24 Stunden Stimulationszeit wurden der Inhalt der Wells in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C für ELISA-Messungen und das Pellet in RLT-Puffer bei -20°C für eine spätere RNA-Isolation eingefroren. Für das isolierte Tubulointerstitium erfolgten die Schritte äquivalent zum oben beschriebenen Vorgehen, wobei die gleiche Menge Medium wie bei den Glomeruli verwendet wurde. Die ELISA-Ergebnisse der Stimulationsexperimente im Tubulointerstitium wurden nach Messung

des Proteingehalts der eingesetzten Zellsuspension mittels Bradfordmethode auf den Proteingehalt normiert.

2.4. Immunologische Methoden

2.4.1. Durchflusszytometrie

Allgemeine Funktionsweise

Die Durchflusszytometrie ist ein maschinengestütztes Messverfahren, mit dem Zellen einer Zellsuspension nach bestimmten Charakteristika analysiert und unterschieden werden können und im Gegensatz zum FACS (*fluorescence-activated-cell-sorting*) nicht zusätzlich sortiert werden. Dabei lässt sich eine große Anzahl von Zellen auf ihre Größe, Granularität und ihr Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen hin untersuchen und quantifizieren. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Zellen, die als Einzelzellsuspension durch eine Kapillare gezogen werden, Licht und verschiedene Laserstrahlen passieren. Dabei trifft jede Zelle einzeln auf den Strahlengang, beugt und bricht je nach Struktureigenschaften das aufgenommene Licht und sendet dieses veränderte Lichtsignal zu Detektoren zurück. Anhand dieses Streulichts können zwei unterschiedliche Streuungsarten unterschieden werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter) entsteht durch die Beugung des Lichtes ausgehend von einem flachen Winkel und verändert sich mit dem Volumen der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, Sideward Scatter) entsteht durch Brechung des Lichtes quer zum einfallenden Laserstrahl und gibt Aufschluss über die Granularität der Zelle, sowie Aufbau und Größe des Zellkerns.

Eine weitere Möglichkeit mit Hilfe der Durchflusszytometrie, Zellpopulationen zu charakterisieren besteht in der Markierung von Oberflächenmolekülen oder auch der Detektion von intrazellulären Zellbestandteilen. Die dazu verwendeten Antikörper binden entweder direkt an oberflächliche Strukturen oder gelangen nach Permeabilisierung in die zu charakterisierende Zelle. Die Antikörper sind direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen (so genannten Fluorochromen) gekoppelt oder werden von farbstoffmarkierten Sekundärantikörpern gebunden. Diese Fluoreszenzfarbstoffe emittieren ein Lichtsignal charakteristischer Wellenlänge, wenn sie von Lasern angeregt wurden. Mit Hilfe von

Detektionskanälen wird dieses Signal aufgefangen und durch die gemessene Fluoreszenzintensität lässt sich eine Aussage über die Quantität der an die Zielstruktur gebundenen Antikörper treffen und damit auch über die biologischen Eigenschaften der Zelle. Da mehrere Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung stehen und diese mit Lasern unterschiedlicher Wellenlänge angeregt werden können, besteht die Möglichkeit, die Zellen gezielt auf das Vorhandensein mehrerer Zielstrukturen hin zu untersuchen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass nur Fluoreszenzfarbstoffe gewählt werden, deren spezifisches Muster an Emissionswellenlängen sich nicht zu stark überlappen und es dadurch zum Einstrahlen eines falschen Signals in den Detektionskanal kommt. Lässt sich solch eine Kombination an Fluoreszenzfarbstoffen nicht vermeiden, muss versucht werden, durch Kompensation einen Prozentsatz des gemessenen Signals des einen Detektionskanals vom anderen Detektionskanal zu subtrahieren, um keine falsch hohen Werte zu erhalten. Um diesen Kompensationswert festzulegen, wird jeder Farbstoff einzeln in der Durchflusszytometrie untersucht und die erhaltenen Basiswerte für die einfach markierten Zellen zum Herausrechnen der Überschneidung benützt. Außerdem werden Isotyp-Kontrollen angefertigt, um mit Hilfe von unspezifischen Isotypantikörpern, welche mit demselben Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wurden wie der untersuchte Antikörper, das Maß der unspezifischen Bindungen bestimmen zu können. Die auf diese Weise erhaltene Negativkontrolle definiert den Wert des Fluoreszenzsignals über dem eine Probe als positiv für den jeweiligen untersuchten Oberflächenmarker ist.

Die gewonnenen Daten der Durchflusszytometrie werden mit Hilfe einer Auswertungssoftware analysiert und in einem Streudiagramm entweder in Bezug auf eine oder zwei zu untersuchenden Parametern dargestellt. Zur weiteren Untersuchung lassen sich auch Teilmengen von Zellpopulationen markieren, wobei diese Zellen dann einem sogenannten Gate angehören. Alle Zellen dieses Gates lassen sich nun in Bezug auf weitere zu untersuchende Parameter auswerten. Auf diese Weise lassen sich bestimmte Zellpopulationen sehr detailliert typisieren. Diese Auswertungsmethode und die hohe statische Aussagekraft durch das Untersuchen von bis zu 1.200 Zellen pro Sekunde machen die Durchflusszytometrie unter anderem zu einem wichtigen Instrument, um die Zellinfiltration in ein Organ qualitativ und quantitativ zu untersuchen.

Durchflusszytometrische Untersuchung der renalen Leukozyteninfiltration

Um die renale Leukozyteninfiltration quantifizieren und charakterisieren zu können, muss eine Einzelzellsuspension der Nierenzellen hergestellt werden. Dazu wurden die Nieren von mTNF-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren wie in Kapitel 2.3 beschrieben mit PBS perfundiert, freipräpariert und auf eisgekühlten Petrischalen zerteilt. Alle weiteren Schritte wurden, falls nicht anders erwähnt, auf Eis durchgeführt. Das für die Durchflusszytometrie vorgesehene Gewebestück wurde in einer weiteren Petrischale mit 3 ml eisgekühltem Paris-Puffer bedeckt und mit einem Skalpell in 0,5 mm große Stücke zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebestücke mit einer 10 ml Spritze in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 7 ml Paris-Puffer aufgefüllt. Es folgten zwei Waschschriffe mit HBSS-Puffer (mit Ca^{2+} , Mg^{2+}) und die Resuspension des Gewebes in 5 ml auf 37°C vorgewärmter Kollagenase/DNAse-Lösung (Kollagenase Typ A, DNAse Typ IV) mit folgender Verdauung für 20 Minuten im 37°C warmen Wasserbad. Nach einem weiteren Waschschriff mit HBSS wurde das Gewebe zusammen mit einer 2 mM EDTA / HBSS (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+})-Lösung für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 30 g wurde der Überstand mit gelösten Zellen in vorgekühlte Zentrifugenröhrchen überführt und das entstandene Pellet nochmals mit Kollagenase, diesmal ohne DNAse, für 20 Minuten im Wasserbad verdaut. Zur weiteren Zerkleinerung der Gewebestücke und Auflösung von Gewebeklumpen wurden diese nun zuerst mit Hilfe einer 10 ml Spritze durch 20-Gauche- und anschließend durch 26-Gauche-Kanülen in eisgekühlte Petrischalen gedrückt und im Folgenden mit den Überständen aus dem vorhergehenden Schritt vereinigt. Um letztendlich eine Einzelzellsuspension zu erhalten folgte abschließend noch ein Siebschriff durch ein 70- μm -Zellsieb und daraufhin die Resuspension der Einzelzellsuspension in FACS-Puffer.

Bevor die Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt wurden, erfolgte die Blockierung unspezifischer, oberflächlicher Bindungsstellen der Zellen, indem 100 μl der Einzelzellsuspension mit einem Gemisch aus jeweils 5 μl Maus- und Rattenserum für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden jeweils 1,4 μl des fluoreszenzmarkierten Antikörpers zu den 110 μl der Einzelzellsuspension zugefügt und für 60 Minuten im Dunkeln und auf Eis inkubiert. Die Proben wurden mit Antikörpern und gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen (Fluoreszeinisothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cyanin 5 (PE-Cy5) und Allophycocyanin (APC)) in drei Ansätzen nach folgendem Schema gefärbt:

1. Ansatz zur Charakterisierung von T-Lymphozyten:
CD45-PE, CD3e-FITC, CD4-APC und CD8-PE-Cy5
2. Ansatz zur Charakterisierung von monozytären Phagozyten:
CD45-PE, CD11c-FITC und F4/80-APC
3. Ansatz zur Charakterisierung von Granulozyten: CD45-PE und Ly6G-FITC

Außerdem wurden für bestimmte Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper Isotyp-Kontrollen mit unspezifischen Antikörpern angefertigt, um unspezifische und spezifische Bindungen voneinander unterscheiden zu können. Nach Abwaschen der nicht gebundenen Antikörper konnten die Proben mit dem Gerät FACSCalibur durchflusszytometrisch untersucht werden. Aufgezeichnet wurden pro Ansatz 100.000 Zellen und mit der Software CellQuest, wie in Abbildung 16 dargestellt, ausgewertet.

Analysierte Zellpopulationen wurden mit dem Nachweis folgender Oberflächenantigenkombinationen charakterisiert:

Leukozyten	CD45 ⁺
Neutrophile Granulozyten	CD45 ⁺ , Ly6G ⁺ , F4/80 ⁻
Dendritische Zellen	CD45 ⁺ , CD11c ⁺
F4/80+ dendritische Zellen	CD45 ⁺ , CD11c ⁺ , F4/80 ⁺
F4/80- dendritische Zellen	CD45 ⁺ , CD11c ⁺ , F4/80 ⁻
Makrophagen	CD45 ⁺ , CD11c ⁻ , F4/80 ⁺
T-Lymphozyten	CD45 ⁺ , CD3 ⁺
CD4+ T-Lymphozyten	CD45 ⁺ , CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁻
CD8+ T-Lymphozyten	CD45 ⁺ , CD3 ⁺ , CD4 ⁻ , CD8 ⁺

Die in den Graphen im Ergebnisteil dargestellten Zellpopulationen sind in Prozentzahl bezogen auf die Gesamtnierenzellen angegeben, wobei die Zahlen den Mittelwert aller in der Durchflusszytometrie untersuchten Tiere des jeweiligen Genotyps widerspiegeln.

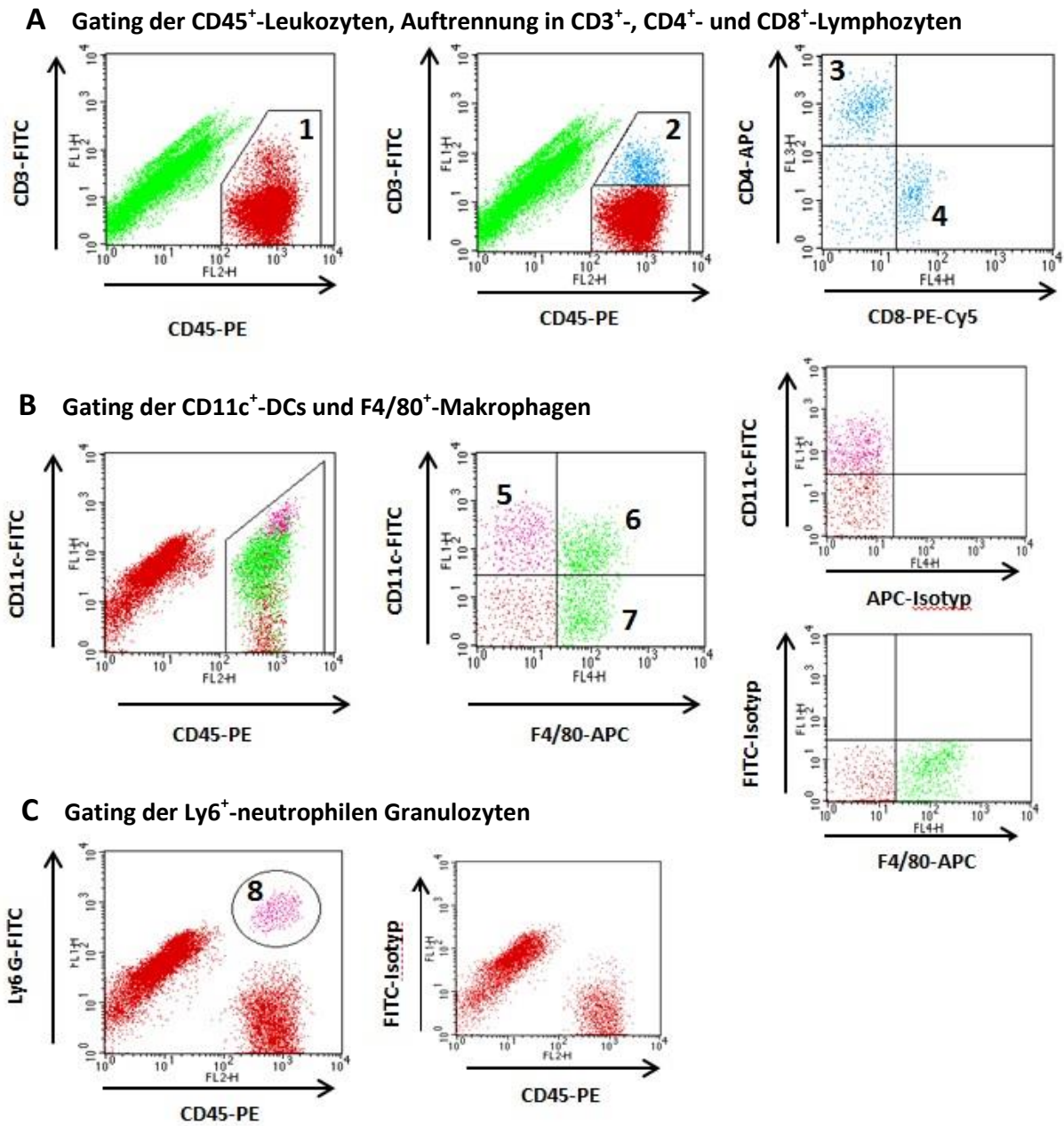


Abbildung 16: Gatingstrategie der durchflusszytometrisch bestimmten renalen Leukozytenpopulationen.

Unter (A) Darstellung aller CD45⁺ Leukozyten (Population 1) und die folgende Auftrennung dieser Population in CD45⁺ CD3⁺ T-Lymphozyten (Population 2), sowie CD4⁺ T-Lymphozyten (CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻, Population 3) und CD8⁺ T-Lymphozyten (CD45⁺, CD3⁺, CD4⁻, CD8⁺, Population 4). In (B) ist die Aufteilung der renalen monozytären Phagozyten in F4/80⁻ dendritische Zellen (CD45⁺, CD11c⁺, F4/80⁻, Population 5), der F4/80⁺ dendritische Zellen (DC; CD45⁺, CD11c⁺, F4/80⁺, Population 6) und der Makrophagen (CD45⁺, CD11c⁻, F4/80⁺, Population 7) dargestellt. In (C) wird die Gatingstrategie für die CD45⁺, Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten dargestellt (Population 8). Ergänzend sind die Isotypkontrollen für F4/80-APC, CD11c-FITC und Ly6G-FITC gezeigt.

2.4.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Allgemeine Funktionsweise

Der Begriff *Enzyme-linked-immunosorbent assay* (ELISA) bezeichnet ein auf einer enzymatischen Farbreaktion beruhendes, antikörperbasiertes Nachweisverfahren zur quantitativen Analyse von Proteinen. Der Nachweis eines bestimmten Protein-Antigens gelingt bei diesem Verfahren durch die Kopplung eines Antikörpers gegen das gesuchte Antigen mit einem Enzym, welches die Reaktion eines Farbsubstrats katalysiert. Diese Reaktion führt nach Bindung des Antikörpers zu einem Farbumschlag, der quantitativ als optische Dichte messbar ist. Eine besondere Technik ist der sogenannte Sandwich-ELISA, der bei allen in dieser Arbeit verwendeten ELISAs zum Einsatz kam. Dabei werden zwei Antikörper gegen zwei unterschiedliche Epitope desselben gesuchten Antigens verwendet. Der erste Antikörper (*Capture*-Antikörper) befindet sich dabei in den Vertiefungen einer 96-Well Platte fixiert und bindet das gesamte in der Probe vorhandene Zielantigen. Alle anderen nicht gebundenen Proteine werden ausgewaschen. Es folgt die Zugabe des zweiten Antikörpers (*Detection*-Antikörper), der mit einem Reporterenzym (Meerrettichperoxidase, engl. *Horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist und die am *Capture*-Antikörper gebundenen Antigene an einem anderen Epitop bindet. Nach Abwaschen der überzähligen, nicht gebundenen *Detection*-Antikörper wird Tetramethylbenzidin (TMB) als das Substrat für die HRP zugegeben. Durch die von HRP katalysierte Reaktion des chromogenen TMB-Substrats erfolgt ein Farbumschlag. Anschließend wird durch das Hinzufügen von Schwefelsäure die Reaktion gestoppt und die photometrische Absorption im *ELISA-Reader* bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert. Es wird zusätzlich eine Standardreihe von bekannten Antigenkonzentrationen auf die ELISA-Platte aufgetragen, aus der sich eine Standardkurve berechnen lässt. Mit deren Hilfe kann aus der optischen Dichte der zu messenden Proben die entsprechende Konzentration des Antigens in der untersuchten Probe bestimmt werden.

Muriner TNF α -, CCL2 / MCP-1 und IL-6 ELISA

Im Zellkulturüberstand von stimulierten Glomeruli und Tubulointerstitium wurden die Zytokine TNF α (BioLegend, San Diego, USA), Interleukin-6 (IL-6) (R&D Systems, Nordenstadt) und das Chemokin CCL2 / MCP1 (R&D Systems, Nordenstadt) mittels kommerziell erhältlichem ELISA-Kit gemäß den Herstellerangaben nachgewiesen.

Albumin ELISA

Die Albuminkonzentration im Spontanurin wurde mit dem kommerziell erhältlichen *Mouse Albumin ELISA Kit* (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) bestimmt. Dazu wurden die Urinproben in einer Verdünnungsreihe um den Faktor 10^4 - 10^7 verdünnt und in einem Dreifachansatz auf die ELISA-Platte pipettiert. Anschließend wurde der Mittelwert des Dreifachansatzes bestimmt und die Verdünnungen im linearen Bereich der Standardkurve zur Auswertung herangezogen. Die Albuminurie wurde im Verhältnis zur Kreatininkonzentration in mg/mg angegeben, da als Probenmaterial nur Spontanurin unterschiedlicher Harnkonzentration zur Verfügung stand und das Kreatinin als Korrekturfaktor für den Grad der Harnkonzentrierung diente.

Kreatinin-Bestimmung mittels Jaffé Methode

Zur Bestimmung der Kreatininkonzentration im Urin wurde das Creatinine FS Kit (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim) verwendet. Dieses Kit arbeitet nach der Jaffé Methode, einem kinetischen Farbttest, der sich die Eigenschaft des Kreatinins zunutze macht, in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen Kreatininpikrat-Komplex zu bilden. Die Urinprobe (2 μ l) wurde dabei 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt, mit Natronlauge alkalisiert und mit Pikrinsäure (4,0 mmol/l) versetzt. Die Kinetik der Farbreaktion konnte im *ELISA-Reader* mit der Extinktion (492 nm) nach 1 min und nach 3 min gemessen werden. Anhand der Standardreihe (0, 1, 2, 4, 8 mg/dl) wurde eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe die Extinktionsdifferenz zwischen der 1. und 3. Minute in die entsprechenden Kreatininkonzentrationen umgerechnet werden konnte.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. RNA Isolation aus Gewebe

Die Isolation der RNA aus Nierengewebe erfolgte mittels PureLink RNA Mini Kit von Ambion. Zunächst wurde das in *RNA-Later* (Ambion) eingefrorene Nierengewebe aufgetaut und in 350 μ l mit 1% β -Mercaptoethanol versetztem RNA-Lyse-Puffer mit einem elektrischen Mixer homogenisiert. Im Verlauf wurden die Proben nach dem Protokoll des Herstellers an einem RNase-freien Arbeitsplatz mit 350 μ l 70%igem nicht vergälltem Ethanol vermischt und auf die Filtersäulen des Isolationskits pipettiert. Durch einen Zentrifugationsschritt (15

Sekunden bei 12.000 g) wurde die RNA aus dem Gemisch gelöst und blieb in der Filtriersäule hängen. Nach Abgießen des im Auffanggefäß verbliebenen Filtrats wird das Ethanol mit Hilfe von 700 µl *Wash-Buffer 1* aus der Filtriersäule gewaschen. Nachdem wieder für 15 Sekunden bei 12.000 g zentrifugiert wurde, kann das Filtrat im Auffanggefäß abgegossen werden. Die Filtriersäulen wurden nun mit 500 µl *Wash-Buffer 2* gewaschen und im Anschluss wieder zentrifugiert. Zum Trocknen der Filtermembran wurde nochmals mit 12.000 g für zwei Minuten zentrifugiert und die Filtersäule auf RNase-freie Auffangbehälter gesetzt. Abschließend wurde die RNA mit Hilfe von 30 µl RNase-freiem Wasser nach einminütiger Inkubation aus den Filtriersäulen gelöst und durch einen letzten Zentrifugationsschritt mit 12.000 g für 2 Minuten am Boden des Auffanggefäßes gesammelt. Die gelöste RNA konnte nun bei -20°C gelagert und im Anschluss die Umschreibung zu cDNA durchgeführt werden.

2.5.2. Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der RNA

Die RNA wurde mithilfe eines Photometers (NanoDrop, Peqlab) auf ihren Reinheitsgehalt und ihre Konzentration untersucht. Dazu wurde 2 µl isolierte RNA-Probe auf den Probenabnehmer des Photometers pipettiert und das Verhältnis der optischen Dichte bei $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm gemessen. War der Koeffizient (260 nm / 280 nm) kleiner als 1,8 oder größer als 2,2 galt die Probe als kontaminiert und die Proben wurden verworfen. Da eine RNA-Konzentration von 40 ng/µl einer optischen Dichte von 1 bei 260 nm Wellenlänge entspricht, war es möglich, die RNA-Konzentration in den isolierten Proben durch das Photometer zu berechnen.

2.5.3. Umschreibung der mRNA zu cDNA durch die Reverse Transkriptase

Zu Beginn der reversen Transkription wurden die RNA-Proben für 5 Minuten bei 65°C im Thermoblock erhitzt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis pipettiert.

Um genau die gleiche Menge RNA umzuschreiben, wurden die Proben so im Verhältnis mit RNase-freiem Wasser gemischt, dass in einem Volumen von 13,2 µl genau 1 µg RNA enthalten war. Das Endvolumen von 13,2 µl RNA-Lösung wurde mit zwei Reagenzmischungen (*Master-Mix*) gemischt. Die eine Mischung enthielt dabei die Reverse Transkriptase (*Superscript II*) und in der anderen Mischung wurde als Negativkontrolle (RT-) anstatt der Superscript II nur RNase-freies Wasser pipettiert. Des Weiteren enthielt der Master-Mix folgende Bestandteile:

4 µl 5x-Puffer
0,4 µl 25 mM dNTP-Mischung
1 µl 0,1 M DTT
0,5 µl 40 U/µl RNasin
0,215 µl Hexanukleotide
0,25 µl Acrylamid 15 µg/ml
0,43 µl Superscript II oder im RT-Ansatz RNase freies Wasser

Zum Starten der cDNA-Synthese wurden 20 µl der RNA-Lösung im Thermoblock für 90 Minuten bei 42°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Proben im Anschluss für 5 Minuten auf 85°C erhitzt, kurz bei 12.000 g zentrifugiert und bei -20°C gelagert.

2.5.4. Quantitative *real-time* PCR

Allgemeines Funktionsprinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: *Polymerase chain reaction*) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Vervielfältigung von DNA. Es wurde 1985 von Kary B. Mullis entwickelt, wofür er 1993 den Nobelpreis erhielt. Die Vervielfältigung der DNA läuft bei der Polymerase-Kettenreaktion immer in drei Schritten ab: Denaturierung, Annealing und Amplifikation. Bei der Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 95°C in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Bei der Primerhybridisierung wird das Gemisch auf 65°C abgekühlt, woraufhin sich die Primer, kurze Oligonukleotide, welche die zu amplifizierende DNA-Sequenz umrahmen, an die komplementären Einzelstränge anlagern können. Nun folgt die Elongation bei 72°C, bei der es zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges durch die hitzestabile DNA-Polymerase kommt.

Allgemeines Funktionsprinzip der quantitative *real-time* PCR (SYBR Green)

Die quantitative *real-time* PCR ist eine besondere Form der PCR, die in Echtzeit (*real-time*) eine quantitative Messung der amplifizierten DNA-Abschnitte ermöglicht. Eine Methode ist dabei das Einbringen des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I in die PCR. Bei diesem asymmetrischen Cyanin handelt es sich um einen interkalierenden Farbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagern kann. Ist der Farbstoff in die Doppelstrang-DNA eingelagert

steigt seine Fluoreszenz deutlich an, weshalb die Fluoreszenzintensität direkt proportional zu den amplifizierten DNA-Doppelsträngen ist. Steigt die Fluoreszenzintensität über eine festgelegte Obergrenze (*Cycle threshold*-Wert, CT-Wert) an und unterscheidet sich damit von der Hintergrundfluoreszenz, so kann durch die Anzahl der bis dahin durchlaufenen Zyklen indirekt eine Aussage über die Ausgangsmenge des durch die Primer markierten DNA-Abschnitts gemacht werden. Um die Proben untereinander vergleichen zu können, werden die Ergebnisse in Relation zu den durchlaufenen Zyklen eines sogenannten *Housekeeping* Gens gesetzt, welches in allen Proben gleichermaßen vorhanden sein sollte. Zum Abschluss jedes *real-time* PCR-Zyklus wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die PCR-Ansätze werden dazu schrittweise von 65°C auf 95°C erhitzt, um die spezifischen Amplifikationsprodukte (Primer mit cDNA), von den unspezifischen PCR-Produkten (z.B. Primer-Dimere) unterscheiden zu können. Dabei zeigen die spezifischen Amplifikate eine charakteristische im Vergleich zu den unspezifischen PCR-Produkten höhere Schmelztemperatur, bei der sich die Doppelstränge lösen, den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff freisetzen und dadurch einen plötzlichen Abfall der Fluoreszenzintensität hervorrufen. Durch die Schmelzkurvenanalyse lässt sich auf diese Weise die Spezifität der abgelaufenen Amplifikationen untersuchen.

Durchführung der quantitative *real-time* PCR (SYBR Green)

Zunächst wurde die umgeschriebene mRNA, welche als RT+ cDNA und als RT-Negativkontrolle vorlag, mit RNase freiem Wasser 1:10 verdünnt. Dann wurde jeweils 2,2 µl der Probe (ein Ansatz RT+ und ein Ansatz RT-) mit 18 µl des PCR-Mix versetzt. Dieser enthielt folgende Reagenzien:

10 µl Mastermix mit SYBR Green I (v. 1.2, Zusammensetzung siehe 2.1.3)

0,6 µl, jeweils des linken und rechten Primes

0,16 µl Taq-Polymerase

6,64 µl RNase freies Wasser

Das Probengemisch wurde im Doppelansatz auf eine 96-well Platte pipettiert und zusätzlich als weitere Negativkontrolle ein Doppelansatz ohne Taq-Polymerase aufgetragen. Die Platte wurde mit einer Folie abgedichtet und zentrifugiert. Die PCR wurde dann nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 7: Parameter des Lightcycler 480 bei der Durchführung der *real-time* PCR.

	Dauer	Temperatur (°C)	
Vorabdenaturierung	5min	95	
Denaturierung	15s	95	40x Wiederholung
Annealing	45s	60	
Extension	30s	72	
Schmelzkurve	5s	95	
	10min	schrittweise Steigerung von 65 -> 95	

Alle in dieser Arbeit verwendeten *real-time* PCR Daten wurden im Lightcycler 480 von Roche erhoben, basierten auf der oben beschriebenen SYBR-Green Methode und wurden mittels der LightCycler 480 Software von Roche, Version 1.2.9.11, ausgewertet. Als *Housekeeping*-Gen diente die 18s rRNA. Alle Proben wurde im Doppelansatz pipettiert und der Mittelwert gebildet. Zeigte sich ein unspezifisches Signal in den RT- cDNA-Ansätzen oder in den Ansätzen ohne Taq-Polymerase, so wurde die *real-time* PCR wiederholt oder gegebenenfalls die Probe verworfen.

2.5.5. Western Blot

Proteinisolation

Um Proteine aus Gesamtnierengewebe isolieren zu können, wurde nach der renalen Perfusion (vgl. Kapitel 2.2.4) etwa ein Drittel einer entkapselten Niere in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Nierengewebe wurde anschließend bei 4°C in ein 2 ml Eppendorfgefäß mit 500 µl RIPA-Puffer mit 20 µl Protease-Inhibitor (1:25) und 5 µl Phosphatase-Inhibitor (1:100) überführt und mit einem Mixer zerkleinert. Das Lysat wurde anschließend für jeweils 3-4 Sekunden in einen *Sonicator* gehalten, um die Zellmembranen durch Ultraschallwellen aufzubrechen. Danach folgte die weitere Homogenisierung durch langsame Rotation des Lysats auf dem Rotator für zwei Stunden. Abschließend konnte nach Zentrifugation mit 15.000 g bei 4°C für 5 Minuten der Überstand mit den gelösten Proteinen von den Zelldebris abpipettiert werden und die Proteinkonzentration im Überstand durch eine Messung nach *Bradford* bestimmt werden.

Western Blot

Der Western Blot wurde erstmal 1981 als semiquantitative Proteinnachweismethode von Neal Burnette, als Abwandlung der von Edwin Southern veröffentlichten Nachweismethode für DNA-Fragmente namens Southern Blot, beschrieben. Beiden Methoden ist die Verwendung einer Membran gemeinsam, auf die zuvor durch eine Gelelektrophorese aufgetrennte Protein- oder DNA-Fragmente unter angelegter Spannung übertragen werden. In dieser Arbeit wurden die Protein-Fragmente mittels primärer Antikörper gegen das gesuchte Protein auf der Membran markiert. Anschließend wird die Fc-Region des primären Antikörpers von einem mit einem Enzym gekoppelten Sekundärantikörper gebunden. Das Enzym am sekundären Antikörper katalysiert eine Reaktion, an dessen Ende die entstehende Chemolumineszenz durch Belichtung eines Röntgenfilms nachgewiesen werden kann. Die entwickelten Röntgenfilme zeigen entsprechend der Menge an fixiertem Protein eine Schwärzung, die mit einer semiquantitativen Messung untereinander verglichen werden kann.

Zu Beginn des Verfahrens werden die Proteinisolate auf dieselbe Konzentration gebracht und mit Ladepuffer nach Lämmli verdünnt. Um in den Proteinen die Disulfidbrücken zu reduzieren, enthielt der Ladepuffer β -Mercaptoethanol und für die notwendige Degradierung der Proteine wurde das Gemisch für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde das Proteinlysate entsprechend einer Proteinmenge von 60-100 μ g in die Taschen eines Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) geladen und die Elektrophorese mit zuerst 100 Volt, nach 30 Minuten 150 Volt konstanter Spannung gestartet. Nach Auftrennung der Proteinfragmente wurden diese vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) durch Anlegen einer 15 Volt Spannung übertragen. Die PVDF-Membran wurde dann für eine Stunde in einer 5%igen Magermilchlösung in *Tris-buffered saline* mit 0,1% Tween-20 (TBS-T) geschwenkt, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Übernacht folgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper, der 1:500 oder 1:1.000 in 5% Magermilchpulver gelöst in TBS-T verdünnt wurde. Nach mehreren Waschschrritten mit TBS-T wurde die Membran für eine Stunde mit dem HRP-Enzym-gekoppelten sekundären Antikörper 1:10.000 gelöst in 5% Magermilchpulver in TBS-T inkubiert. Die Membran wurde wieder mehrmals in TBS-T gewaschen und mit einem Detektionsreagenz (ECL Prime, Amersham) bedeckt. Abschließend wurde die Membran in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm gelegt, der durch die entstehende Biolumineszenz belichtete wurde. Der Film

wurde danach entwickelt und visualisierte den Ort und die Menge des Protein-Fragments als schwarze Bande. Nach der Detektion des gesuchten Proteins folgte die Ladekontrolle durch die semiquantitative Messung des β -Actin Proteins an der gleichen Membran. Dazu wurde die Membran durch einen *Stripping Buffer* (Restore Plus Stripping Buffer, Thermo Scientific) von den Primär- und Sekundärantikörpern befreit, gewaschen und wieder mit dem neuen primären Antikörper gegen β -Actin inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem zuvor Beschriebenen. Die semiquantitative Auswertung der Banden auf den eingescannten Röntgenfilmen erfolgte durch eine Intensitätsmessung mit dem Programm ImageJ, wobei das gesuchte Protein in Relation zur Intensität seiner β -Actin Bande gesetzt wurde.

2.6. Histologische Analyse

2.6.1. Histopathologische Untersuchung in der Lichtmikroskopie

Vorbereitung der Schnitte

Zur histologischen Untersuchung des Nierengewebes wurde je ein 2 mm dicker Querschnitt aus der Mitte beider Nieren eines Tieres geschnitten. Die Schnitte wurden in Histologiekassetten gelegt, für 24 Stunden in 10%iger Formalinlösung bei 4°C fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Um die Schnitte besser auf den Objektträgern zu fixieren, mussten diese mit einer Ammoniumpersulfatlösung (5 ml APES in 245 ml Aceton) vorbehandelt werden. Dabei wurden die Objektträger 2 Mal für 5 Minuten mit Aceton entfettet und dann für 5 Minuten mit der APES-Lösung behandelt. Es folgte das Spülen mit entmineralisiertem Wasser und das Trocknen der Schnitte unter Raumluft. Mithilfe eines Mikrotoms wurden nun 2 μ m dicke Schnitte angefertigt, die an der Oberfläche eines 40°C warmen Wasserbads aufgefangen wurden. Die Schnitte konnten nun auf die vorbehandelten Objektträger aufgebracht werden und trockneten in einem Trockenschrank über Nacht bei 60°C. Bevor die Gewebeschnitte gefärbt wurden, mussten sie entparafiniert werden. Dazu wurden die Schnitte 3 Mal für jeweils 5 Minuten mit Xylol behandelt, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und abschließend mit PBS gewaschen.

Perjodsäure Schiff-Färbung (PAS-Färbung)

Die Perjodsäure Schiff-Färbung ist eine histochemische Färbung, bei der mithilfe der PAS-Reaktion kohlenhydrathaltige Strukturen wie Glykogen oder Glykoproteine angefärbt

werden können. Bei der PAS-Reaktion wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten in Perjodsäure-Lösung (200 ml destilliertes Wasser und 4 g Perjodsäure) getaucht, um die freien Hydroxylgruppen im Gewebe zu Aldehyden zu oxidieren. Nach einem Waschschrift mit destilliertem Wasser, wurden die Schnitte für 20 Minuten in Schiff-Reagenz getaucht. Anschließend wurde für 2 Minuten mit Mayer's Hämatoxylin gegengefärbt und unter fließendem Leitungswasser nochmals gewaschen. Die Dehydrierung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe, bevor die Gewebeschnitte in Eindeckmedium (Pertex) eingebettet wurden.

Quantifizierung der glomerulären Sklerose in der Lichtmikroskopie

Zur Graduierung der glomerulären Schädigung wurden die Gewebeschnitte auf Zeichen der glomerulären Matrixdeposition und Sklerose untersucht. In dieser Arbeit wurde der von El-Nahas 1987 beschriebene Score verwendet [126]. Dabei wurden in den mit PAS gefärbten Gewebeschnitten der Grad der PAS-positiven Ablagerungen in den Glomeruli ermittelt. Pro Versuchstier wurden 50 Glomeruli semiquantitativ nach folgendem Muster ausgewertet und der Mittelwert je Tier gebildet:

- Grad 0 = keine Läsion
- Grad 1 = Mesangiale Zellproliferation oder Verdickung der glomerulären Basalmembran
- Grad 2 = $\leq 50\%$ Sklerose innerhalb des glomerulären Gefäßknäuels
- Grad 3 = $\geq 50\%$ Sklerose innerhalb des glomerulären Gefäßknäuels
- Grad 4 = Diffuse Glomerulosklerose mit Zellnekrose und Zellkollaps

Evaluation des tubulointerstitiellen Schadens in der Lichtmikroskopie

Die Schädigung des Tubulointerstitiums wurde in der PAS-Färbung mithilfe eines morphometrischen Scores für jedes Tier bestimmt. Dabei wurde ein Gitternetz (9 x 13 Punkte) über das digitale Bild eines Gesichtsfeldes aus dem Tubulointerstitium der Nieren gelegt. Ausgewertet wurde die Zahl der Gitterpunkte innerhalb des Bildes in einem dilatierten Tubulus, auf einem tubulären Eiweißzylinder, auf nekrotischen Tubuluszellen und auf Zellen mit hyalinen Tröpfchen (rückresorbiertes Protein) fallen. Diese positiven Gitterpunkte wurden als Prozentzahl der gesamten 117 Gitterpunkte angegeben, wobei pro Versuchstier 20 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet wurden [127].

2.6.2. Immunhistochemische Färbungen in der Lichtmikroskopie

Allgemeines Funktionsprinzip

Die Immunhistochemie beschreibt die Anfärbung von Zellstrukturen in Gewebe mithilfe von Antikörpern, die mit einem Farbstoff gekoppelt wurden. Hat dieser Farbstoff fluoreszierende Eigenschaften so spricht man von Immunfluoreszenzfärbung. Entweder wird der Farbstoff direkt an den Antikörper gebunden oder es wird ein zweiter Antikörper zugegeben, der sich gegen die Fc-Region des ersten Antikörpers richtet und wiederum mit einem Farbstoff gekoppelt ist. Alle in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Färbungen wurden mithilfe der Avidin-Biotin-Methode angefertigt. Ein Primärantikörper bindet dabei die Zielstruktur. Ein mit Biotin gekoppelter Sekundärantikörper bindet an die Fc-Region des Primärantikörpers. Nach Zugabe Peroxidase-konjugierten Avidins bildet dieses aufgrund der hohen Affinität Komplexe mit dem an den Sekundärantikörper gebundenen Biotin. Letztendlich wird ein Farbsubstrat für die Peroxidase hinzugefügt und an der Stelle der Zielstruktur erfolgt die Farbreaktion. Um das Ergebnis nicht zu verfälschen müssen vor Zugabe des Antikörpers endogenes Avidin und Biotin mit einer speziellen Blockierlösung, endogene Peroxidasen mit Wasserstoffperoxid und unspezifische Bindungen mit einer Magermilchlösung blockiert werden.

Färbung für T-Zellen, mononukleäre Phagozyten und neutrophile Granulozyten

Mit Hilfe der Antikörpern anti-CD3, anti-F4/80, anti-MAC-2 und anti-Ly6-B.2 konnten infiltrierende Leukozytensubpopulationen im Gewebe angefärbt und quantifiziert werden. Die Vorbereitung der Gewebeschnitte erfolgte dabei wie oben beschrieben und endete mit der Entparaffinierung. Im Folgenden werden die gemeinsamen Schritte zur Vorbereitung auf die jeweilige Färbung mit den unterschiedlichen Antikörpern erläutert.

Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität und Antigendemaskierung

Um die Aktivität der endogenen Peroxidase aufzuheben, wurden die Gewebeschnitte mit 3%iger Wasserstoffperoxidlösung (30% H₂O₂ 1:10 in Methanol) blockiert und mit PBS gewaschen. Die Antigendemaskierung der Gewebeschnitte erfolgte entweder durch das Autoklavieren nach Behandlung in einer sogenannten *Antigen unmasking solution* oder mittels Salzsäurebad für 10 Minuten.

Durchführung der immunhistochemischen Färbung mittels Avidin-Biotin-Methode

Zuerst erfolgte die Blockierung des endogenen Avidin und Biotins durch einen

Blockierungskit. Nach 15-minütiger Inkubationszeit und mehrfachen Waschschritten erfolgte die Zugabe des in 4%iger Magermilch gelösten Primärantikörpers für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten mit einem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Enzymkonjugat. Nach einem Waschschriff mit TRIS-Puffer wurde das Peroxidasesubstrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen hinzugefügt, woraufhin sich eine schwarze Färbung an den mit Antikörpern markierten Stellen bildete. Die Gewebeschnitte wurden abschließend mit Methylgrün gegengefärbt, das restliche Enzymsubstrat mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe ausgewaschen und letztendlich mit einem Tropfen VecaMount unter einem Deckglas eingebettet.

Auswertung der immunhistochemischen Leukozytenfärbungen

- Ly-6B.2⁺-Granulozyten wurden in 20 Gesichtsfeldern in den beiden Nieren eines Versuchstieres bei 400-facher Vergrößerung gezählt und der Mittelwert aus allen Gesichtsfeldern eines Versuchstieres gebildet. Außerdem wurde die Zahl der Ly-6B.2⁺-Zellen pro Glomeruli in 50 Glomeruli je Versuchstier gezählt.
- Für die Zählung der CD3⁺-T-Lymphozyten im Niereninterstitium wurden 20 Gesichtsfelder in beiden Nieren eines Versuchstieres bei 400-facher Vergrößerung analysiert. Zusätzlich wurden CD3⁺-Zellen, die sich innerhalb eines Glomerulus befanden gezählt. Hierbei wurden 50 Glomeruli pro Versuchstier ausgewertet.
- Zur Analyse der F4/80⁺-Makrophagen im Niereninterstitium wurden in beiden Nieren eines Versuchstieres 20 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung digital fotografiert. Aus diesen Bildern konnte durch das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ der prozentuale Schwarzanteil der F4/80-gefärbten Zellen am Gesamtbild errechnet werden.
- Zur Auswertung der Mac2⁺-glomerulären Makrophagen wurde in beiden Nieren jedes Versuchstiers 50 Glomeruli untersucht. Dabei wurden die Mac2⁺-Zellen pro Glomerulus gezählt.

Analyse der Zellproliferation in der Immunhistochemie

Die Untersuchung von sich in Teilung befindlichen Zellen erfolgte in dieser Arbeit durch immunohistochemische Färbung gegen das *Proliferating-cell-nuclear-antigen* (PCNA). Dieses

Protein umgibt während der DNA-Synthese als sogenanntes Ringklemmprotein die DNA-Polymerase epsilon während der S-Phase des Zellzyklus. Dadurch lässt sich PCNA nur in Zellkernen proliferierender Zellen nachweisen und eignet sich zur Analyse der Zellproliferation als Ausdruck eines Reparaturmechanismus in geschädigtem Nierengewebe. Die Vorbereitung der Gewebeschnitte gestaltete sich gleich wie oben beschrieben.

Zur Auswertung der renalen Zellproliferation wurden die PCNA-positiven Zellen in 20 Glomeruli und 20 tubulointerstitiellen Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung pro Versuchstier gezählt.

Evaluation der glomerulären Deposition von heterologem Schaf-IgG

Die Ablagerung von heterologen Schaf-Antikörpern, die gegen die glomeruläre Basalmembran der Versuchsmäuse gerichtet ist, konnte mittels immunhistochemischer Färbung gegen den Fremdkörper durchgeführt werden. Dazu wurde die positive Fläche der Anti-Schaf-IgG-Färbung in Prozent der glomerulären Gesamtfläche angegeben und zwischen den Genotypen verglichen. Mittels der Software ImageJ wurden dabei 20 Glomeruli pro Versuchsmaus analysiert.

2.6.3. Immunfluoreszenzfärbungen

Allgemeines Funktionsprinzip

Das Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung basiert wie auch die Immunhistochemie auf der Verwendung eines Primärantikörpers gegen ein bestimmtes Antigen und eines Sekundärantikörpers gegen die Fc-Region des Primärantikörpers. Anders als in der Immunhistochemie führt hier aber keine Enzymreaktion zur Markierung des gebundenen Antikörperkomplexes, sondern ein an den Sekundärantikörper gebundener Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom), der mittels einer Fluoreszenzlampe unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

Untersuchung der Podozytenzahl mittels WT1 (Cy³)/Nephrin (Alexa Fluor[®] 488)-Kofärbung

Das Wilms' Tumor-1-Gen (WT1) kodiert für einen Transkriptionsfaktor, dem eine wichtige Rolle in der Organogenese der Nieren zukommt. In ausgereiften Glomeruli findet man WT1

Expression in höherem Ausmaß nur noch in den Podozyten. Zusammen mit dem Podozyten-spezifischen Nephrin kann in der WT1/Nephrin-Kofärbung die Anzahl der Podozyten in einem Glomerulusquerschnitt bestimmt werden. Dazu werden alle WT1⁺-Zellen, welche auch zusätzlich mit Nephrin umrandet sind, als Podozyten im Glomerulus gezählt. Die Durchführung der WT1/Nephrin-Kofärbung begann mit der Vorbereitung der Gewebeschnitte wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben. Zur Auswertung wurde die Podozytenanzahl aus jeweils 20 Glomeruli pro Versuchstier bestimmt.

Untersuchung der glomerulären Endothelzellen mittels CD31 (Alexa Fluor® 555)-Färbung

Die Gewebeschnitte wurden mit dem Endothelzellmarker CD31 (PECAM-1) gefärbt und digitale Bilder von 20 Glomeruli pro Versuchstier bei 400-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop angefertigt. In den erhaltenen Bildern wurde mithilfe der Software ImageJ die Fläche der Glomeruli begrenzt und der Anteil der CD31-gefärbten Areale zur Gesamtfläche berechnet.

Untersuchung der glomerulären Komplementablagerung mittels C3d (Alexa Fluor® 555)-Färbung

Analog zur Analyse der CD31-Färbung wurden bei der Färbung gegen Komplement C3d in der Immunfluoreszenzmikroskopie digitale Bilder von 20 Glomeruli pro Versuchstier bei 400-facher Vergrößerung angefertigt. In den erhaltenen Bildern wurde mithilfe der Software ImageJ die Fläche der Glomeruli begrenzt und der Anteil an gefärbter Fläche zur glomerulären Gesamtfläche prozentual berechnet.

Untersuchung des Zelltods mittels TUNEL-Färbung

Um zu quantifizieren, wie viele renale Zellen an Tag 5 der heterologen NTN absterben, wurde der *in situ* Zelltod Detektions Kit von Roche verwendet, der auf der TUNEL Färbetechnologie basiert. Dabei werden alle Zellkerne mit DNA-Strangbrüchen, die bei unterschiedlichen Formen des Zelltods (Apoptose, Nekroptose und Nekrose) auftreten, gefärbt. In der Fluoreszenzmikroskopie können die gefärbten Kerne sichtbar gemacht und gezählt werden. Es wurde für jedes Versuchstier 20 Glomeruli und 20 tubulointerstitielle Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung auf TUNEL-positive Zellkerne untersucht.

2.7. Statistische Methoden

Die in den Graphiken dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte aller Versuchstiere innerhalb einer Versuchsgruppe. Die Fehlerbalken verdeutlichen die Standardabweichung. In Einzelfällen handelt es sich bei den Fehlerbalken um den *Standard error of the mean*, was durch die Abkürzung *SEM* in den Diagrammen gekennzeichnet ist. Der *Standard error of the mean* errechnet sich aus dem Quotienten zwischen der Standardabweichung und der Quadratwurzel der Anzahl der Versuchstiere innerhalb der Versuchsgruppe. Die Versuchsgruppen wurden untereinander mit dem zweiseitigen Zweistichproben T-Test verglichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde ab einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen. In den Graphen sind statistisch signifikante Unterschiede durch Sternmarkierungen wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Dabei wird im Fließtext ein p-Wert kleiner 0,05 als *statistisch signifikant* bzw. als *signifikanter Unterschied* bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Die mTNF-Maus im Modell der heterologen NTN

Aufgrund der Hypothese, dass das membranständige TNF einen großen Einfluss auf den Verlauf der renalen Entzündungsreaktion in der Glomerulonephritis haben könnte, wurde in dieser Arbeit seine Rolle in der heterologen NTN als Modell einer akuten Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis an transgenen mTNF^{Δ1-9,K11E}-Mäusen und in C57BL/6J Wildtyp-Kontrollmäusen untersucht. Wie in Vorarbeiten beschrieben lässt sich durch die intravenöse Injektion von nephrotoxischem Serum eine heterologe NTN mit der Ausbildung von glomerulärer Sklerose bis Nekrose, tubulärer Dilatation bis hin zur Atrophie der tubulären Epithelzellen, massiver Proteinurie und renaler Leukozytenakkumulation induzieren [26, 123]. Um das Modell in den transgenen mTNF-Mäusen zu induzieren wurde wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben vorgegangen.

3.1.1. Mortalität und systemische inflammatorische Aktivierung

Nach Induktion der heterologen NTN fiel in den mTNF-Mäusen zunächst eine erhöhte Sterblichkeit an frühen Zeitpunkten der NTN im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen auf. Bereits an Tag 1 oder 2 nach Injektion des nephrotoxischen Serums wurden 6 von insgesamt 17 mTNF-Mäuse moribund und mussten euthanasiert werden. Im Vergleich dazu tolerierten die Wildtyp-Mäuse die Induktion der NTN besser, wobei nur eine Maus von 18 Versuchstieren an Tag 1 nach Induktion aus dem Versuch genommen werden musste. Nachdem die Versuchstiere beider Genotypen die ersten zwei Tage nach der Induktion überlebt hatten, war bis zur Beendigung des Versuchs an Tag 5 keine weitere Mortalität mehr zu verzeichnen. Beim Vergleich der Überlebenskurven in Abbildung 17 A zeigte sich eine signifikant höhere Mortalität in den mTNF-Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe im Verlauf des 5 Tage dauernden Experiments.

Um zu untersuchen, ob sich diese Mortalität durch ein stärker ausgeprägtes systemisches Entzündungsgeschehen erklären lässt, wurden im Serum der Versuchsmäuse an Tag 5 der heterologen NTN die Konzentration von proinflammatorischem Interleukin-6 gemessen. Interleukin-6 ist als Marker für die Aktivierung des Immunsystems und als Gradmesser einer systemischen Entzündung bereits im klinischen Alltag etabliert. Bei dem Vergleich der beiden

Genotypen zeigte sich trotz der erhöhten Mortalität in den mTNF-Mäusen keine erhöhte systemische inflammatorische Komponente im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegenteil, die IL-6 Werte und damit die inflammatorische Aktivierung waren in den mTNF-Mäusen signifikant verringert, wobei in beiden Genotypen ein fast 10-facher Anstieg im Vergleich zu naiven Tieren ohne NTN zu beobachten war (Abbildung 17 B).

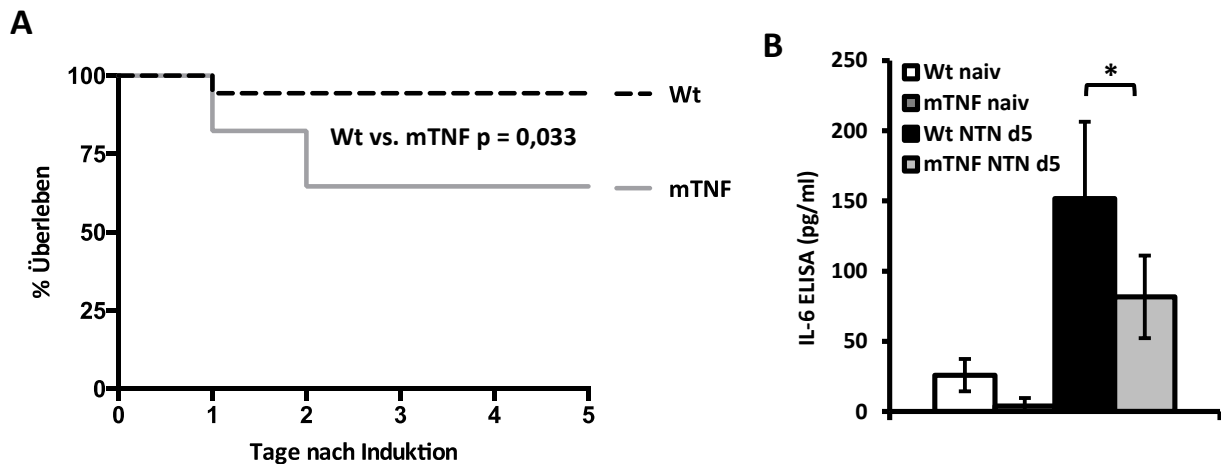


Abbildung 17: Mortalität und IL-6 Serumspiegel in Wildtyp- und mTNF-Mäusen.

(A) Überlebenskurven der Wildtyp- und mTNF-Mäuse von Tag 0 bis Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN. In der mTNF-Versuchsgruppe schieden an Tag 1 nach Induktion 3 Versuchsmäuse und an Tag 2 nach Induktion 3 Versuchsmäuse aus dem Versuch aus (6 von 17 Tieren insgesamt). In der Wildtypgruppe starb hingegen an Tag 1 nach Induktion nur ein Versuchstier (1 von 18 insgesamt). N=17-18 Mäuse pro Gruppe aus 3 unabhängigen Experimenten. Logrank Test Wt vs. mTNF; p = 0,033. (B) Interleukin-6 ELISA im Serum von Wildtyp- und mTNF-Mäusen an Tag 5 der heterologen NTN. Trotz der erhöhten Mortalität in den mTNF-Mäusen ist eine schwächere systemische inflammatorische Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp nachzuweisen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD mit n=4 je Gruppe. *p < 0,05 vs. Wildtyp.

3.1.2. Funktionelle Nierenparameter

Die funktionellen Nierenparameter wurden als Marker für die renale Schädigung untersucht. Die Größe der Albuminurie spiegelt den glomerulären Funktionsverlust infolge einer geschädigten Filtrationsbarriere wider. Zudem erfolgte die Bestimmung des Serumharnstoffs als Maß für die eingeschränkte exkretorische Nierenfunktion durch Abnahme der glomerulären Filtrationsrate.

Albuminurie im Verlauf der NTN

Die Untersuchung der Albuminurie erfolgte mittels ELISA aus Spontanurinproben der Versuchstiere an den untersuchten Zeitpunkten 0, 2, 5 und 7 Tage nach Induktion der NTN. Da der Spontanurin bei den Versuchsmäusen einen unterschiedlichen Konzentrierungsgrad aufweist, wurden die Werte für die Albuminkonzentration mittels Kreatininbestimmung normiert und als Albumin-Kreatinin-Quotient dargestellt.

Bei beiden Versuchsgruppen zeigte sich an Tag 0 vor Induktion der NTN keine nennenswerte Albuminurie. Dies deutet auf eine intakte Struktur der glomerulären Filtrationsbarriere in beiden Genotypen zu Beginn des Versuchs hin (Abbildung 18). Nach Injektion des nephrotoxischen Serums entwickelten beide Versuchsgruppen eine starke Albuminurie im Verlauf mit Werten zwischen 20-100 mg/mg Kreatinin, was einem 10^3 - 10^4 -fachen Anstieg im Vergleich zu naiven Tieren entspricht. Dieser starke Anstieg spricht für eine erfolgreiche Induktion des NTN-Modells in den Versuchstieren (Abbildung 18). Bereits an Tag 2 waren Werte bis 40 mg/mg Kreatinin messbar, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und mTNF- Mäusen bestand. Am Zeitpunkt der höchsten gemessenen Albuminurie, an Tag 5 nach Induktion, zeigte sich jedoch eine signifikant höhere Albuminurie in den mTNF-Mäusen mit im Mittel 92 mg/mg Kreatinin im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe mit 62 mg/mg Kreatinin (Abbildung 18). An Tag 7 nach Induktion der heterologen NTN fiel die Albuminurie wieder deutlich auf Werte um die 20 mg/mg Kreatinin ab, ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen zu zeigen. Dieser Rückgang wurde auf einen bereits einsetzenden Reparationsprozess in den geschädigten Nieren zurückgeführt. Zusammengefasst weist die höhere Albuminurie am 5. Tag der NTN auf eine stärkere glomeruläre Schädigung im mTNF-Genotyp im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren hin.

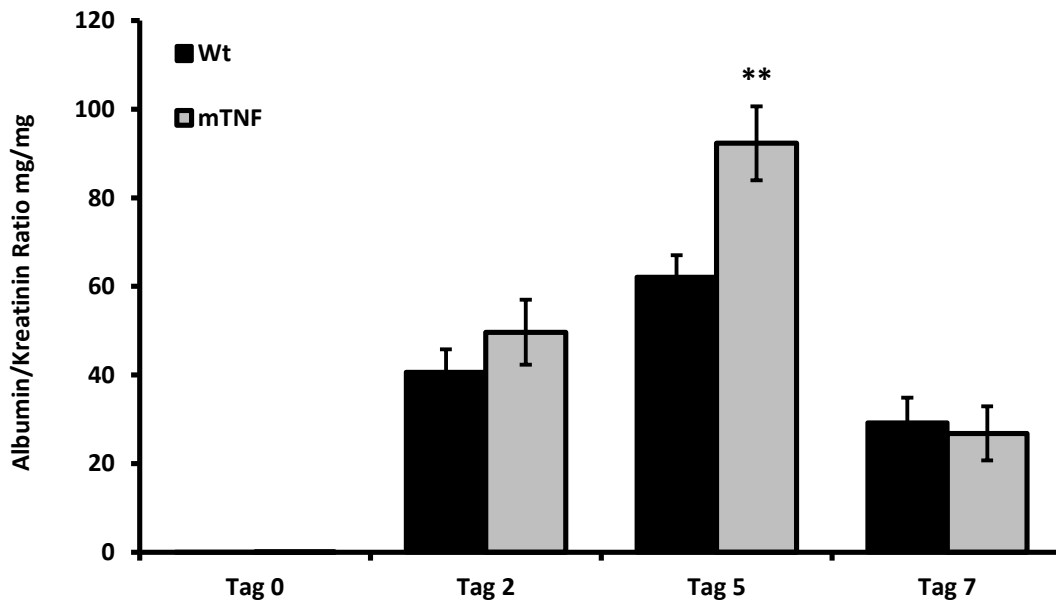


Abbildung 18: Albuminurie im Verlauf der NTN in Wildtyp- und mTNF-Mäusen.

Bei Wildtyp- und mTNF-Mäusen wurden vor der Induktion der NTN (Tag 0) und an den Tagen 2, 5 und 7 nach Induktion die Albuminwerte mittels ELISA aus Spontanurinproben bestimmt. Die Albuminkonzentrationen wurden mit dem gemessenen Kreatininwert der Probe in ein Verhältnis (mg/mg) gesetzt, um die Konzentration des Urins zu berücksichtigen. An Tag 5 zeigte sich in den mTNF-Mäusen eine signifikant höhere Albuminurie im Vergleich zu der Wildtyp-Gruppe. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM mit $n = 5-13$ je Gruppe. ** $p < 0,01$ vs. Wildtyp.

Serumharnstoff

Nachdem die erhöhte Albuminkonzentration im Urin der mTNF-Mäuse für eine stärkere glomeruläre Schädigung sprach, wurden im nächsten Schritt die Auswirkungen der NTN auf die Ausscheidungsfunktion der Niere untersucht. Hierfür wurde die Harnstoffkonzentration im Serum der Versuchstiere als Retentionsparameter bestimmt. Die Blutabnahme erfolgte an Tag 5 nach Induktion der NTN, was dem Zeitpunkt der höchsten gemessenen Albuminurie entsprach.

Im Vergleich zu naiven Wildtyp-Mäusen ohne NTN (Mittelwert: 49 mg/dl) zeigte sich ein um mehr als das Doppelte erhöhter Harnstoffspiegel im Serum der Wildtyp-Mäuse nach NTN-Induktion (im Mittel 128 mg/dl). Dies spricht wie schon die gestiegene Albuminurie für die erfolgreiche Induktion der heterologen NTN mit einem starken nephritischen Phänotyp. Analog zur stärkeren Albuminurie an Tag 5 nach Induktion der NTN wurden auch signifikant erhöhte Serumharnstoffwerte in den mTNF-Mäusen mit im Mittel 211 mg/dl im Vergleich zu

den Wildtyp-Kontrolltieren mit 128 mg/dl festgestellt (Abbildung 19). In den mTNF-Mäusen war die Konzentration des Serumharnstoffs 1,6-fach höher als in den Wildtyp-Kontrolltieren.

Zusammen mit der erhöhten Albuminurie ergibt sich das Bild einer größeren renalen Funktionseinschränkung in den mTNF-Mäusen. Dies sollte mit einer stärker ausgeprägten renalen Gewebeschädigung einhergehen, die in der histopathologischen Untersuchung von renalen Gewebeschnitten anhand bestimmter morphologischer Charakteristika quantifiziert werden kann.

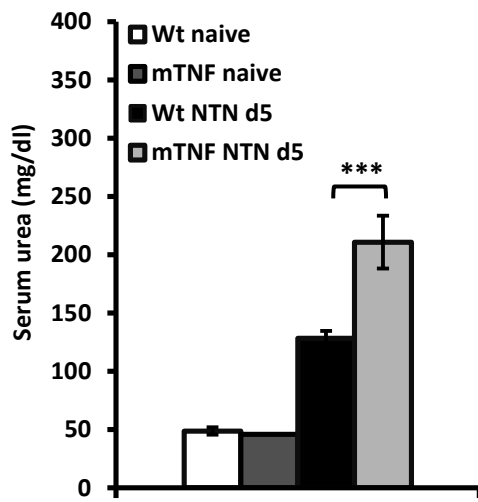


Abbildung 19: Serumharnstoffwerte von Wildtyp- und mTNF-Mäusen an Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN.

Nach NTN-Induktion steigt die Harnstoffkonzentration im Serum sowohl in den Wildtyp-, als auch in den mTNF-Mäusen im Vergleich zu naiven Wildtyp-Mäusen deutlich an. Dabei zeigen die mTNF-Mäuse signifikant höhere Serumharnstoffwerte an Tag 5 nach Induktion als die Wildtyp-Mäuse. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM mit $n = 6$ je Gruppe. $**p < 0.01$ vs. Wildtyp mit NTN.

3.1.3. Evaluation des glomerulären und tubulointerstitiellen Nierenschadens

Bei der Untersuchung der funktionellen Nierenparameter zeigte sich eine größere Schädigung des Filtrationsapparates und ein größerer renaler Funktionsverlust in den mTNF-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Um zu überprüfen, ob der Funktionsverlust auch mit einem größeren strukturellen Schaden im Nierengewebe korreliert, wurden histologische Schnitte des Nierengewebes nach Versuchsabschluss an Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN angefertigt und mit unterschiedlichen Färbemethoden einer histopathologischen Evaluation unterzogen.

Glomerulärer Schaden

Die Untersuchung des glomerulären Schadens wurde mithilfe der PAS-Färbung an histologischen Schnitten der Nieren aus beiden Versuchsgruppen durchgeführt. Dabei wurde der glomeruläre Schadens-Score nach EL Nahas erhoben (siehe Kapitel 2.6.1), bei dem den

Glomeruli semiquantitativ nach dem Grad der mesangialen Zellproliferation und der glomerulären Matrixdeposition ein Punktwert zugeordnet wurde.

Es zeigte sich bei den mTNF-Mäusen ein erhöhter Grad an glomerulärer Sklerose und Matrixdeposition im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, was durch den signifikant höheren Schadens-Score nachgewiesen werden konnte. Dabei konnten zwar in einzelnen Glomeruli in beiden Versuchsgruppen geringe histopathologische Zeichen einer glomerulären Schädigung nachgewiesen werden, die deutliche Mehrzahl der Glomeruli war dagegen stark sklerosiert, bis hin zur Zellnekrose im glomerulären Gefäßkonvolut (Abbildung 20 A).

Bereits kurz nach Injektion des nephrotoxischen Serums sind die heterologen Schaf-Antikörper in den Glomeruli der Versuchsmäuse nachweisbar und aktivieren mit ihrer Fc-Region das Komplementsystem, das für den Anbruch der Entzündungsreaktion in diesem Modell verantwortlich ist [26, 123]. Um Unterschiede im Verlauf der NTN zwischen beiden Versuchsgruppen vergleichen zu können, ist es wichtig, eine initial vergleichbare Deposition von heterologen Antikörpern nachzuweisen. Dazu wurden die abgelagerten heterologen Schaf-Antikörper immunhistochemisch gefärbt und deren Ablagerung entlang der glomerulären Basalmembran als gefärbte Fläche in Prozent der Gesamtfläche des Glomerulus ausgewertet. Beide Versuchsgruppen wiesen im Mittel keine signifikant unterschiedliche glomeruläre Antikörper-Ablagerung auf, was dafür spricht, dass der unterschiedliche NTN-Verlauf in Wildtyp- und mTNF-Mäusen nicht durch eine initial abweichende Menge an abgelagerten Antikörpern in den Glomeruli bedingt ist (Abbildung 20 B).

Im Anschluss an die Deposition der heterologen Antikörper erfolgt die Aktivierung des angeborenen Immunsystems in Form einer Komplementreaktion. Deshalb wurde der entlang der glomerulären Basalmembran abgelagerte Komplementfaktor C3d als Parameter für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems untersucht, um eine vermehrte Komplementaktivierung als Ursache der verstärkten glomerulären Schädigung in den mTNF-Mäusen auszuschließen. Dazu wurde das Verhältnis der C3d-positiven gefärbten Fläche an der Gesamtfläche des Glomerulus gemessen. In der Untersuchung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mTNF- und den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 20 C).

Anhand der vermehrten Glomerulosklerose in den mTNF-Mäusen war davon auszugehen, dass auch mehr Zellen in den Glomeruli dieser Tiere geschädigt wurden und es

möglicherweise auch zu einem vermehrten Auftreten von Zelltod in den transgenen mTNF-Mäusen gekommen war. Um dieser Frage nachzugehen, wurden renale Gewebeschnitte von beiden Versuchsgruppen mittels des *In situ cell death detection kits* auf TUNEL-positive Zellkerne im Glomerulus untersucht. In untergegangenen Zellen und Zellen, die im Begriff sind abzusterben, werden durch das TUNEL-Verfahren (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) DNA-Strangbrüche im Zellkern sichtbar gemacht. Dabei wird sowohl der regulierte Zelltod zum Beispiel durch Apoptose, Nekroptose oder Ferroptose, wie auch der unregulierte, passive Zelltod in Form von Nekrose detektiert. In den Glomeruli der mTNF-Mäuse ließen sich in Korrelation zur vermehrten Gewebeschädigung im PAS-Score mit 0,64 TUNEL⁺-Zellkerne pro Glomerulus signifikant mehr absterbende Zellen im Vergleich zum Wildtyp mit 0,26 TUNEL⁺-Zellkerne pro Glomerulus nachweisen (Abbildung 20 D).

Übereinstimmend mit der größeren Zahl an absterbenden Zellen in den Glomeruli der mTNF-Mäuse an Tag 5 der heterologen NTN konnte auch eine größere Anzahl an proliferierenden Zellen als Anzeichen eines ablaufenden Reparaturvorgangs, der nach Zelluntergang eingeleitet wird, in den Glomeruli der transgenen mTNF-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Hierfür wurden die histologischen Schnitte beider Versuchsgruppen gegen das *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)* gefärbt, wobei die proliferierenden Zellen in denen DNA-Replikation stattfindet, als PCNA⁺-Zellen pro Glomerulus gezählt und zwischen den beiden Gruppen verglichen wurde (Abbildung 20 E). In den Glomeruli der mTNF-Mäuse waren mit 12,1 PCNA⁺-Zellen pro Glomerulus signifikant mehr proliferierende Zellen im Vergleich zu den Glomeruli in Wildtyp-Mäusen mit 8,6 PCNA⁺-Zellen pro Glomerulus nachweisbar.

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass sowohl mehr Zellen untergehen als auch mehr Zellen in den Glomeruli der mTNF-Mäuse proliferieren, stellte sich die Frage, welcher Zelltyp innerhalb des Glomerulus für die schlechtere Nierenfunktion und den größeren morphologischen Schaden in den mTNF-Mäusen während der nephrotoxischen Serumnephritis verantwortlich ist. Eine mögliche Erklärung für die nachgewiesene vermehrte Albuminurie in den mTNF-Mäusen wäre eine Podozytenschädigung mit vermehrtem Untergang dieser Zellen. Daher wurde eine fluoreszenzmikroskopische Doppelfärbung mit WT1 und Nephryn angefertigt, um die glomerulären Podozytenzahl in Wildtyp- und mTNF-Mäusen zu bestimmen. Die WT1/Nephryn doppelpositiven Zellen wurden dabei als

Podozyten gewertet und pro Glomerulus gezählt (Abbildung 20 F). Sowohl in den mTNF- als auch in den Wildtyp-Mäusen nahm die durchschnittliche Podozytenzahl im Glomerulus stark im Vergleich zu naiven Wildtyp-Tieren ohne NTN von 15 auf 6 Podozyten/Glomerulus ab. In Folge der Nephritis waren eine erhebliche Anzahl der Podozyten in den Glomeruli abgestorben oder zeigten keine für Podozyten typische Nephrintfärbung mehr. Allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Podozytenzahl zwischen den beiden Versuchsgruppen. Da auch ein vermindertes Expressionsniveau des podozytär gebildeten Nephrens auf einen Podozytenschaden hinweist, wurde die Nephtrin mRNA-Expression in nephritischen Wildtyp- und mTNF-Tieren bestimmt. Als essentieller Bestandteil der podozytären Schlitzmembran hat Nephtrin Einfluss auf die Filtrationsbarriere der Niere und könnte Auslöser für die erhöhte Albuminurie in den mTNF-Mäusen sein. Tatsächlich wies die mRNA-Expression aus den nephritischen Nieren der mTNF-Mäuse eine signifikant erniedrigte Nephtrin mRNA im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 20 G).

Ein weiterer Zelltyp, der genau wie die Podozyten entscheidend am Aufbau der glomerulären Basalmembran beteiligt ist, sind die glomerulären Endothelzellen, deren Integrität an Tag 5 der heterologen NTN in beiden Genotypen untersucht wurde. Dazu wurde in renalen Gewebeschnitten die Fläche von CD31 (PECAM-1), einem Endothelzellmarker, gefärbtem Areal in Prozent der glomerulären Gesamtfläche berechnet. Interessanterweise konnte bei der Evaluation der Endothelzellschädigung eine signifikant verminderte Färbung für CD31 in den Glomeruli der mTNF- im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen gesehen werden. Dies deutet darauf hin, dass mehr glomeruläre Endothelzellen in den mTNF-Mäusen abgestorben sind und auf diese Weise zur Verschlechterung der Nephritis in den gentechnisch veränderten Mäusen beitragen (Abbildung 20 H).

Zusammenfassend fand sich bei der Evaluation des glomerulären Schadens in den mTNF-Mäusen eine verstärkte glomeruläre Sklerose mit vermehrter Matrixdeposition im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Der vermehrte glomeruläre Schaden in den mTNF-Mäusen ließ sich nicht durch eine unterschiedliche Ablagerung von heterologen Anti-GBM-Antikörpern oder Aktivierung des Komplementsystems erklären. Auf zellulärer Ebene weisen die Glomeruli der mTNF-Mäuse an Tag 5 der NTN eine signifikant höhere Zahl von absterbenden und proliferierenden Zellen auf, was beides für eine vermehrte Induktion des Zelltods in den mTNF-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp spricht. Der vermehrte Zelluntergang ließ sich auf

Ebene der glomerulären Zelltypen durch eine im Vergleich zum Wildtyp geringere glomeruläre Expression des Endothelzellmarkers CD31 in den Glomeruli der mTNF-Mäuse bestätigen. Andererseits konnte keine signifikant differierende Podozytenzahl zwischen beiden Genotypen gesehen werden, wobei die verminderte Nephринexpression in den Glomeruli der mTNF-Mäuse auch hier auf eine vermehrte Podozytenschädigung hinweist

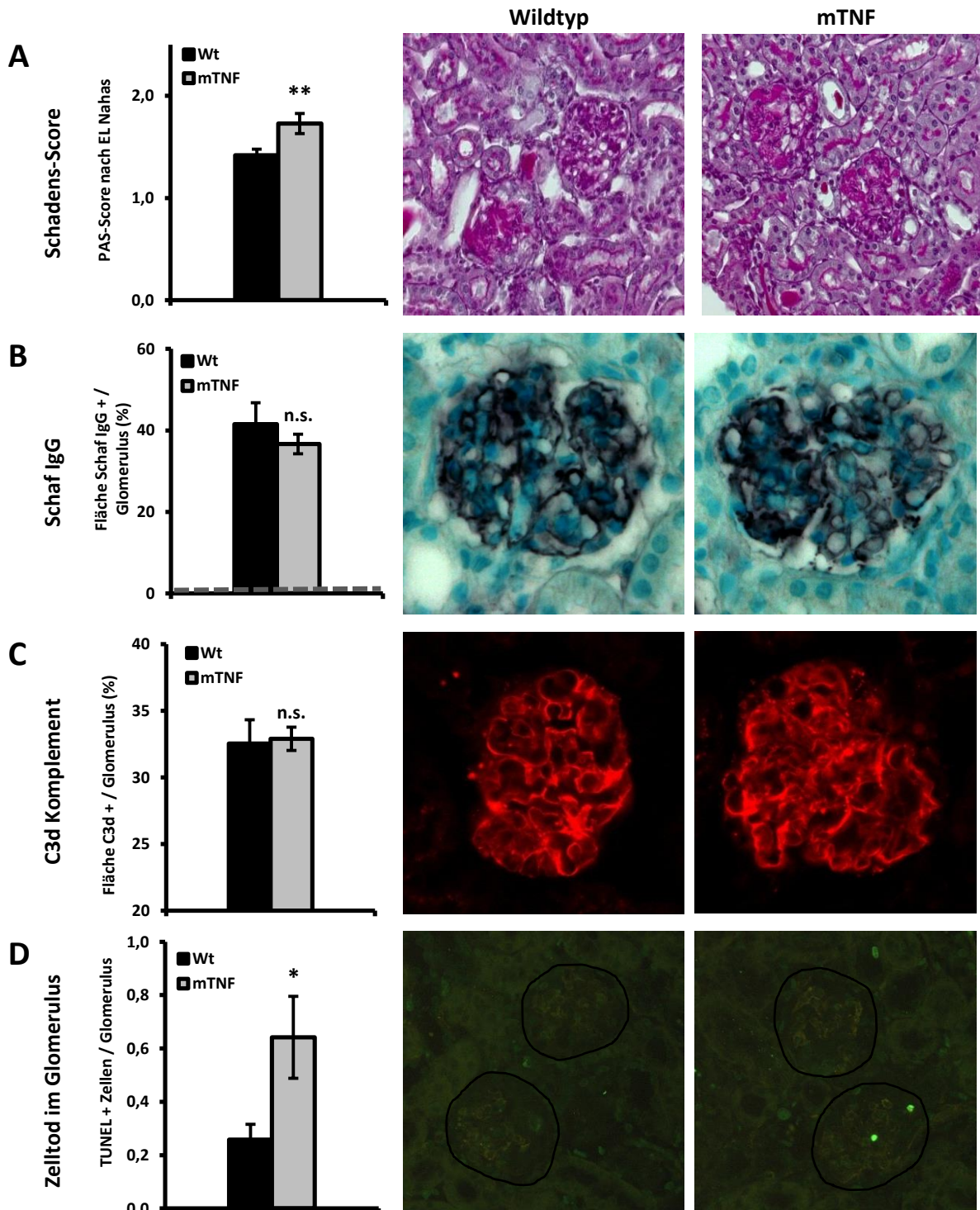


Abbildung 20: Fortsetzung nächste Seite.

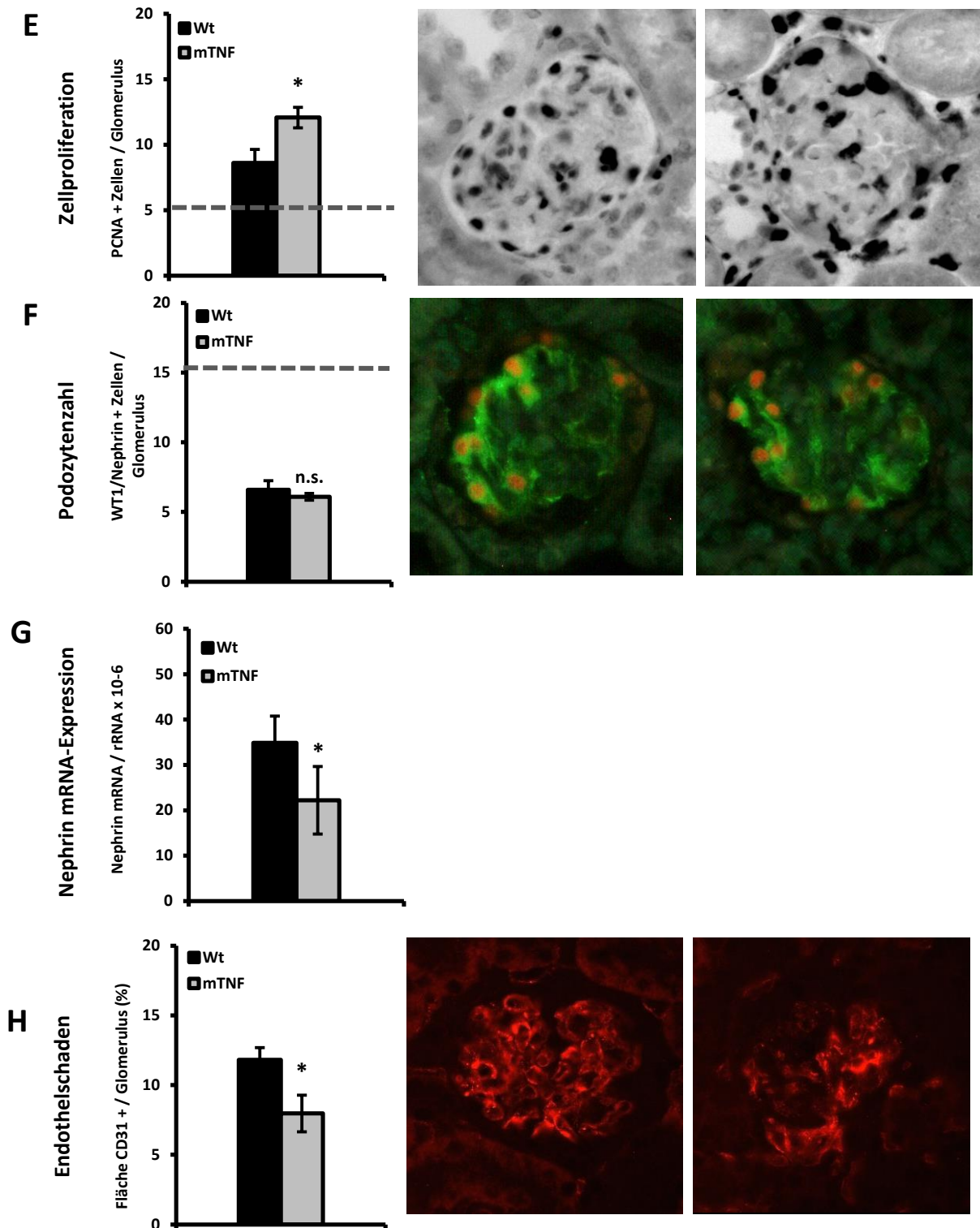


Abbildung 20: Histologische Evaluation des glomerulären Schadens in Wildtyp- und mTNF-Mäusen.

A) Um die glomeruläre Schädigung in den Versuchstieren zu Vergleichen wurde der El Nahas glomerulären Schadens-Score erhoben. Dabei wurden die Glomeruli in der PAS-Färbung auf den Grad der PAS-positiven Matrixdeposition hin untersucht. In den mTNF-Mäusen war der Score signifikant gegenüber den Wildtyp-Mäusen erhöht. Eine vermehrte glomeruläre Ablagerung von heterologem Schaf IgG aus dem nephrotoxischem Serum (B) oder eine verstärkte Komplementablagerung (C) entlang der GBM als Ursache für die verstärkte glomeruläre Schädigung in den mTNF-Mäusen wurde

in der Immunhistochemie gegen Schaf IgG und in der Immunfluoreszenz gegen C3d ausgeschlossen. Es wurde die positiv-gefärbte Fläche in Prozent der Gesamtfläche des Glomerulus an Tag 5 der NTN berechnet, wobei kein Unterschied zwischen den Genotypen zu sehen war. (D) Passend zur vermehrten Matrixdeposition ließ sich in den Glomeruli der mTNF-Mäuse eine signifikant höhere Zahl von TUNEL⁺, absterbenden Zellen im Vergleich zum Wildtyp nachweisen. (E) Gleichzeitig wies eine signifikante Erhöhung der PCNA⁺, proliferierenden Zellen in den Glomeruli der mTNF-Mäuse auf eine vermehrte glomeruläre Zellregeneration hin. (F) Der Vergleich der Podozytenzahl pro Glomeruli durch die WT1/Nephrin-Doppelfärbung in der Immunfluoreszenz zeigte im Vergleich zu nichtnephritischen Kontrolltieren eine große Anzahl untergegangener Podozyten in beiden Versuchsgruppen, ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. (G) Die mRNA-Expression von Nephrin aus der Gesamtniere wurde mittels real-time PCR gemessen und anschließend auf 18s-rRNA normalisiert. Dabei zeigte sich in den mTNF-Mäusen eine signifikant niedrigere Nephrin mRNA-Expression im Vergleich zum Wildtyp an Tag 5 der NTN. (H) Zur Untersuchung der glomerulären Endothelzellschädigung wurde die prozentuale Fläche der CD31⁺ Immunfluoreszenzfärbung an der glomerulären Gesamtfläche analysiert, die sich signifikant niedriger in den mTNF-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren zeigte. Die naiven Werte von gesunden Wildtyp-Mäusen sind als gestrichelte Linie dargestellt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM n = 5 bis 10 je Gruppe, * p < 0,05, ** p < 0,01, n.s. = nicht signifikant.

Tubulointerstieller Schaden

Nach der Untersuchung des strukturellen Schadens im Glomerulus erfolgte die Evaluation des tubulären Schadens mithilfe einer semiquantitativen Auswertung (siehe Kapitel 2.6.1). Die renalen Gewebeschnitte der Wildtyp- und mTNF-Mäuse wurden in der PAS-Färbung an Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN hinsichtlich tubulärer Dilatation, tubulärer Zylinder, Nekrose von Tubuluszellen und Tubuluszellen mit hyaline Resorptionsvakuolen untersucht.

In der histopathologischen Untersuchung des Tubulointerstitiums zeigte sich zunächst in keinem der genannten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen, wobei eine deutliche tubuläre Dilatation, Tubulusnekrose, Zylinderbildung und hyaline Tröpfchen in beiden Genotypen nachweisbar war (Abbildung 21 A). Die Tatsache, dass zwar auf glomerulärer Ebene mehr morphologischer Schaden in den mTNF-Tieren nachgewiesen wurde, jedoch nicht im Tubulointerstitium könnte darauf zurückzuführen sein, dass der tubulointerstitielle Schaden in der heterologen NTN erst sekundär durch die glomeruläre Schädigung und auftretende Albuminurie verursacht wird. Diese war bei der Untersuchung der heterologen NTN erst ab Tag 5 signifikant in den mTNF-Mäusen erhöht, was dazu führen könnte, dass die tubulointerstitielle Schädigung erst

zeitverzögert in vollem Umfang in der histopathologischen Evaluation zu Tage tritt. Diese Hypothese wird auch durch die Untersuchung des tubulointerstitiellen Zelltods und Zellproliferation sowie der molekularbiologischen Auswertung von tubulären Schadensmarkern unterstützt. Es zeigte sich bei der histologischen Analyse des Zelltods mittels TUNEL-Färbung (Abbildung 21 B) analog zur Untersuchung in den Glomeruli auch signifikant mehr TUNEL⁺-Zellen und damit mehr Zelltod im Tubulointerstitium der mTNF-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Bei der Quantifizierung der proliferierenden PCNA⁺-Zellen (Abbildung 21 C) im Tubulointerstitium war eine tendenziell vermehrte Zellproliferation im mTNF-Genotyp im Vergleich zum Wildtyp zu sehen, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen.

Auch auf molekularer Ebene war bereits an Tag 5 der NTN in den mTNF-Mäusen eine stärkere tubuläre Schädigung als in den Wildtyp-Tieren nachzuweisen. Es wurde die mRNA-Expression der beiden tubulären Schadensmarker *Liver type fatty acid binding protein* (L-FABP) und α -Glutathion-S-Transferase (α -GST) in der quantitativen real-time PCR im Gesamtnierengewebe untersucht und auf die 18S-ribosomale RNA normiert (Abbildung 21 D). Diese Marker werden vermehrt durch proximale Tubuluszellen in Reaktion auf Stress oder Schädigung gebildet. Es zeigte sich vor allem in den mTNF-Mäusen eine starke Expressionssteigerung nach Induktion der NTN verglichen mit naiven Mäusen an Tag 0 und eine signifikant höhere Expression beider Marker in den mTNF-Mäusen an Tag 5 der NTN im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Dies deutet auf eine größere Schädigung im proximalen Tubulussystem der mTNF-Tiere durch die NTN hin, wobei dieser Unterschied in der morphologischen Begutachtung an einem frühen Zeitpunkt der NTN noch nicht fassbar war.

Zusammenfassend lassen sich sowohl in den Glomeruli als auch im Tubulointerstitium der mTNF-Mäuse Hinweise für eine größere renale Schädigung finden, wobei mTNF-Mäuse insbesondere durch vermehrten renalen Zelltod und Verminderung des glomerulären Endothels charakterisiert sind. Auch die verschlechterten funktionellen Nierenparameter sprechen für einen deutlich aggravierten nephritischen Phänotyp in den transgenen mTNF-Mäusen. Hieraus ergibt sich die Frage, wie das membranständig exprimierte TNF, in Abwesenheit von löslichem TNF zu dem verschlechterten Krankheitsverlauf führt. Da nicht nur lösliches, sondern auch membranständiges TNF über TNFR2 Zelltod in Zielzellen in Form von Apoptose oder Nekroptose auslösen kann [76], wurde im Folgenden mittels Western

Blot untersucht, ob sich in den Nieren der mTNF-Mäuse vermehrt Apoptose und Nekroptose-assoziierte Proteine wie aktivierte Caspase-3, *Receptor interacting protein* (RIP) 1 oder RIP3 nachweisen lassen.

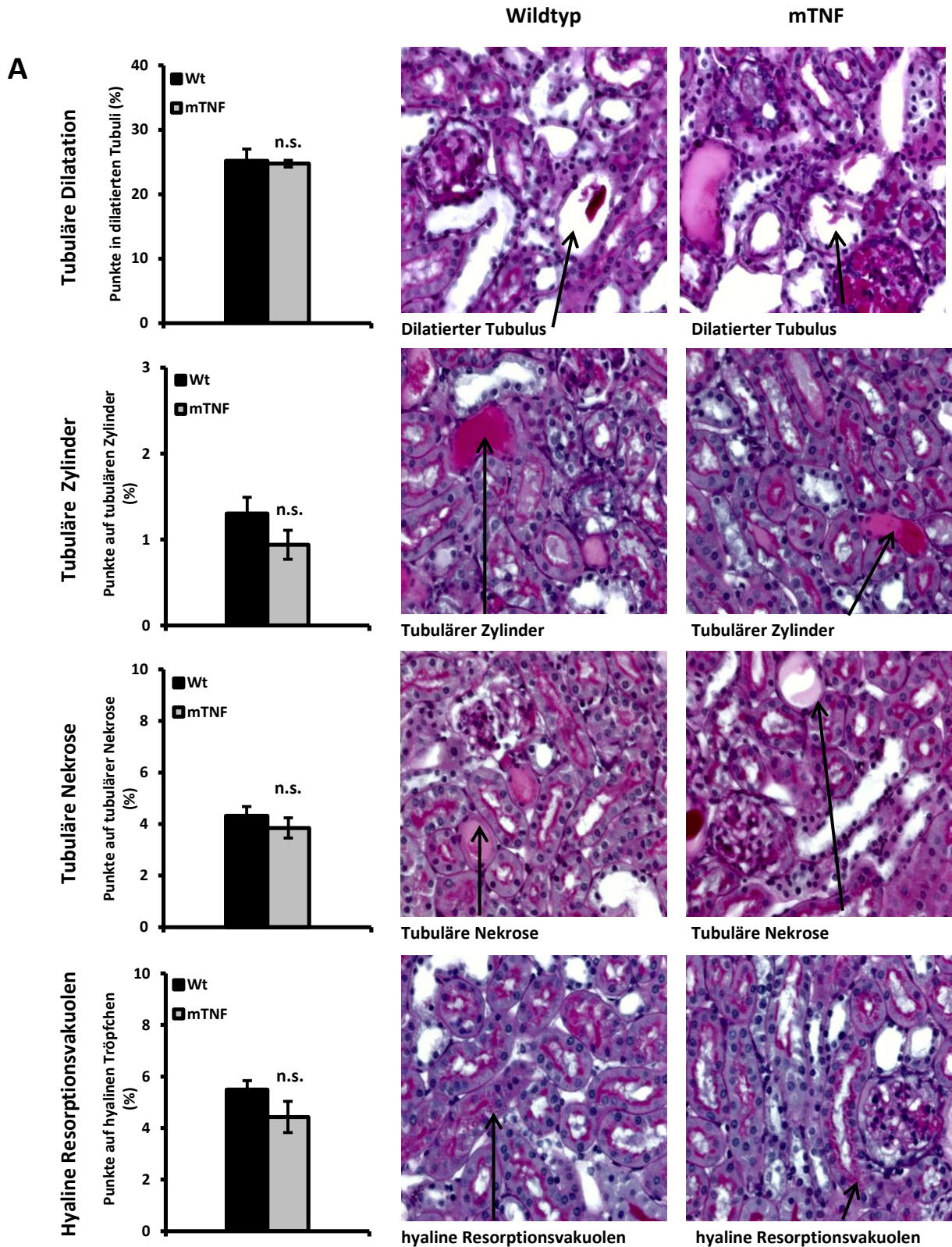


Abbildung 21: Fortsetzung nächste Seite

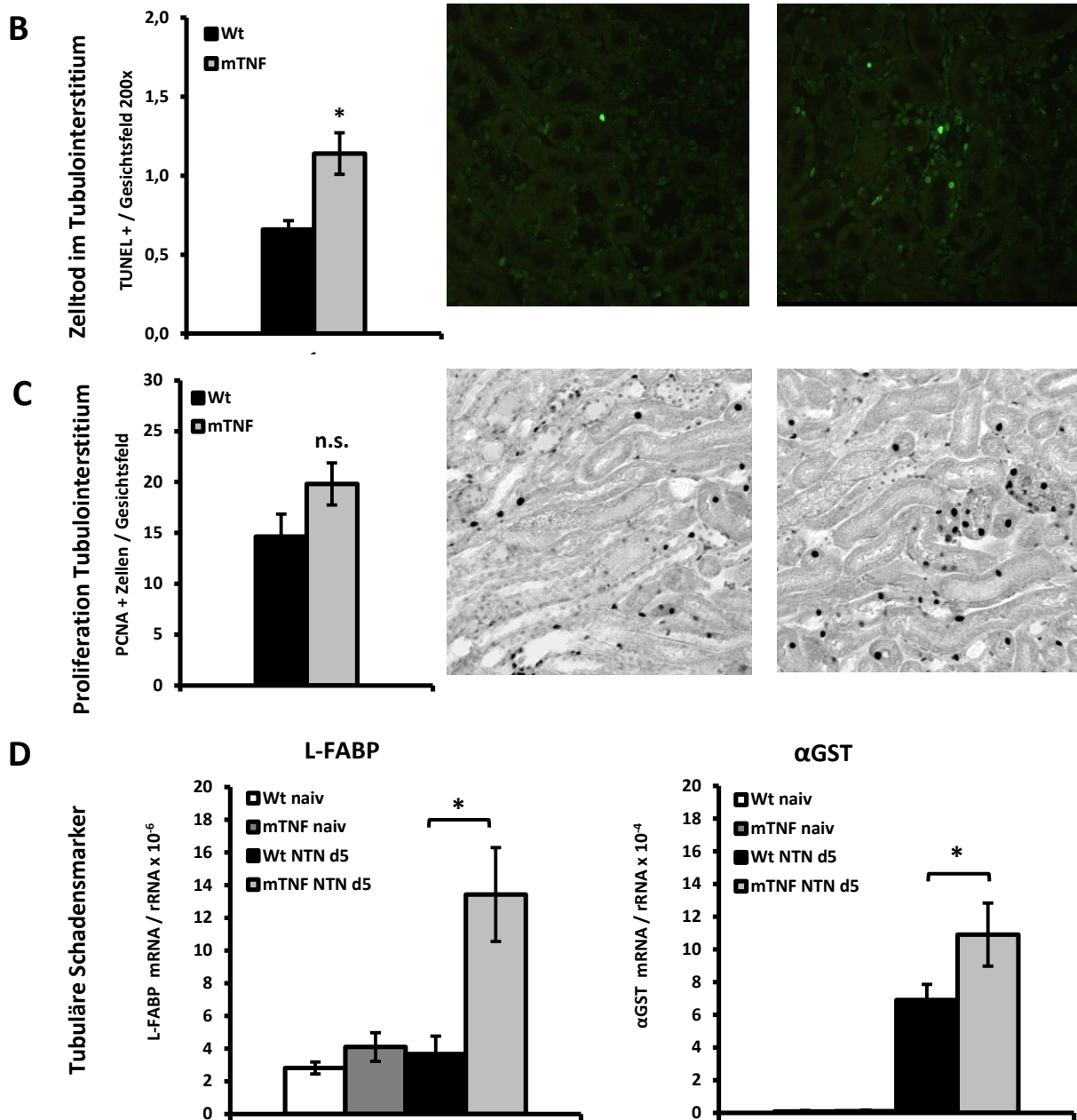


Abbildung 21: Evaluation des tubulointerstitiellen Schadens in Wildtyp- und mTNF-Mäusen.

Zur histologischen Auswertung des tubulointerstitiellen Schadens wurde in der PAS-Färbung ein morphometrischer Score für jedes Versuchstier bestimmt. Dabei wurde mithilfe eines Gitternetzes (9 x 13 Punkte), das über das Gesichtsfeld (400x) gelegt wurde, die Prozentzahl der für die Parameter Tubuläre Dilatation, Zylinder, Nekrose und hyaline Resorptionsvakuolen positiven Gitterpunkte an der Gesamtzahl der Gitterpunkte bestimmt (A). Es zeigte sich in allen Parametern kein Unterschied zwischen den Wildtyp- und den mTNF-Mäusen. Die Analyse des tubulointerstitiellen Zelltods in der TUNEL-Färbung (B) zeigte passend zur Untersuchung in den Glomeruli signifikant mehr Zelltod im Tubulointerstitium der mTNF-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. In der PCNA-positiven Zellproliferation (C) konnte kein signifikanter Unterschied, jedoch eine tendenzielle Verschlechterung in den mTNF-Mäusen gesehen werden. Dagegen zeigte die mRNA-Expression der tubulären Schadensmarker L-FABP und α-GST in der real-time PCR jeweils eine signifikant erhöhte Schädigung in den mTNF-Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe (D). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM, n = 5-8 je Gruppe, * p < 0,05, n.s. = nicht signifikant.

3.1.4. Nekroptose in nephritischen Nieren von Wildtyp- und mTNF-Mäusen

In der Evaluation des glomerulären Schadens an Tag 5 der heterologen NTN konnte in den mTNF-Mäusen ein schlechterer Schadens-Score, vermehrter glomeruläre Zelluntergang und Proliferation, sowie ein vermehrter glomerulärer Endothelzellschaden im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden. Daher erfolgten weitere Untersuchungen, welche molekularen Mechanismen für den Untergang der glomerulären Zellen in den mTNF-Mäusen verantwortlich sein könnten.

In den letzten Jahren wurde zunehmend die Rolle der Zelltodinduktion durch Formen der regulierten Nekrose insbesondere der sogenannten Nekroptose im Gegensatz zur bekannten Apoptose vor allem in der akuten Nierenschädigung wie beim Ischämie-Reperfusionsschaden [128] oder dem Kontrastmittel-induzierten akuten Nierenversagen [129] charakterisiert. Die beiden intrazellulären Kinasen RIP1 und RIP3 spielen bei der Induktion der Nekroptose eine essentielle Rolle und eine hohe Konzentration dieser Proteine ist mit einer vermehrt ablaufenden Nekroptose assoziiert [130]. Übereinstimmend mit der größeren Anzahl an TUNEL⁺-Zellen konnte in den Western Blot-Analysen aus Gesamtnierenlysat gezeigt werden, dass an Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN auch signifikant mehr RIP1 und tendenziell mehr RIP3 in den Gesamtnierenzellen der mTNF-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren vorhanden war (Abbildung 22 B, C). Dabei könnte die größere RIP1- und RIP3-Proteinkonzentration auf eine vermehrte ablaufende Nekroptose hindeuten, was sich in der Analyse des glomerulären Zelltods in den mTNF-Mäusen auch widerspiegelt. Dagegen ergaben sich in dieser Arbeit keine Hinweise, dass auch vermehrte Apoptose in den mTNF-Mäusen zu dem vermehrten Zelltod während der Nephritis beiträgt, da in der Western Blot-Analyse keine gespaltene und damit aktivierte Caspase 3 als Zeichen der ablaufenden Apoptose dargestellt werden konnte (Abbildung 22 A).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ging eine stärkere renale Gewebeschädigung in der NTN auch stets mit einer gesteigerten inflammatorischen Reaktion in der Niere in Form von höherer Zytokin- und Chemokin-Expression und mit einer vermehrten renalen Leukozyteneinwanderung einher [116, 131]. Ob auch die vermehrte renale Schädigung in mTNF-Mäusen mit einer gesteigerten Leukozytenakkumulation einherging, wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse der Nieren und immunhistologischen Färbungen für Leukozytenmarker untersucht.

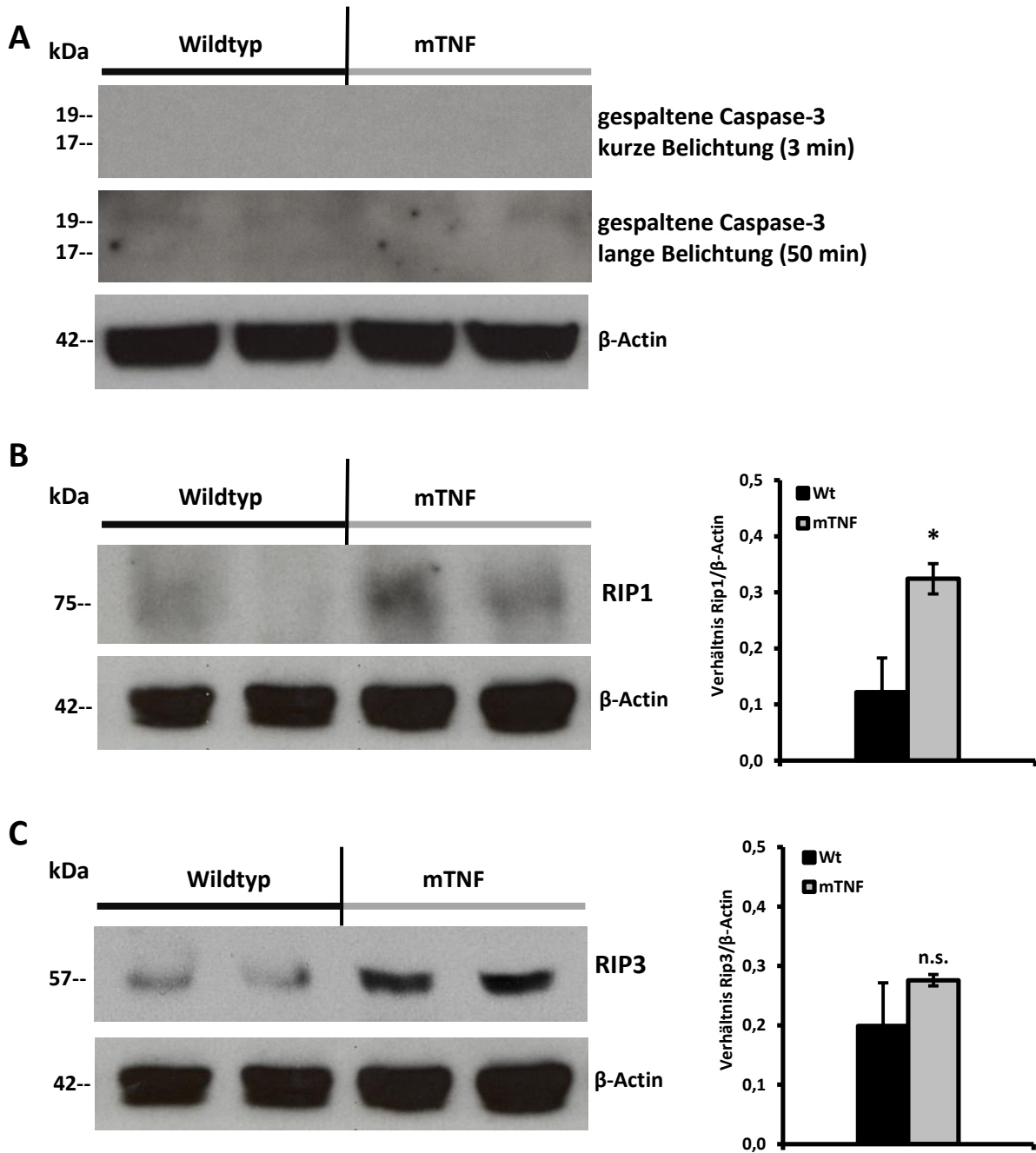


Abbildung 22: Western Blots für gespaltene Caspase-3, RIP1 und RIP3.

Zur Untersuchung der Apoptose wurde ein Western Blot für die gespaltene und damit aktivierte Caspase 3 aus Nierenlysat der Wildtyp- und mTNF-Mäuse angefertigt (A). Es konnte weder in den Wildtyp- noch in den mTNF-Nieren aktivierte Caspase 3 nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass während der heterologen NTN kein Zelltod in Form von Apoptose induziert wird. Zur Analyse des programmierten Zelltods in Form von Nekroptose wurden die beiden entscheidenden Mediatoren der Nekroptose, RIP1 und RIP3, im Nierenlysat der Wildtyp- und mTNF-Mäuse durch Western Blot nachgewiesen. (B) zeigt repräsentative Immunoblots für RIP1 und β -Actin jeweils in den Wildtyp- und mTNF-Mäusen. Es zeigte sich signifikant mehr RIP1 in den Nieren der mTNF-Mäuse im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Analog dazu wird in (C) der Western Blot für RIP3 und β -Actin gezeigt. Es ergab sich eine tendenziell höhere RIP3-Expression in den Nieren der mTNF-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp. Das Signifikanzniveau wurde jedoch aufgrund der großen Streuung in den Wildtyp-Mäusen nicht erreicht. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, n = 3-4 je Gruppe, * p < 0.05 vs. Wildtyp-Mäuse.

3.1.5. Renale Leukozyteninfiltration in der heterologen NTN

Um zu überprüfen, ob der größere funktionelle und morphologische Schaden in mTNF-Mäusen auch mit einer stärkeren Entzündungsreaktion korrelierte, wurde die renale Infiltration von CD45⁺-Leukozyten, T-Lymphozyten, Neutrophile und mononukleäre Phagozyten mithilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert und nachfolgend in immunhistologischen Untersuchungen kompartimentspezifisch analysiert.

Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Untersuchung der renalen Leukozyteninfiltration in Wildtyp- und mTNF-Mäusen erfolgte am 5. Tag der heterologen NTN (siehe Kapitel 2.4.1). Vor Induktion der NTN zeigten sowohl naive Wildtyp- als auch naive mTNF-Mäuse eine ähnliche basale Anzahl residenter CD45⁺-Leukozyten von 4,5% bzw. 5,5 %. In nephritischen Nieren an Tag 5 der NTN stieg der Prozentsatz der renalen Leukozyten in den Wildtyp-Mäusen mit 17,4% der Gesamtnierenzellen um das 3,9-fache an, wohingegen dieser Anstieg in den mTNF-Mäusen mit 10,7% überraschenderweise signifikant geringer ausfiel (Abbildung 23 A).

Auch bei den CD3⁺ T-Lymphozyten zeigte sich in den mTNF-Mäusen eine signifikant geringere Zellinfiltration im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen an Tag 5 der NTN. Dabei stieg die Anzahl der CD3⁺-Lymphozyten und der CD4⁺-T-Zellen in den Wildtyp-Mäusen um das 2,2- bzw. 3,1-fache im Vergleich zu den naiven Tieren an, wohingegen die Anzahl dieser Zellen in den mTNF-Mäusen gleich blieb oder nur leicht anstieg. Bei den CD8⁺-T-Zellen zeigte sich weder ein signifikanter Anstieg im Verlauf der NTN, noch ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Abbildung 23 B).

Des Weiteren wurde eine verminderte renale Akkumulation monozytärer Phagozyten in den nephritischen mTNF-Mäusen festgestellt. Zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der unterschiedlichen Phagozyten wurden die Oberflächenmarker CD11c und F4/80 verwendet. In den Nieren der mTNF-Mäuse war die Zahl der monozytären Phagozyten und deren Subpopulationen (CD11c⁻, CD11c⁺F4/80⁻ und CD11c⁺F4/80⁺ dendritische Zellen, CD11c⁻F4/80⁺ Makrophagen) analog zu den Gesamtleukozyten und den Lymphozyten signifikant um ein Drittel geringer als in die Wildtyp-Mäusen (Abbildung 23 C).

Im Gegensatz dazu ließ sich bei den Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten nur eine tendenzielle, jedoch nicht signifikant verminderte Zellzahl in nephritischen mTNF-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp an Tag 5 der NTN feststellen (Abbildung 23 C).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie, dass die Gesamtleukozyten, T-Lymphozyten und monozytären Phagozyten in den Nieren der mTNF-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen an Tag 5 nach Induktion der NTN trotz verstärkter renaler Schädigung signifikant vermindert waren. Dies ist insofern eine interessante Beobachtung, da im NTN-Modell die renale Gewebeschädigung in der Regel mit dem Ausmaß der renalen Leukozytenakkumulation korreliert und daher in mTNF-Mäusen eine vermehrte Leukozytenzahl zu erwarten war.

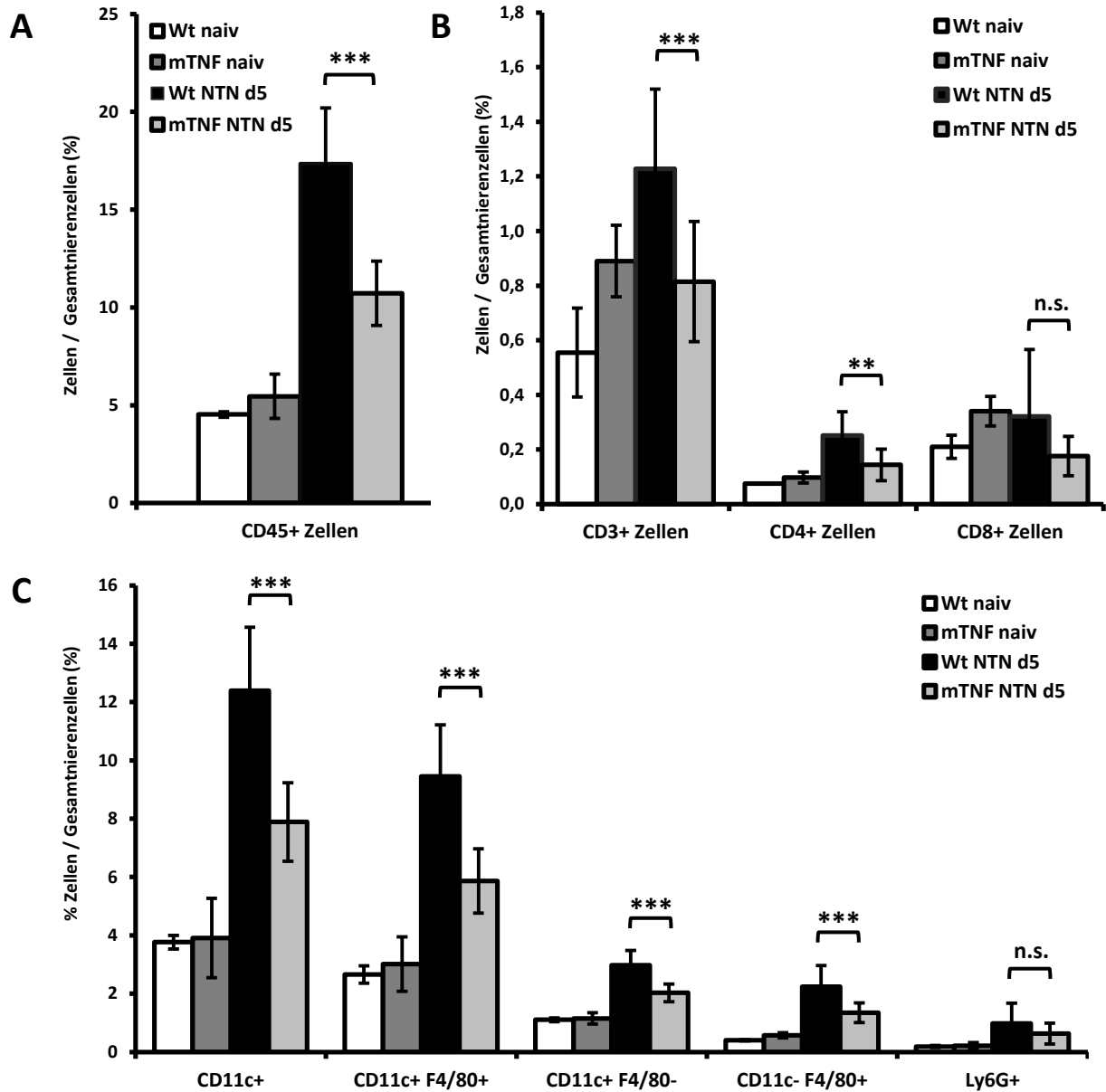


Abbildung 23: Renale Leukozyteninfiltration an Tag 5 der NTN (Durchflusszytometrie).

Der Anteil von Leukozyten an den Gesamtnierenzellen wurde mittels Durchflusszytometrie aus Gesamtnierengewebe am Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN bestimmt. Der Anteil der CD45⁺-Zellen an den Gesamtnierenzellen wird in Prozent angegeben. Die Leukozytenzahl in Nieren aus naiven Wildtyp- und mTNF-Mäusen sind zum Vergleich dargestellt. Die nephritischen mTNF-Tiere zeigen signifikant weniger renale infiltrierende Leukozyten im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe (A). Die Infiltration von CD3⁺-T-Lymphozyten und CD4⁺-T-Helferzellen zeigt sich in den mTNF-Tieren im Vergleich zur Wildtypgruppe signifikant erniedrigt (B). Auch die infiltrierenden CD11⁺-dendritischen Zellen und die F4/80⁺-Makrophagen sind in der mTNF-Gruppe signifikant vermindert (C). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD, n = 11-13 je Gruppe. ** p < 0.01, *** p < 0.001, n.s. = nicht signifikant vs. Wildtyp-Mäuse.

Leukozytenzählung in der Immunhistochemie

In der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass in den mTNF-Mäusen signifikant weniger Leukozyten, T-Lymphozyten und mononukleäre Phagozyten in die nephritischen Nieren einwandern als in den Wildtyp-Mäusen. Um diese Ergebnisse direkt im Gewebe zu bestätigen und eine kompartimentspezifische Analyse der infiltrierten Leukozyten durchzuführen, wurden die Zellen zusätzlich immunhistologisch angefärbt und quantifiziert. Es wurden die Ly6G⁺-neutrophilen Granulozyten und die CD3⁺ T-Lymphozyten im Glomerulus und im Tubulointerstitium getrennt quantifiziert. Zusätzlich wurde die Zahl der Mac2⁺-Makrophagen im Glomerulus zwischen den beiden Versuchsgruppen verglichen und die F4/80⁺-Färbung im Tubulointerstitium als Maß für die tubulointerstitielle Makrophageninfiltration ausgewertet.

Im mTNF-Genotyp zeigte sich eine im Vergleich zur Durchflusszytometrie auch signifikant niedrigere Infiltration von Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten, sowohl im Glomerulus wie auch im Tubulointerstitium an Tag 5 nach Induktion der NTN (Abbildung 24 A, B). Der in der Immunhistologie jetzt signifikante Unterschied ist methodisch begründbar. Während in die Auswertung der Immunhistochemie nur Zellen in Glomeruli und Tubulointerstitium des Nierenkortexes ausgewertet werden, wird bei der Durchflusszytometrie das Gesamtnierengewebe einschließlich Nierenmedulla erfasst. Die Leukozyteninfiltration bei einer Nephritis wie der NTN wird jedoch im Wesentlichen durch die Einwanderung in das geschädigte glomeruläre und tubulointerstitielle Kompartiment im Kortex bedingt, was bei der Immunhistochemie spezifischer erfasst wird.

Zur Untersuchung der einwandernden Makrophagen wurde im Glomerulus die Mac2-Färbung und im Tubulointerstitium die F4/80-Färbung verwendet, da glomeruläre Makrophagen eine nur unzureichende F4/80-Expression aufweisen, die nicht ausreichend in der Immunhistochemie nachzuweisen ist [132]. Es zeigte sich analog zu den neutrophilen Granulozyten sowohl in den Glomeruli, als auch im tubulointerstitiellem Kompartiment ein signifikant erniedrigter renaler Makrophageninflux in den mTNF-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen mit NTN (Abbildung 24 C, D).

Im Kontrast zur Durchflusszytometrie waren die infiltrierenden CD3⁺-Lymphozyten in der Immunhistologie der mTNF-Mäuse im Glomerulus und im Tubulointerstitium nur tendenziell, aber nicht signifikant im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren verringert (Abbildung 24 E,

F). Dies lässt sich eventuell mit dem relativ geringen Anteil mit 1% CD3⁺-Lymphozyten an den Gesamtnierenzellen und ihre sehr geringe Anzahl von im Durchschnitt 0,1-0,2 positive Zellen/Glomerulus in der Immunhistologie erklären.

In der Zusammenfassung bestätigen die Ergebnisse der Immunhistologie die Daten der durchflusszytometrischen Untersuchung mit einer geringeren renalen Leukozyteninfiltration in den mTNF-Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe. Dabei waren in beiden Kompartimenten weniger neutrophile Granulozyten als in den Wildtyp-Mäusen zu finden. Auch die Anzahl der Makrophagen war im Glomerulus und Tubulointerstitium signifikant niedriger in den mTNF- im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Bei den T-Lymphozyten zeigte sich im Glomerulus und Tubulointerstitium übereinstimmend mit den durchflusszytometrischen Daten eine tendenziell, jedoch nicht signifikant verminderte Infiltration.

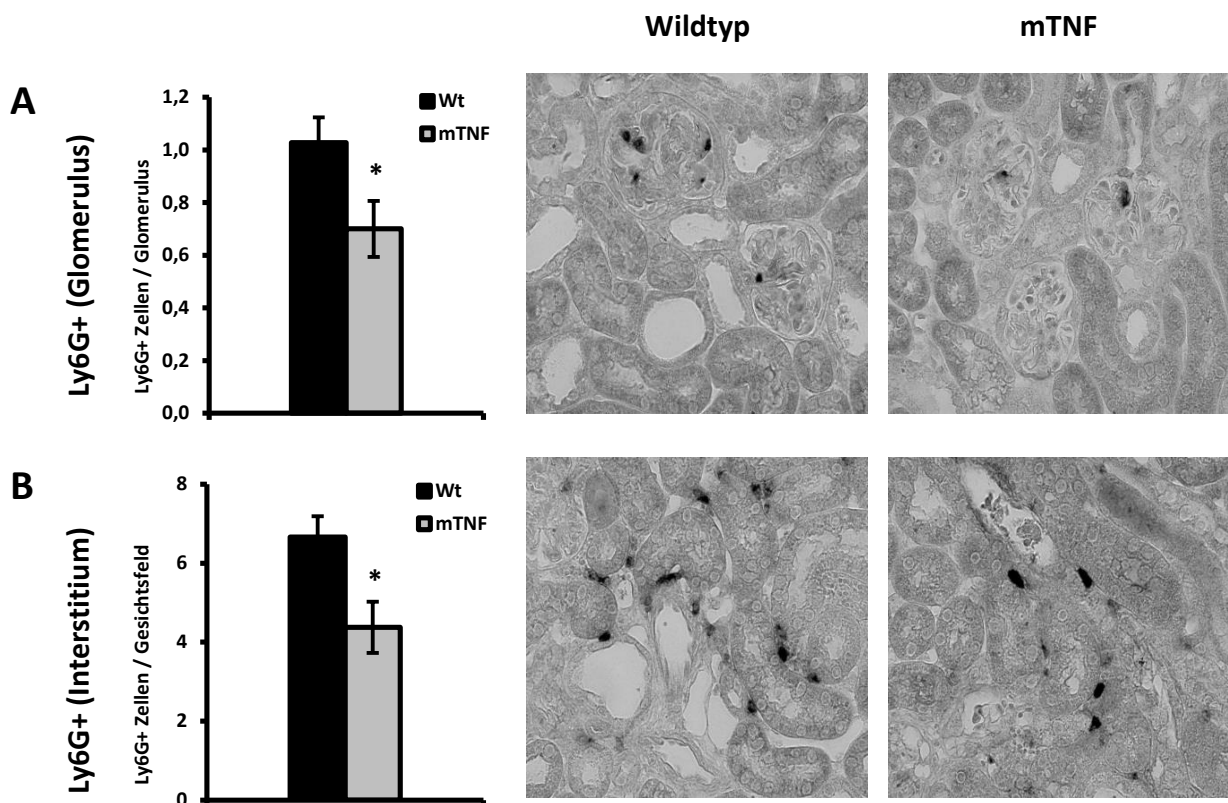


Abbildung 24: Fortsetzung nächste Seite.

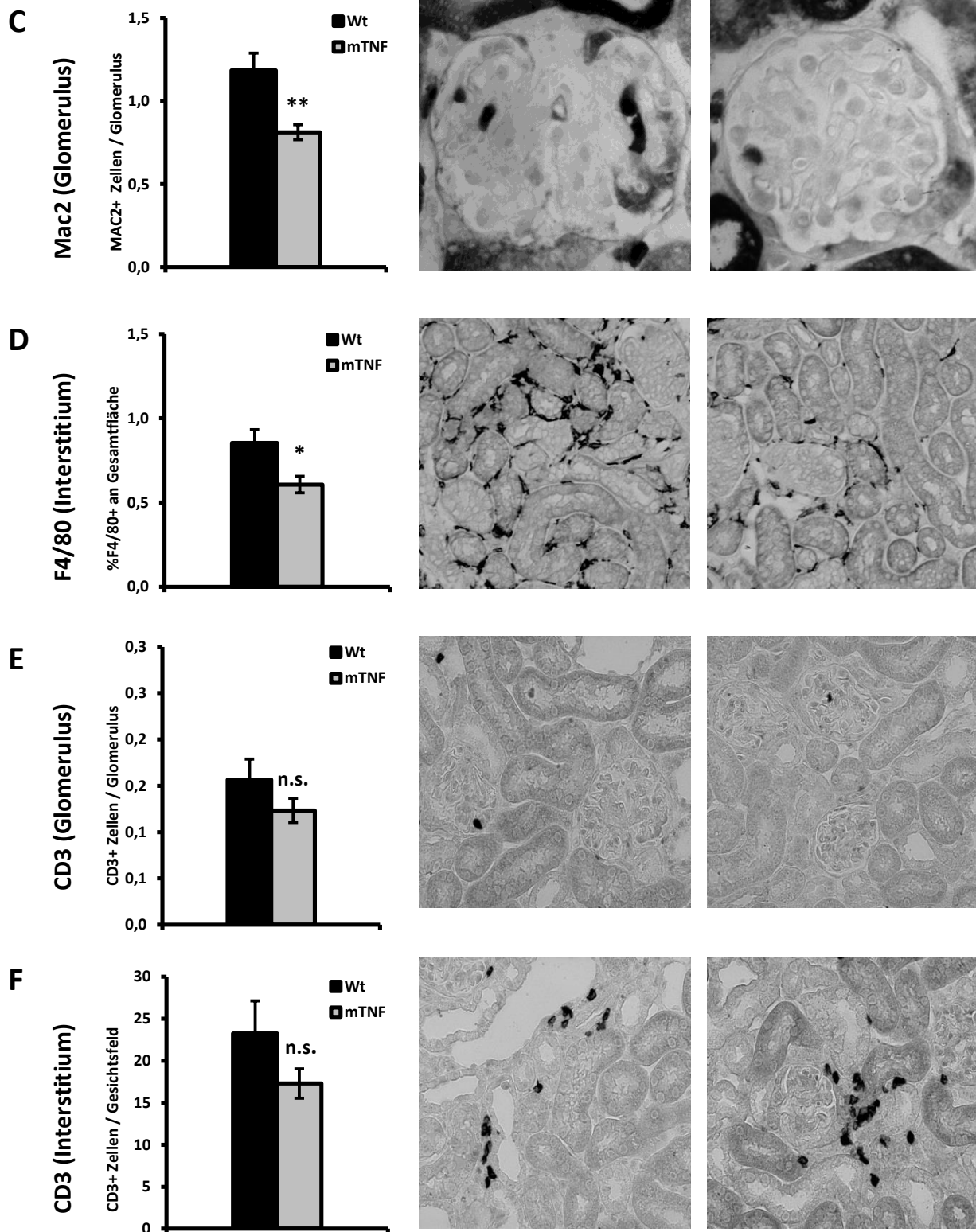


Abbildung 24: Glomeruläre und tubulointerstitielle Infiltration unterschiedlicher Leukozytenpopulationen an Tag 5 der heterologen NTN.

Bei der immunhistologischen Untersuchung der Ly6G⁺ Granulozyten und der CD3⁺ Lymphozyten wurden die gefärbten Zellen für die glomeruläre Fraktion in 25 Glomeruli/Niere (= 50 Glomeruli/Maus) oder für das Tubulointerstitium in 2 x 10 Gesichtsfeldern/Maus bei 400x

Vergrößerung ausgezählt. Die glomerulären Makrophagen wurden als Mac2⁺ Zellen im Glomerulus bestimmt. Der Anteil der F4/80⁺ Fläche in einem Gesichtsfeld bei 400x Vergrößerung diente zur Quantifizierung der tubulointerstitiellen Makrophagen. Die Ly6G⁺ Granulozyten waren sowohl im glomerulären wie auch im tubulointerstitiellen Kompartiment in den mTNF-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen verringert (A, B). Auch die Makrophagen in den mTNF-Mäusen zeigten sich in den Glomeruli (Mac2⁺) und im Tubulointerstitium (F4/80⁺) vermindert (C, D). Bei den CD3⁺-Lymphozyten ließen sich in beiden Kompartimenten tendenziell niedrigerer Werte in den mTNF-Mäusen zwischen den beiden Gruppen feststellen (E, F). Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM, n = 6 bis 8 je Gruppe, * p < 0,05, n.s. = nicht signifikant vs. Wildtyp-Gruppe.

3.1.6. Frühe mTNF-abhängige Effekt im Modell der heterologen NTN

Die Untersuchung der Leukozyteninfiltration zeigte an Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen mit deutlich weniger infiltrierenden, renalen Leukozyten in den mTNF-Mäusen. Diese Ergebnisse stehen in auffälligem Kontrast zur gleichzeitigen Verschlechterung der funktionellen Parameter und der renalen Gewebeschädigung in mTNF-Mäusen. In der Literatur sind die einwandernden Leukozyten, vor allem neutrophile Granulozyten, einer der Faktoren der glomerulären Schädigung in Modellen der akuten Glomerulonephritis [133-135]. Dabei zeigte sich eine sehr frühe Leukozyteneinwanderung in den Glomerulus bereits wenige Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis [133]. Um zu untersuchen, ob auch zu diesem frühen Zeitpunkt in mTNF-Mäusen eine Verschlechterung der heterologen NTN bei gleichzeitig verminderter renaler Leukozyteninfiltration auftritt, erfolgte eine ergänzende Phänotypanalyse 2 Stunden nach der Injektion des nephrotoxischen Serums.

Funktionelle Nierenparameter

Auch bereits 2 Stunden nach Induktion der heterologen NTN zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine um den Faktor 1000 erhöhte Albuminurie im Vergleich zu naiven Wildtyp und mTNF-Tieren, was auf eine akute Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere hinweist (Abbildung 25 A). Dabei zeigte sich nach 2 Stunden kein signifikanter Unterschied in der Albuminurie zwischen den mTNF- und den Wildtyp-Mäusen. Im Kontrast dazu war in der Messung der Serumchemie ein signifikant höherer Serumharnstoff von 71 mg/dl in den mTNF-Mäusen gegenüber 52 mg/dl in den Wildtyp-

Mäusen zu sehen (Abbildung 25 B). Dies deutet auf eine sehr frühe Verschlechterung der heterologen NTN durch membranständiges TNF, in Abwesenheit von löslichem TNF, hin.

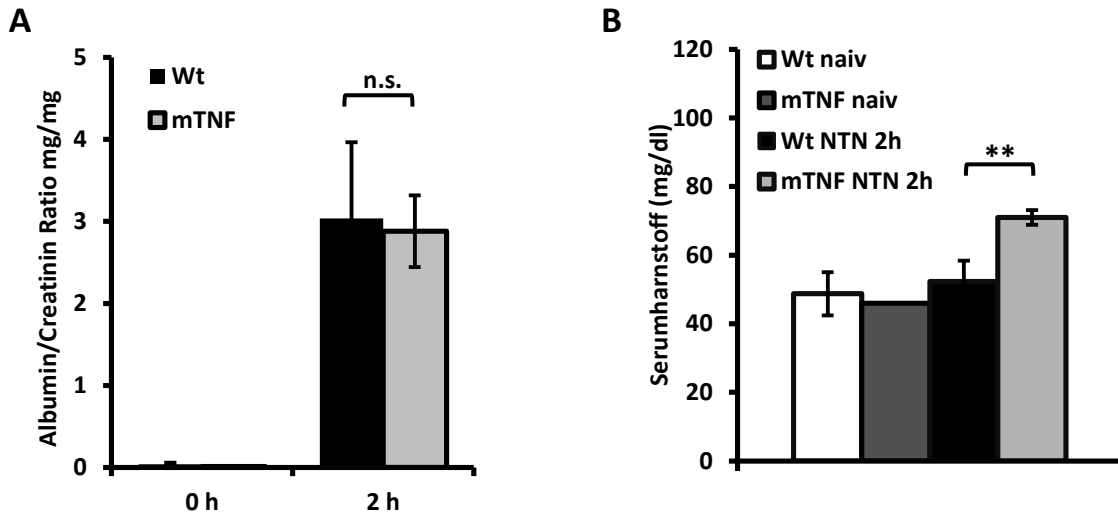


Abbildung 25: Funktionelle Nierenparameter 2 Stunden nach Induktion der heterologen NTN.

Die Albuminurie wurde in Wildtyp- und mTNF-Tieren mittels ELISA im Spontanurinproben gemessen und durch die Kreatininwerte der jeweiligen Urinprobe normiert. Die Albuminurie vor Induktion (0 h) zeigt normale, kaum detektierbare Werte. Bereits zwei Stunden (2h) nach Induktion stieg die Albuminurie vergleichbar sowohl in den Wildtyp- als auch in den mTNF-Tieren um mehr als das Tausendfache an. (A) Die Serumharnstoffwerte stiegen 2 h nach Induktion bei den mTNF-Tieren um mehr als ein Drittel des Ausgangswertes naiver Tiere. Bei den Wildtyp-Mäusen blieb das Niveau auf dem der unbehandelten Tiere (B). Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM für A und \pm SD für B, $n = 4$ je Gruppe, ** $p < 0.01$, n.s. = nicht signifikant vs. Wildtyp-Kontrolltiere.

Frühe renale Leukozyteninfiltration in der heterologen NTN

Die erhöhten Serumharnstoffwerte in den mTNF-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren 2 Stunden nach Induktion der NTN, weisen auf eine verstärkte frühe renale Schädigung hin, die mit einer größeren Anzahl infiltrierender renaler Leukozyten korrelieren könnte. Dies wurde 2 Stunden nach Induktion der NTN durch eine durchflusszytometrische Analyse untersucht.

Allerdings zeigte sich passend zu den Ergebnissen der Leukozyteneinwanderung nach 5 Tagen auch schon nach 2 Stunden eine geringere Anzahl von CD45⁺-Leukozyten in den mTNF-Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe (Abbildung 26). Im Gegensatz zum späteren Zeitpunkt sind nach 2 Stunden vor allem die Ly6G⁺-neutrophilen Granulozyten signifikant in den nephritischen Nieren der mTNF-Mäusen vermindert. Bei den T-

Lymphozyten und monozytäre Phagozyten war zu diesem frühen Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festzustellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die ausschließlich membranständige Expression von TNF im Verlauf der heterologen NTN bereits früh zu einer Verschlechterung führt, obwohl gleichzeitig eine frühe und anhaltende Verringerung der renalen Leukozyteninfiltration vorliegt.

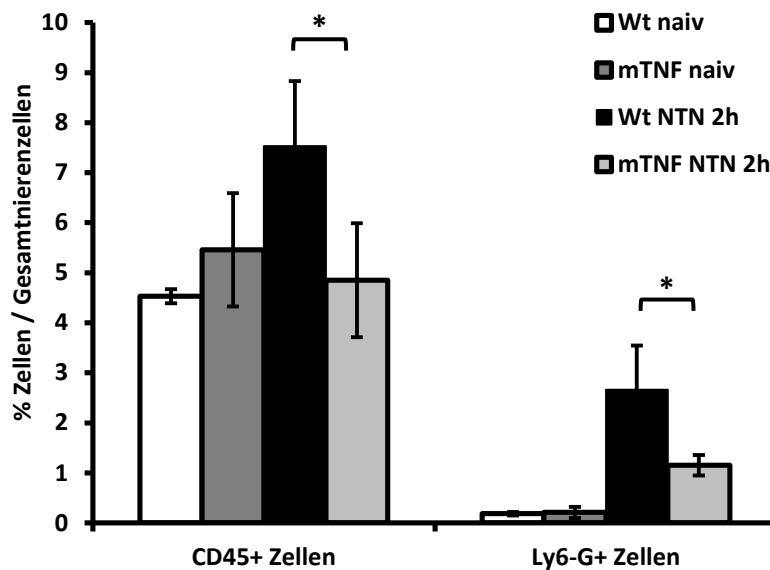


Abbildung 26: Frühe renale Leukozyteninfiltration in der Durchflusszytometrie.

Der Anteil von Leukozyten an den Gesamtnierenzellen wurde mittels Durchflusszytometrie aus Gesamtnierengewebe 2 Stunden nach Induktion der heterologen NTN bestimmt. Die mTNF-Tiere zeigen bereits nach 2 Stunden signifikant weniger in die Niere infiltrierende Leukozyten als die Wildtyp-Gruppe. Dabei war die renale Infiltration von Ly6G⁺ Granulozyten in den mTNF-Tieren im Vergleich zur Wildtypgruppe signifikant erniedrigt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD, n=4 je Gruppe. * p < 0,05 vs. Wildtyp-Mäuse.

3.1.7. Zytokin- und Chemokin mRNA-Expression im Gesamtnierengewebe

Um eine Erklärung für die in den mTNF-Mäusen erniedrigte renale Leukozyteninfiltration zu finden, wurde im Folgenden eine Analyse der in der Gesamtniere exprimierten mRNA von verschiedenen Entzündungsmediatoren durchgeführt. Die Migration von Leukozyten in geschädigtes Gewebe wird unter anderem von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen vermittelt. Außerdem spielt die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen eine wichtige Rolle beim Übertritt der Leukozyten in entzündetes Gewebe.

Eine verringerte Anzahl an einwandernden Leukozyten trotz verstärkter renaler Schädigung in den mTNF-Mäusen könnte daher durch eine geringere renale Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen in den mTNF-Mäusen im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen verursacht sein.

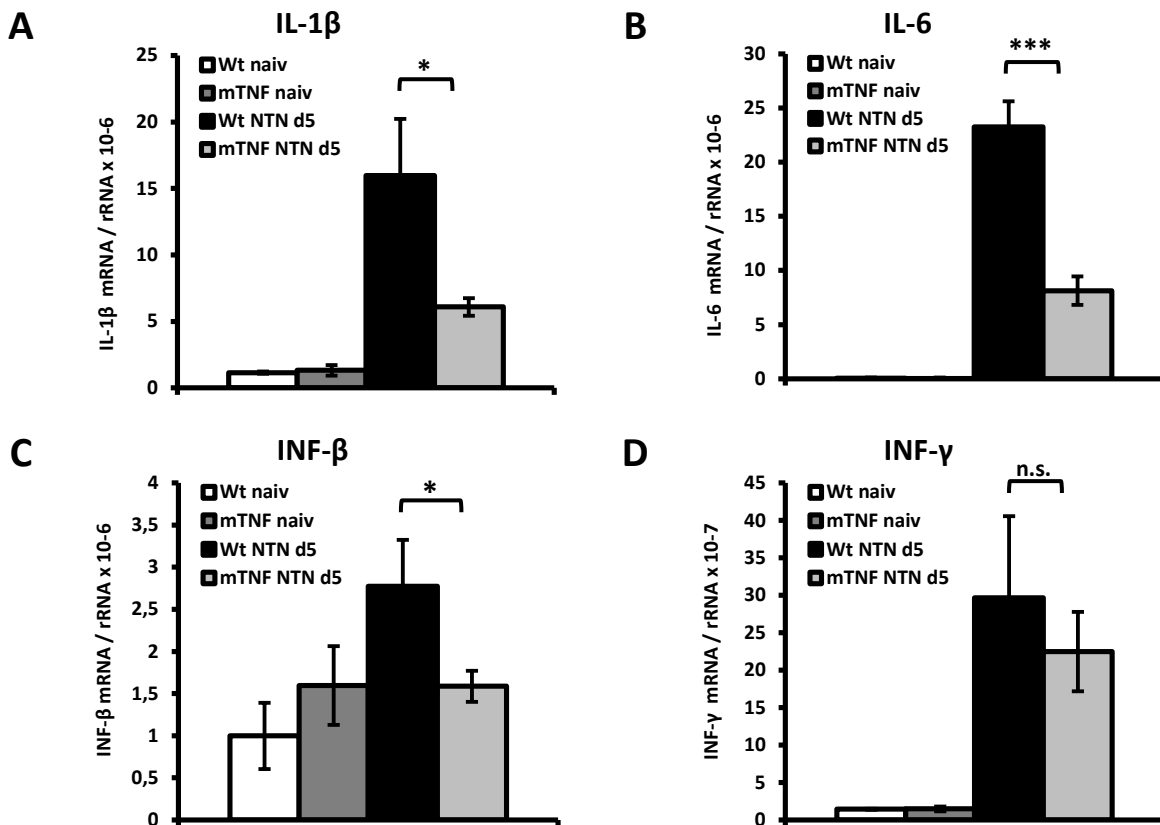
Diese Hypothese wurde durch Analyse der mRNA-Expression entzündlicher Mediatoren an Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN im Gesamtnierengewebe der beiden Versuchstiergruppen untersucht. Bei den Zytokinen wurde dabei der Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Interferon- β (IFN- β) und Interferon- γ (IFN- γ) gemessen. In der Gruppe der proinflammatorischen Chemokine erfolgte die Expressionsanalyse von CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL5 und CXCL10, außerdem wurden die Adhäsionsmoleküle Selektin-E und VCAM-1 untersucht.

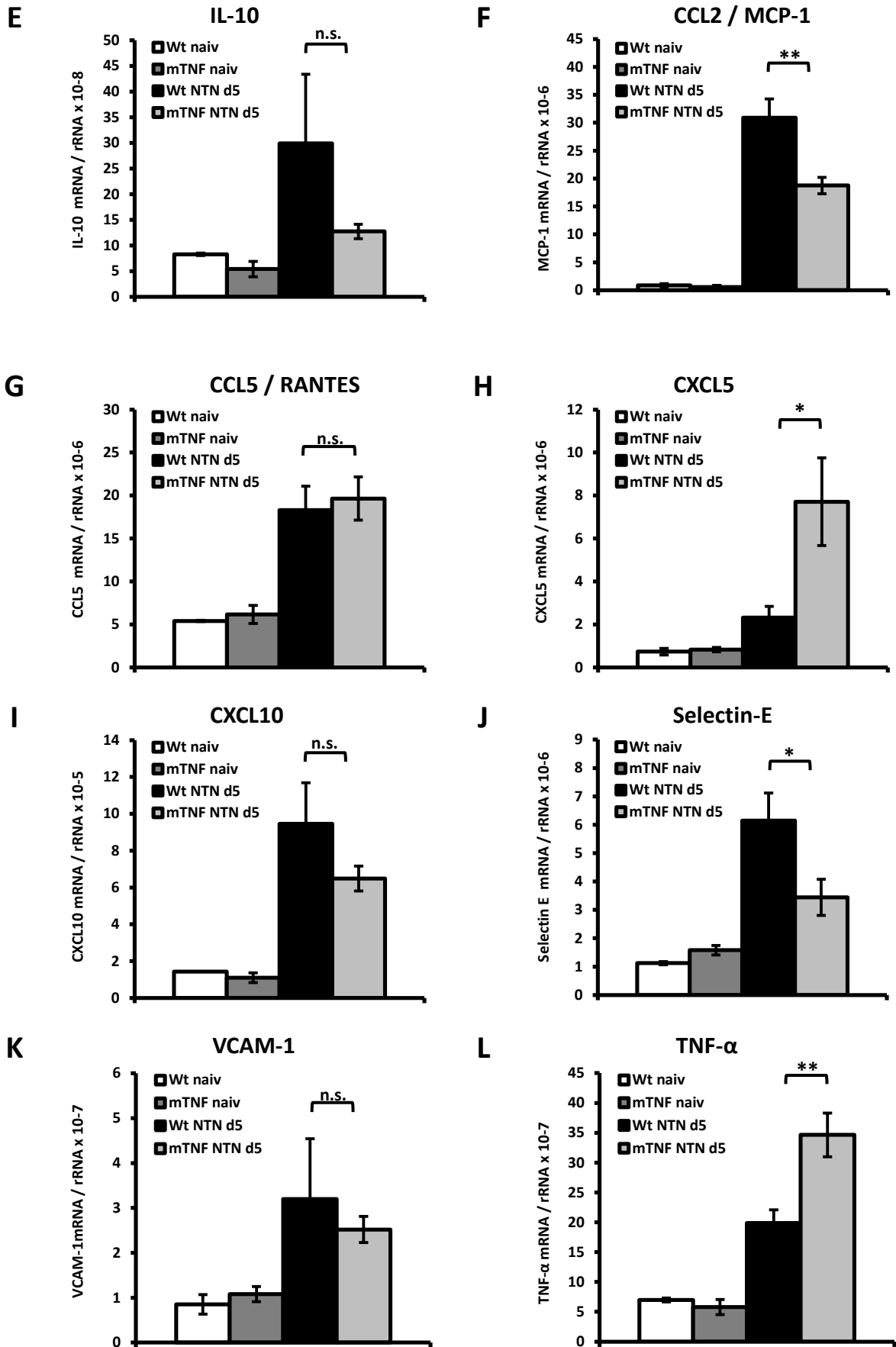
Korrelierend zur geringeren Leukozyteninfiltration zeigte sich für die Zytokine IL-1 β , IL-6 und IFN- β eine signifikant verminderte, für IFN- γ eine tendenziell verminderte mRNA-Expression in den nephritischen Nieren der mTNF-Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Abbildung 27 A-D). Auch das im Rahmen der Immunantwort induzierte antiinflammatorische IL-10 wurde in den mTNF-Nieren tendenziell vermindert exprimiert (Abbildung 27 E). Weiterhin waren das untersuchte proinflammatorische Chemokin CCL2/MCP-1 und das Adhäsionsmolekül Selektin-E, welche beide eine wichtige Rolle bei der Einwanderung von Leukozyten spielen, signifikant weniger in den mTNF-Mäusen exprimiert (Abbildung 27 F, G). Auch die Expression des Chemokins CXCL10 und des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 war in den mTNF-Mäusen tendenziell niedriger als in den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 27 I, K). Bei dem für die Lymphozyteninfiltration wichtigen Chemokin CCL5/Rantes konnte allerdings kein Expressionsunterschied festgestellt werden (Abbildung 27 F). Als einziges untersuchtes Chemokin zeigte CXCL5 in den mTNF-Mäusen eine signifikant höhere mRNA-Expression im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 27 H). CXCL5 ist *in vivo* für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich, die allerdings an Tag 5 der NTN dennoch in mTNF-Nieren reduziert waren.

Entgegengesetzt dazu waren die Ergebnisse der mRNA-Expression von TNF in den mTNF-Mäusen signifikant gegenüber der Wildtyp-Gruppe erhöht, was angesichts der erniedrigten Expression der anderen Zytokine nicht zu erwarten war (Abbildung 27 L). Andererseits lässt sich die erhöhte TNF-Expression eventuell mit dem Ausfall der löslichen TNF-Antwort und

mit dem dadurch wegfallenden negativen Feedback-Mechanismus erklären. Dagegen zeigte sich keine unterschiedliche renale Expression der beiden TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 in Wildtyp- und mTNF-Mäusen (Abbildung 27 M, N)

In Zusammenschau der Ergebnisse der PCR-Untersuchung zeigte sich eine geringere renale mRNA-Expression von verschiedenen durch TNF induzierten Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmoleküle, welche gut mit der geringeren renalen Leukozyteninfiltration in den mTNF-Mäusen in Einklang zu bringen ist. Die meisten der in den mTNF-Mäusen vermindert exprimierten Gene werden durch den Transkriptionsfaktor NFκB induziert, der nach Ligandenbindung an TNFR1 und auch TNFR2 aktiviert werden kann. Deshalb wurde im folgenden Abschnitt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors in den Nieren der Wildtyp- und mTNF-Mäuse untersucht.





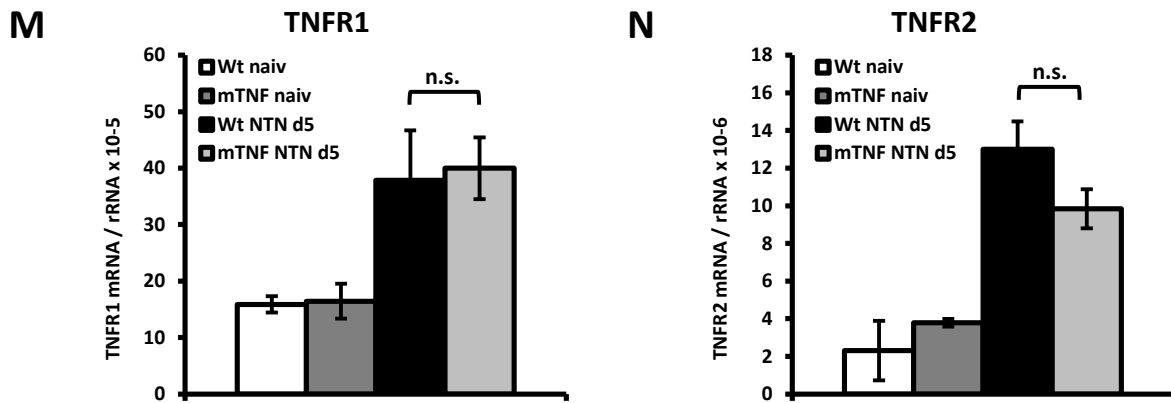


Abbildung 27: Renale mRNA-Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen an Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN.

Die renale mRNA-Expression wurde in RNA-Isolaten aus Gesamtnierengewebe gemessen und mit der Expression ribosomaler RNA normiert. In den mTNF-Mäusen war die renale mRNA-Expression der Zytokine IL-1 β , IL-6, IFN- β signifikant (A-C) und von IFN- γ und IL-10 tendenziell (D, E) reduziert. Auch das proinflammatorische Chemokin CCL2/MCP-1 wurde in mTNF-Nieren signifikant geringer als im Wildtyp exprimiert (F). Für die Expression von CCL5/Rantes ergab sich kein Expressionsunterschied (G) und für CXCL10 eine tendenziell erniedrigte renale Expression in den mTNF-Mäusen (I). Dagegen wurde CXCL5 in den mTNF-Mäusen signifikant stärker exprimiert (H). Im mTNF-Genotyp war die renale Expression der Adhäsionsmoleküle Selektin-E signifikant (J) und von VCAM-1 tendenziell (K) erniedrigt im Vergleich zu den Wildtypkontrollen. Bei TNF- α wurde eine verstärkte Expression im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen (L). Beide TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 zeigten keinen signifikanten Expressionsunterschied zwischen den nephritischen Nieren beider Genotypen (M, N). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM, n = 5 bis 6 je Gruppe, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, n.s. = nicht signifikant vs. Wildtyp-Mäuse.

3.1.8. Aktivierung des NF κ B-Signalwegs in Nieren von Wildtyp- und mTNF-Mäusen

Um Mechanismen für die geringere renale Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen und die damit einhergehende verminderte renale Infiltration von Leukozyten in den mTNF-Mäusen zu untersuchen, wurde die Aktivierung des NF κ B-Transkriptionsfaktors analysiert. Zuerst wurde die renale Genexpression bekannter Inhibitoren des NF κ B-Signalwegs, NF κ B-Inhibitor- α (I κ B- α) und TNF-induced protein 3 (TNFAIP3/A20) mittels *real-time* PCR quantifiziert und zwischen den beiden Versuchsgruppen verglichen. Beide Regulatoren werden durch NF κ B nach dessen Übertritt in den Zellkern induziert und führen zu einer negativen *Feedback*-Hemmung der NF κ B-Aktivierung, um eine überschießende inflammatorische Antwort zu verhindern [136]. Dadurch stellt ihre Expression einen indirekten Marker für NF κ B-Aktivierung dar. Beim Vergleich der beiden Genotypen fiel analog zur geringeren Expression von Zytokinen und

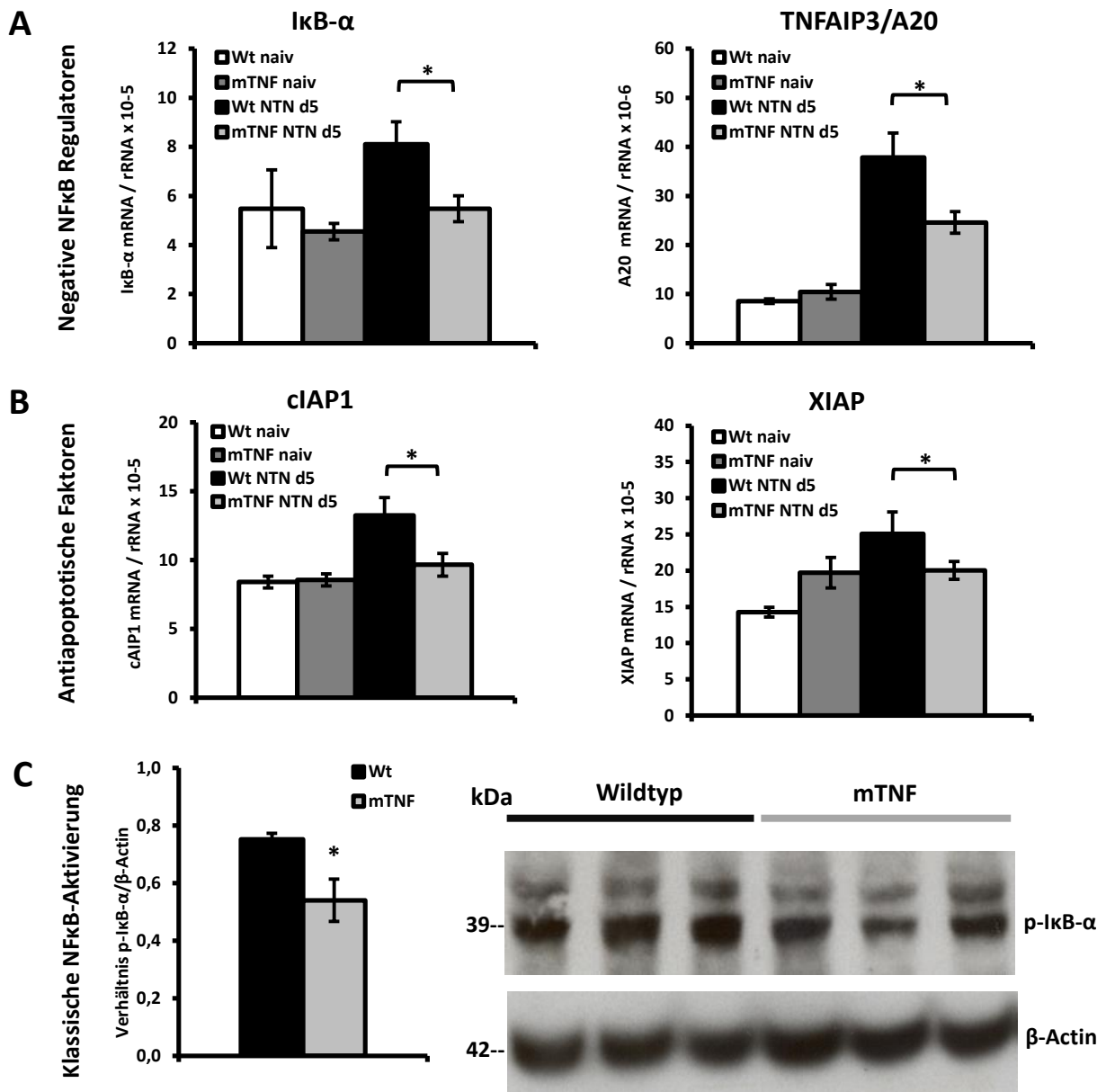
Chemokinen auch eine im Vergleich zum Wildtyp erniedrigten mRNA-Expression der beiden NF κ B-Regulatoren in den Nieren der mTNF-Mäuse auf, was als Hinweis für eine abgeschwächte NF κ B-Aktivierung gewertet werden kann (Abbildung 28 A). Die reduzierte TNFAIP3/A20-Expression in den nephritischen mTNF-Nieren mit entsprechend verminderter negativer *Feedback*-Hemmung kann auch gut die übersteigerte renale TNF mRNA-Expression in diesen Tieren (vgl. Abbildung 27 L) im Gegensatz zu anderen entzündlichen Zytokinen und Chemokinen erklären.

Die Untersuchung der Gen-Expression weiterer Faktoren, die durch NF κ B induziert werden kann, zeigte, dass auch die Expression NF κ B-assoziiierter antiapoptotischer Faktoren wie das *Cellular inhibitor of apoptosis protein* (cIAP1) und *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) in den Nieren der mTNF-Tiere niedriger ausfiel als in den Wildtyp-Tieren (Abbildung 28 B). Diese NF κ B-abhängigen Faktoren hemmen als Ubiquitinligasen die TNF-abhängige Induktion der Apoptose und Nekroptose [137]. Ihre verminderte Expression zeigt ebenfalls, dass in den mTNF-Mäusen eine geringere renale NF κ B-Aktivierung stattfindet. Dies hat zur Folge, dass weniger antiapoptotische Faktoren produziert werden und damit ein proapoptotisches bzw. pronekroptotisches Milieu in der Zelle entsteht, das nach TNF-Stimulation zum Zelltod prädisponiert.

Um die geringere NF κ B-Aktivierung in den mTNF-Nieren auch auf Proteinebene zu bestätigen wurde der phosphorylierte NF κ B-Inhibitor- α (I κ B- α) im Nierenlysat von Wildtyp und mTNF-Mäusen an Tag 5 der NTN mittels Western Blot bestimmt. Der I κ B- α hemmt in unstimulierten Zellen die klassische NF κ B-Aktivierung, indem er die Kernlokalisationssequenz an den Transkriptionsfaktoren blockiert. Werden TNF-Rezeptoren aktiviert, kommt es in der Folge zur Phosphorylierung von I κ B- α durch die I κ B- α -kinase (IKK), was I κ B- α dem proteosomalen Abbau zuführt und den Übertritt der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern erlaubt, wodurch die Transkription letztendlich startet [61]. Folglich zeigt eine vermehrte Phosphorylierung von I κ B- α eine stärkere Aktivierung des NF κ B-Signalwegs an [138, 139]. In den mTNF-Mäusen konnte durch Western Blot bestätigt werden, dass signifikant weniger I κ B- α im phosphoryliertem Zustand im renalen Zelllysat im Vergleich zum Wildtyp vorhanden ist, was auf eine geringere NF κ B-Aktivierung hinweist (Abbildung 28 C). Auch die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges war in den Nieren der mTNF-Mäusen tendenziell geringer im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Dies zeigte die tendenzielle, jedoch nicht

signifikante Verminderung des aktivierten NFκB2 Spaltprodukts p52 im Western Blot, das aus dem inaktiven Vorläufermolekül NFκB2 p100 abgespalten wird (Abbildung 28 D).

Die RNA-Daten zusammen mit der Bestätigung auf Proteinebene durch den Western Blot untermauern die These, dass die geringere renale Infiltration von Leukozyten auf eine niedrigere NFκB-abhängige Expression proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle zurückzuführen ist. In Abwesenheit von löslichem TNF und ausschließlicher Anwesenheit von membranständigem TNF erfolgt offenbar eine geringere Aktivierung des klassischen und womöglich auch des alternativen NFκB-Signalwegs.



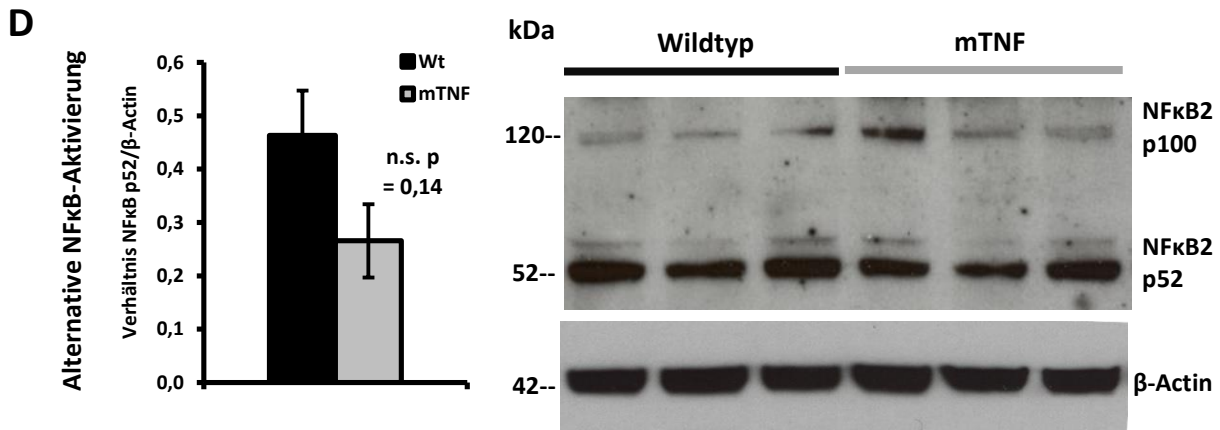


Abbildung 28: Renale NFκB-Aktivierung in Wildtyp- und mTNF-Mäusen an Tag 5 der NTN.

(A) Untersuchung der mRNA-Expression von negativen Regulatoren des NFκB-Systems, IκB-α und TNFAIP3/A20, in den Gesamtnieren der Wildtyp- und mTNF-Mäuse an Tag 5 der NTN. Die mRNA-Expression dieser Regulatoren wird durch den Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert, um eine überschießende Aktivierung zu verhindern. In den mTNF-Mäusen waren beide Regulatoren signifikant weniger im Vergleich zum Wildtyp exprimiert, was für eine geringere Aktivierung von NFκB spricht. (B) Auch die renale Expression der antiapoptotischen Faktoren cIAP1 und XIAP zeigte sich in den mTNF-Mäusen signifikant verringert. Diese Faktoren werden auch durch NFκB induziert und hemmen den TNF-assoziierten Zelltod in Form von Apoptose und Nekroptose. (C) Im Western Blot konnte eine geringere NFκB-Aktivierung an Tag 5 der NTN durch eine geringe Menge an phosphoryliertem IκB-α (p-IκB-α) im Nierenlysat der mTNF-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Die Menge an p-IκB-α wurde quantifiziert und im Verhältnis mit β-Actin dargestellt. (D) Auch eine tendenziell geringere Aktivierung des alternativen NFκB-Signalwegs konnte mittels Western Blot des Vorläufermoleküls NFκB2 p100 und des aktivierten Spaltprodukts p52 in den mTNF-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM, für (A) und (B) n = 6, sowie (C) und (D) n = 3; * p < 0,05 vs. Wildtyp-Mäuse, n.s. = nicht signifikant.

3.1.9. Zusammenfassung des Phänotyps der mTNF-Mäuse in der NTN

Die mTNF-Mäuse zeigen in der heterologen Phase der NTN nach 5 Tagen einen exazerbierten nephritischen Phänotyp mit vermehrter Mortalität, vermehrter Albuminurie und höheren Serumharnstoffwerten im Vergleich zu C57BL/6J Wildtyp-Kontrollmäusen. Passend dazu sind in der histopathologischen Untersuchung ein größerer morphologischer Schaden in den Glomeruli der mTNF-Mäuse, sowie mit vermehrten mRNA-Expression tubulärer Schadensmarker erste Anzeichen für eine stärkere tubuläre Schädigung nachweisbar.

Im Kontrast dazu zeigt sich in den mTNF-Mäusen eine deutlich niedrigere renale Infiltration von Gesamtleukozyten, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen und Lymphozyten in der Durchflusszytometrie. Dabei konnte die geringere Leukozyteninfiltration

in den transgenen Mäusen sowohl in den Glomeruli, als auch im Tubulointerstitium mittels immunhistologischer Färbung gezeigt werden. Der verschlechterte nephritische Phänotyp und die geringere Leukozyteneinwanderung waren bereits 2 Stunden nach Induktion der heterologen NTN in den mTNF-Mäusen zu sehen. Die geringere Einwanderung von proinflammatorischen Leukozyten ging auch mit einer verminderten mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Chemokinen in den Nieren der mTNF-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen einher. Dazu passend konnte eine geringere Aktivierung des proinflammatorischen NFκB-Signalweges in den Nieren der mTNF-Mäuse nachgewiesen werden, was mit einer erniedrigten Expression von negativen NFκB-Regulatoren und Inhibitoren des Zelltods assoziiert war. Zugleich waren die beiden Nekroptose-assoziierten Proteine RIP1 und RIP3 vermehrt, aber das Apoptose-assoziierte Protein aktivierte Capsase-3 nicht in den Nieren der mTNF-Mäuse nachzuweisen, was im Vergleich zum Wildtyp auf eine vermehrt ablaufende Nekroptose ohne Nachweis von Apoptose während der NTN hinweist.

Zusammenfassend zeigten die mTNF-Mäuse in der heterologen NTN funktional und morphologisch einen verstärkten Nierenschaden, obwohl gleichzeitig eine abgeschwächte Entzündungsreaktion in der Niere mit geringerer Leukozyteninfiltration und erniedrigter Produktion von proinflammatorischen Mediatoren ablief. Auf molekularer Ebene ließ sich dabei eine geringere Aktivierung des NFκB-Signalwegs in Verbindung mit vermehrt ablaufender Nekroptose nachweisen, was sowohl die abgeschwächte Entzündungsreaktion, wie auch die vermehrte Schädigung erklärt. Das Fehlen von sezerniertem löslichen TNF ist in den nephritischen Nieren der mTNF-Mäuse für die verminderte Entzündungsreaktion und Leukozytenakkumulation verantwortlich, während membranständiges TNF offenbar über direkte Zell-Zell-Interaktion renalen Zelltod vermittelt.

3.2. *In vitro*-Stimulation von isolierten Glomeruli und tubulointerstitiellem Gewebe

Wie in vorangegangenen *in vitro* Experimenten aus unserer Arbeitsgruppe gezeigt, kann TNF glomeruläre Zellen zur Ausschüttung einer großen Bandbreite an Zytokinen und Chemokinen stimulieren [113]. Im Modell der autologen NTN wurde bereits nachgewiesen, dass TNF-Produktion durch intrinsische Nierenzellen für die glomeruläre Schädigung und Halbmondbildung in diesem Modell verantwortlich ist [121]. Allerdings lässt sich aus der Analyse der heterologen NTN in mTNF-Mäusen *in vivo* nicht sicher beantworten, ob eine durch das Fehlen von löslichem TNF verminderte NFκB-Aktivierung und geringere Expression entzündlicher Mediatoren zu einer reduzierten Leukozyteninfiltration führt, oder ob eine reduzierte Zahl infiltrierender Leukozyten die verminderte renale Expression von Zytokinen und Chemokinen bedingt.

Um zu untersuchen, ob im mTNF-Genotyp primär eine geringere Zytokin- und Chemokinproduktion in intrinsische Nierenzellen vorliegt oder ob sie auf die geringere renale Leukozyteninfiltration zurückzuführen ist, wurden im Folgenden *in vitro* Stimulationsexperimente mit isolierten intakten Glomeruli und tubulointerstitiellem Gewebe von Wildtyp- und mTNF-Mäusen durchgeführt. Die Isolation der Nierenkompartimente erfolgte mithilfe eines isomagnetischen Verfahrens, wie in Kapitel 2.3 beschrieben. Zur Stimulation wurden jeweils 5000 Glomeruli und durch die Gesamtproteinmenge normiertes tubulointerstitielles Gewebe aus Wildtyp- und mTNF-Mäusen für 24 Stunden in Zellkultur kultiviert. Für weitere 24 Stunden wurde mit IL-1β stimuliert und anschließend die Konzentration von sezerniertem TNF, CCL2/MCP-1 und IL-6 im Zellkulturüberstand mittels ELISA und die Induktion der jeweiligen mRNA in lysierten Nierenzellen durch die quantitative PCR bestimmt. Für IL-1β wurde bereits eine wichtige pathophysiologische Rolle in der NTN beschrieben [123, 140].

3.2.1. TNF, CCL2/MCP-1 und IL-6 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit IL-1 β *in vitro*

Bei den *in vitro* Stimulationsexperimenten wurden kompartment-spezifisch isolierte Glomeruli und tubulointerstitielles Gewebe aus Wildtyp- oder mTNF-Tieren entweder mit 10 ng/ml IL-1 β oder als Kontrolle mit demselben Volumen PBS für 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurden in den Zellkulturüberständen die Konzentration von sezerniertem TNF, CCL2/MCP-1 und IL-6 gemessen.

In den stimulierten Glomeruli aus Wildtyp-Mäusen lag die Konzentration des sezernierten TNFs (im Mittel 19,7 pg/ml) um das 3,6-fache höher als in unstimulierten Kontrollen (im Mittel 5,5 pg/ml). Im Zellkulturüberstand der aus mTNF-Mäusen isolierten Glomeruli war sowohl in den unstimulierten Kontrollen als auch nach der Stimulation mit IL-1 β kein sezerniertes TNF nachweisbar (Abbildung 29 A). Damit bestätigt sich die Annahme, dass durch die transgene Veränderung des TNF-Gens keine regelrechte Abspaltung von membranösem zu löslichem TNF, das in das Zellkulturmedium abgegeben werden könnte, möglich ist. Im Tubulointerstitium zeigte sich beim Wildtyp keine erhöhte TNF-Sekretion nach IL-1 β Stimulation. Die TNF-Konzentration im Zellkulturüberstand von tubulointerstitiellem Gewebe aus mTNF-Mäusen lag ebenfalls unter der Nachweisgrenze des ELISA-Kits (Abbildung 29 B). Bei der Untersuchung des Chemokins CCL2/MCP-1 und des Zytokins IL-6 war eine deutliche Sekretionssteigerung nach Stimulation mit IL-1 β in aus Wildtyp-Mäusen isoliertem glomerulären und tubulointerstitiellem Gewebe zu sehen (Abbildung 29 C, D, E, F). Für CCL2/MCP-1 und IL-6 ließ sich nach der Stimulation auch eine im Vergleich zum unstimulierten Gewebe stark erhöhte CCL2/MCP-1- und IL-6-Sekretion in den Glomeruli und im Tubulointerstitium aus mTNF-Mäusen nachweisen. Interessanterweise wurde in den Glomeruli des mTNF-Genotyps eine signifikant geringere CCL2/MCP-1- und IL-6-Sekretion im Zellkulturüberstand im Vergleich zu den stimulierten Glomeruli aus Wildtyp-Tieren gemessen (Abbildung 29 C, E). Dagegen ließ sich im stimulierten Tubulointerstitium beider Versuchsgruppen keine deutlich gesteigerte CCL2/MCP-1- und IL-6-Sekretion nachweisen und kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die CCL2/MCP-1 und IL-6 Konzentrationen finden. (Abbildung 29 D, F)

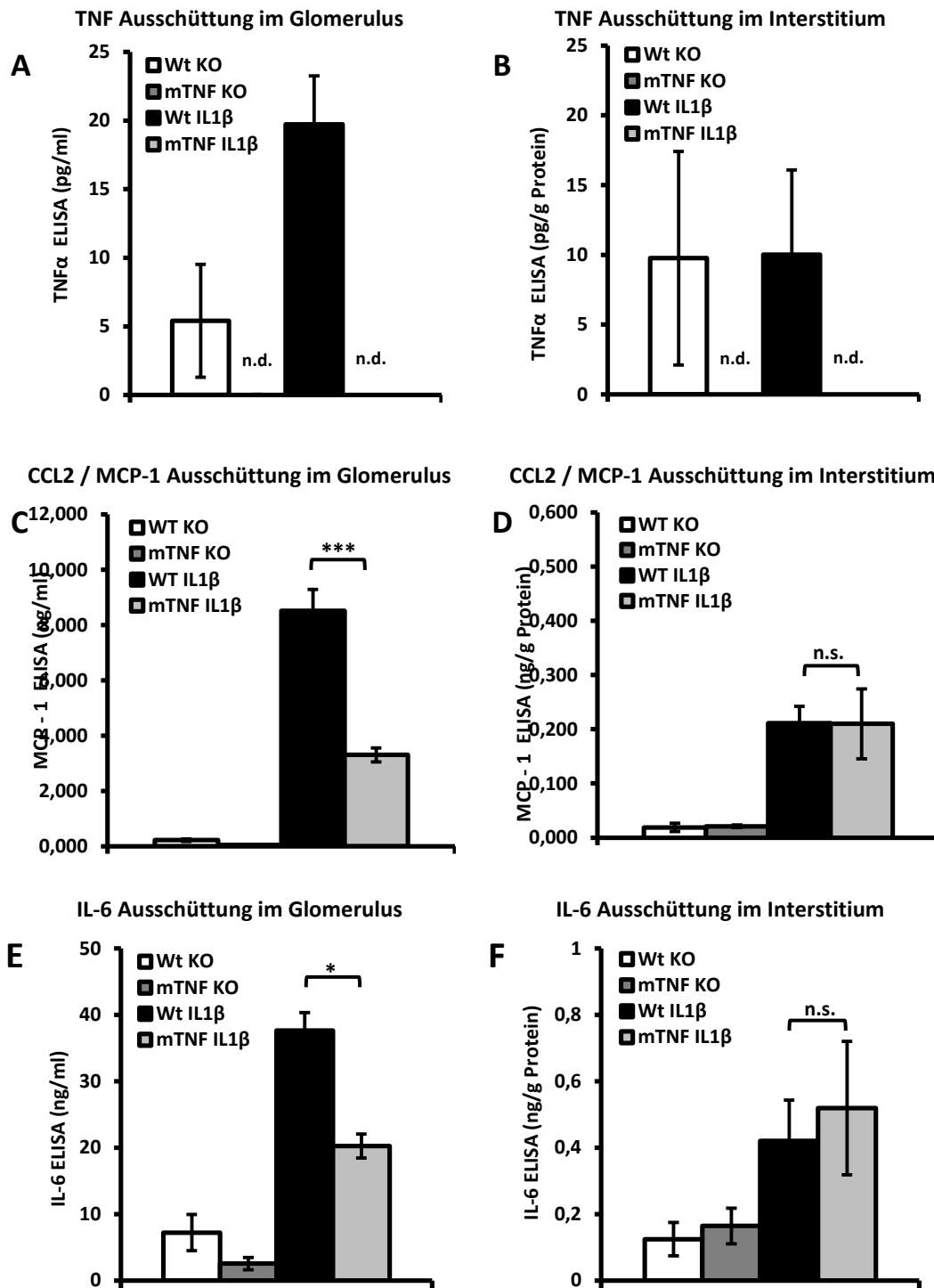


Abbildung 29: Kompartimentspezifische TNF, CCL2 / MCP-1, IL-6 Ausschüttung nach Stimulation mit IL-1β Stimulation *in vitro*.

Die kompartiment-spezifische Auftrennung in Glomeruli und Tubulointerstitium erfolgte durch ein paramagnetisches Isolationsverfahren. Dabei wurden aus 6 Wochen alten mTNF- und Wildtyp-Mäusen jeweils 5000 Glomeruli oder tubulointerstitielles Gewebe, welches durch die Gesamtproteinmenge normiert wurde, isoliert und in Zellkultur kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte die Stimulation für weitere 24 Stunden mit IL-1β (10 ng/ml). Anschließend wurde die TNF, CCL2/MCP-1 und IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. In Glomeruli und Tubulointerstitium der mTNF-Mäuse zeigte sich eine komplett aufgehobene Sekretion von TNF, was

die transgene Veränderung des TNF-Gens in diesen Tieren bestätigt (A, B). Dagegen reagierten die aus Wildtyp-Mäusen isolierten Glomeruli auf die Stimulation mit einem deutlichen Anstieg der TNF Produktion. Bei der Messung des Chemokins CCL2 / MCP-1 (C) und des Zytokins IL-6 (E) zeigte sich in den stimulierten Glomeruli der mTNF-Mäuse eine signifikant verringerte Ausschüttung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Nach Stimulation des Tubulointerstitiums ergaben sich keine Unterschiede der Proteinkonzentrationen zwischen der Wildtyp- und der mTNF-Gruppe (D, F). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, n = 4 je Gruppe, ** p < 0,01, *** p < 0,001, n.s. = nicht signifikant, n.d. = nicht detektierbar.

3.2.2. Kompartimentspezifische mRNA-Expression nach Stimulation mit IL-1 β

in vitro

Zur Bestätigung, ob in den stimulierten Zellen das Ausmaß der Proteinsekretion mit dem Expressionsniveau korrelierte, wurde die mRNA-Expression von TNF, CCL2/MCP-1 und IL-6 nach IL-1 β -Stimulation im glomerulären und tubulointerstitiellen Gewebe untersucht.

Im Gegensatz zum sezernierten Protein im Kulturüberstand wurde die Genexpression von TNF in den stimulierten Glomeruli durch IL-1 β induziert, ohne dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Glomeruli aus Wildtyp- und mTNF-Mäusen gemessen werden konnte (Abbildung 30 A). Im stimulierten Tubulointerstitium dagegen war die TNF-Expression in Zellen mit dem mTNF-Genotyp signifikant erniedrigt (Abbildung 30 B). Dieses Ergebnis ist mit einer Selbststimulation der TNF-mRNA-Expression durch sezerniertes TNF im Tubulointerstitium von Wildtyp-Tieren vereinbar, die in mTNF-Mäusen ausbleibt. Bei der Untersuchung der CCL2/MCP-1 mRNA wurde übereinstimmend mit der erniedrigten Konzentration sezernierten Proteins ins Zellkulturmedium eine um den Faktor 2,0 niedrigere Expression im mTNF-Genotyp im Vergleich zu den aus Wildtyp-Mäusen stammenden Glomeruli nachgewiesen (Abbildung 30 C). Auch bei der IL-6 Expression konnte ähnlich zur Genexpression von CCL2/MCP-1 eine tendenziell erniedrigte mRNA-Konzentration in den Glomeruli aus mTNF-Mäusen gesehen werden (Abbildung 30 E).

Die Tendenz zu einer geringeren Genexpression von Zytokinen und Chemokinen im mTNF-transgenen Gewebe lag, wie bereits auf Proteinebene im ELISA gezeigt, vor allem im glomerulären Kompartiment vor und nur zu einem geringeren Ausmaß im Tubulointerstitium. Hier wurde durch IL-1 β keine deutliche Expression induziert, die sich zwischen Wildtyp- und mTNF-Tieren auch nicht unterschied (Abbildung 30 D, F).

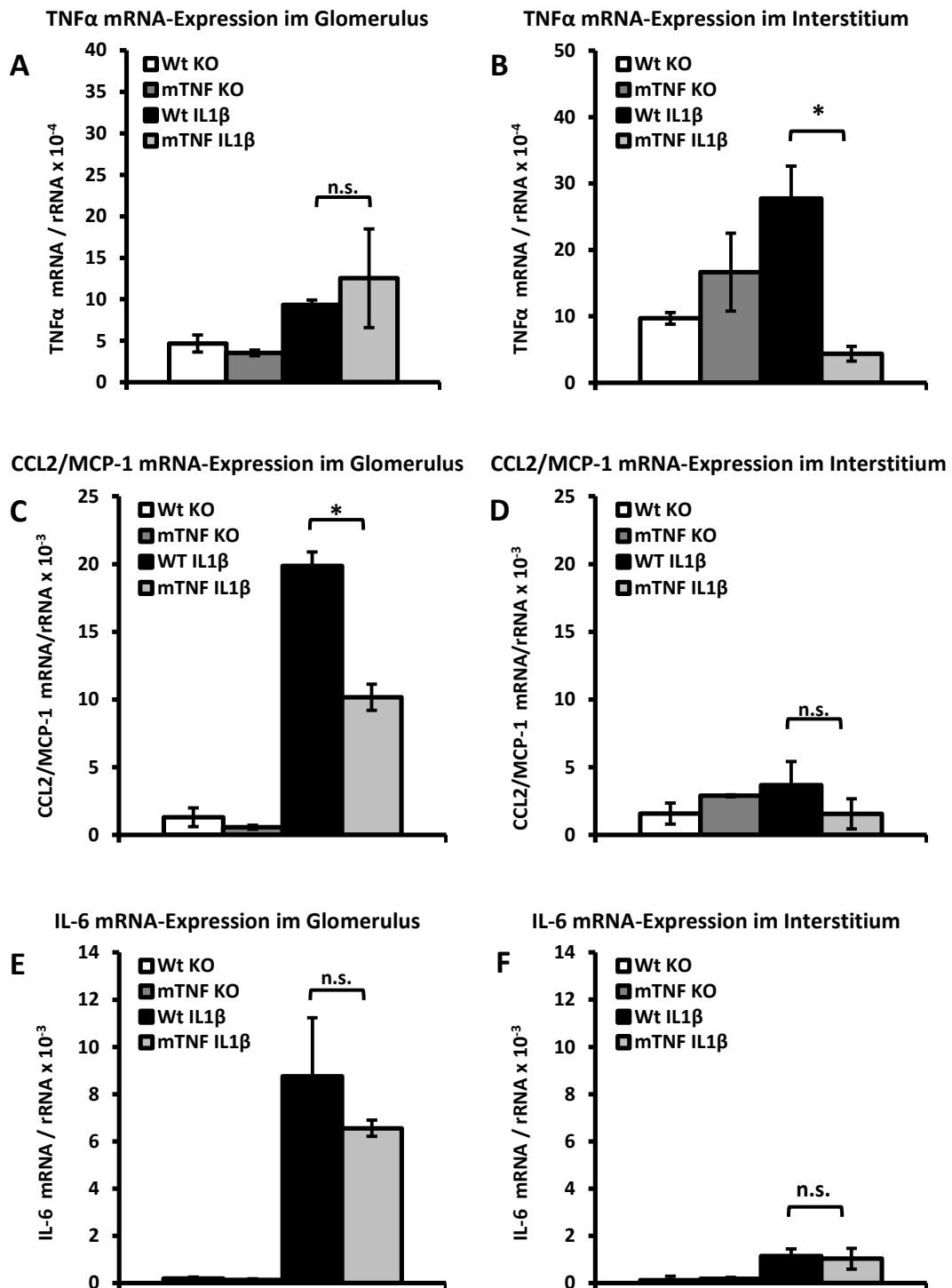


Abbildung 30: Kompartimentspezifische TNF-, CCL2/MCP-1- und IL-6-mRNA-Expression nach Stimulation mit IL-1 β *in vitro*.

Glomeruläres und tubulointerstitielles Gewebe wurde nach der *in vitro* Stimulation mit IL-1 β lysiert und eine quantitative *real-time* PCR durchgeführt. Die TNF-Expression in stimulierten Glomeruli der mTNF-Mäuse wies keinen Unterschied zur Wildtyp-Gruppe auf (A). Im Tubulointerstitium zeigte sich eine signifikant verminderte TNF mRNA-Expression im Vergleich zur stimulierten Wildtyp-Kontrolle (B). Die mRNA-Expression von CCL2/MCP-1 war in den stimulierten Glomeruli der mTNF-Mäuse signifikant niedriger als in denen der Wildtyp-Mäuse (C), vergleichbar mit der verringerten CCL2/MCP-1 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand der Glomeruli. Die IL-6 mRNA-

Konzentration in den transgenen Glomeruli war tendenziell ebenfalls erniedrigt, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (E). Im IL-1 β -stimulierten Tubulointerstitium der mTNF-Mäuse zeigten sich bei der CCL2 und IL-6 Expression ein deutlich geringeres Expressionsniveau als in den Glomeruli, ohne dass ein Unterschied zwischen den Genotypen erkennbar war (D, F). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, aus 2 unabhängigen Experimenten, * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

3.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der kompartimentspezifischen Stimulation mit IL-1 β *in vitro*

Um die Frage zu untersuchen, inwieweit die ausschließliche Expression von membranständigem TNF auf intrinsischen Nierenzellen mit Fehlen von löslichem TNF oder auch die geringere Anzahl in die Niere infiltrierender Leukozyten die *in vivo* verminderte renale Expression von Zytokinen und Chemokinen im Verlauf der NTN bedingt, wurden Glomeruli und tubulointerstitielles Gewebe aus Wildtyp- und mTNF-Mäusen *in vitro* mit IL-1 β inflammatorisch stimuliert.

Auch unabhängig vom Ausmaß der in die Niere einwandernden Leukozyten sezernierten isolierte Wildtyp-Glomeruli nach Stimulation vermehrt Zytokine (TNF und IL-6) und Chemokine (CCL2/MCP-1) im Vergleich mit unstimulierten Kontrollen. Im Zellkulturmedium der aus mTNF-Mäusen isolierten Glomeruli konnte sowohl vor als auch nach Stimulation erwartungsgemäß kein lösliches TNF nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten die Glomeruli mit mTNF-Genotyp nach Stimulation eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant verminderte CCL2/MCP-1 und IL-6 Sekretion in das Zellkulturmedium. Analog dazu war auch die mRNA-Expression von CCL2/MCP-1 in stimulierten Glomeruli aus mTNF-Mäusen signifikant und für IL-6 tendenziell niedriger als in Glomeruli aus Wildtyp-Mäusen.

Dies spricht für eine verminderte Expression von proinflammatorischen Mediatoren durch stimulierte intrinsischen Nierenzellen in Abwesenheit von löslichem TNF bei alleiniger Expression von membranständigem TNF. Aus den Daten dieser *in vitro*-Experimente kann daher gefolgert werden, dass die verminderte renale Leukozyteninfiltration in mTNF-Nieren während der NTN Folge einer reduzierten Expression inflammatorischer Mediatoren durch intrinsische Nierenzellen bei Fehlen von löslichem TNF ist.

4. Diskussion

TNF übt viele unterschiedliche Funktionen im menschlichen Organismus aus und spielt dabei eine essentielle Rolle in der Homöostase des Immunsystems, der Erregerabwehr und der Organogenese [141]. Das Zytokin ist einer der wichtigsten Mediatoren lokaler und systemischer Entzündungsreaktionen, wobei es am Anfang einer proinflammatorischen Zytokinkaskade steht, die bei Gewebeschäden oder Infektionen induziert wird [28, 33]. Dabei führt TNF in vielen akuten und chronischen Krankheitsmodellen einerseits zur direkten Induktion von Zelltod im betroffenen Gewebe oder in aktivierten Leukozyten, andererseits in der Endstrecke der ausgelösten Zytokinkaskade zu einer vermehrten Einwanderung von Leukozyten, was eine weitere inflammatorische Gewebeschädigung nach sich ziehen kann [28, 142].

Der proinflammatorische und schädigende Effekt von TNF auf das Gewebe, der mit dem Umbau in funktionsloses Narbengewebe enden kann, wurde bereits in vielen organspezifischen murinen und humanen Studien belegt [27]. Letzten Endes führten diese Erkenntnisse zur Entwicklung und erfolgreichen und nachhaltigen Anwendung von TNF-blockierenden Biologika bei vielen chronisch entzündlichen Krankheitsbildern des Menschen, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis oder der Psoriasis vulgaris [32, 33, 143]. Jedoch besitzt TNF auch immunomodulatorische und antiinflammatorische Effekte, von denen angenommen wird, dass sie eine einmal begonnene Entzündungsreaktion begrenzen sollen, bevor es zur überschießenden Aktivierung des inflammatorischen Systems und in deren Folge zu Gewebeschädigung oder Autoimmunität kommt [40]. Die immunoregulatorische Funktion von TNF lässt sich seit dem breiten Einsatz von TNF-Blockern in Form von autoimmunen Reaktionen in den behandelten Patienten veranschaulichen, die Lupus-ähnliche Symptome bis hin zu einer autoimmunen Glomerulonephritis entwickeln können [35-37].

Um diese gegensätzlichen Funktionen von TNF als Entzündungsmediator näher zu charakterisieren, wurde in den letzten Jahren die spezifische Rolle der beiden TNF-Rezeptoren auch in renalen Krankheitsmodellen genauer untersucht. Durch Vielhauer et al. konnte gezeigt werden, dass der TNFR2 eine essentielle Rolle in der Vermittlung des renalen Gewebeschadens und der Entzündungsreaktion bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis spielt [116]. Durch Experimente mit knochenmarkschimären Mäusen konnte in dieser Studie

die Expression von TNFR2 auf intrinsischen Nierenzellen für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden. Andererseits konnte bereits zuvor durch die Arbeiten von Timoshanko et al. nachgewiesen werden, dass TNF als Ligand gebildet von intrinsischen Nierenzellen, und nicht von einwandernden Leukozyten, für die Pathologie in der Immunkomplex- Glomerulonephritis ausschlaggebend ist [121]. Diese Ergebnisse konnte auch später im Modell einer Cisplatin-induzierten Nephropathie durch Zhang et al. bestätigt werden [144].

Ausgehend von der Erkenntnis, dass TNFR2 vorzugsweise durch membranständiges TNF und nicht durch lösliches TNF aktiviert werden kann [56], weisen diese Vorarbeiten auf einen Mechanismus hin, bei dem membranständiges TNF über Zell-Zell-Interaktion zwischen intrinsischen Nierenzellen zu vermehrter renaler Schädigung in der Immunkomplex- Glomerulonephritis führen könnte. Analog dazu zeigten Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe eine deutlichere Expressionssteigerung der TNFR2 mRNA, im Gegensatz zu TNFR1, nach inflammatorischer Stimulation mit TNF in *ex vivo*-isolierten Glomeruli [113]. Dagegen zeigte diese Studie auch, dass TNFR1, nicht jedoch TNFR2, nach Stimulation mit löslichem TNF die proinflammatorische Genexpression von Entzündungsmediatoren via NFκB- und AP-1-Signalweg vermittelt [50, 113].

Aus diesem Grund untersuchten wir die Hypothese, ob in der pathologischen Situation einer Immunkomplex- Glomerulonephritis membranständig exprimiertes TNF am Ort der primären Schädigung, in diesem Fall nach Ablagerung der Anti-GBM-Antikörper im Glomerulus, über juxtakrine Aktivierung intrinsischer Nierenzellen zur renalen Parenchymschädigung führt. Bisher wurde noch keine Arbeit publiziert, die sich mit der funktionellen Rolle von membranständigem TNF in der Pathologie renaler Erkrankungen befasst.

Um unsere Hypothese zu untersuchen wurde im ersten Teil dieser Arbeit eine *in vivo* Phänotypanalyse mit gentechnisch veränderten mTNF-Mäusen in der heterologen NTN, dem Modell einer Immunkomplex- Glomerulonephritis, durchgeführt. Diese Mäuse exprimieren ausschließlich membranständiges TNF auf der Zellmembran, ohne dass dieses zu löslichem TNF abgespalten werden kann. In gesunden mTNF-Mäusen ist jedoch das Expressionsniveau von membranständigem TNF auf der Zelloberfläche mit Wildtyptieren vergleichbar [122]. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der zugrundeliegende molekulare Mechanismus weiter charakterisiert und durch *in vitro*-Experimente bestätigt. Im Folgenden werden die Ergebnisse interpretiert und anhand der aktuellen Literatur diskutiert.

4.1. Interpretation der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

4.1.1. mTNF-Mäuse zeigen eine erhöhte Mortalität

Die mTNF-Mäuse zeigen eine signifikant höhere Mortalität im Verlauf des 5 Tage dauernden heterologen NTN-Modells als die Wildtyp-Gruppe (Abbildung 17 A). Die Sterblichkeit war in der heterologen NTN an frühen Zeitpunkten 24 bis 48 Stunden nach Induktion zu beobachten, während nach den ersten 48 Stunden weder mTNF-, noch Wildtyp-Mäuse aus dem Versuch ausschieden und sich die Zahl der verbliebenen Tiere bis zum Versuchsende an Tag 5 nicht mehr änderte.

Die erste Überlegung, um die erhöhte Mortalität in den mTNF-Mäusen zu erklären, bezieht sich auf den allgemeinen Phänotyp dieser Tiere, welcher durch die transgene Veränderung des mTNF^{Δ1-9,K11E}-Allels bereits in der physiologischen Situation von dem des Wildtyps abweichen könnte. Dazu wurden von Ruuls et al. 2001 die ersten Experimente an den in unserer Arbeit verwendeten Mäusen mit dem gentechnisch veränderten mTNF^{Δ1-9,K11E}-Allel durchgeführt [122]. Die Entwicklung dieser Mäuse geht auf die bis dato unzureichenden biologischen Modelle für die Untersuchung der membranständigen TNF-Wirkung *in vivo* zurück. Frühere Versuche mit TACE-Inhibitoren von Gearing et al. und McGeehan et al. zeigten, dass die biologische Aktivität von TACE nicht nur auf die Abspaltung von membranständigem TNF beschränkt ist, sondern auch für die Abspaltung von Lymphotoxinen und den TNFR2 von Bedeutung ist, weshalb sie nur eingeschränkt zur spezifischen Untersuchung von membranständigem TNF geeignet waren [55, 145]. Andere Modelle mit transgenen Mäusen wie von Mueller et al. wiesen einen defekten Aufbau der Lymphorgane auf oder führten wie bei Decoster et al. zu einer nicht vergleichbaren TNF-Bioaktivität auf der Zellmembran im Vergleich zu Wildtyp-Tieren [103, 146].

Um diese Probleme zu umgehen, wurden in der Arbeit von Ruuls et al im mTNF-Genotyp nur minimal in Form von einer kleinen Deletion und einer Mutation an der Bindungsstelle der TACE veränderte TNF-Allele in das Genom eingefügt. Diese transgenen Mäuse zeigten zum einen eine normale Bioaktivität des membranständigen TNFs und zum anderen eine zum Wildtyp quantitativ vergleichbare Expression als Oberflächenprotein an der Zellmembran,

sowie eine vergleichbare TNF mRNA-Expression. Dies schließt eine basal erhöhte TNF-Produktion in den mTNF-Mäusen als Ursache für eine erhöhte Sterblichkeit aus.

Auch der von Ruuls et al. beschriebene allgemeine naive Phänotyp der mTNF-Mäuse mit normalem Aussehen, unauffälliger Zucht und mit Wildtyp-Mäusen vergleichbarer Lebenserwartung, lässt nicht auf einen vom induzierten Krankheitsbild der NTN unabhängigen Effekt schließen. Dies bestätigen auch andere Studien mit mTNF-Mäusen in anderen Krankheitsmodellen, in denen keine erhöhte Mortalität nachgewiesen werden konnte [101, 147]. Da die mTNF-Mäuse direkt im genetischen C57Bl/6-Hintergrund hergestellt wurden [122], ist auch nicht von einer erhöhten Empfindlichkeit des Mausstamms gegenüber dem nephrotoxischen Serum auszugehen.

In den von Ruuls et al. durchgeführten histologischen Untersuchungen zeigte sich im Gegensatz zu TNF-defizienten Mäusen eine dem Wildtyp ähnliche Organisation der Lymphorgane, jedoch ohne die korrekte Ausbildung von primären B-Zell Follikeln. Dies könnte aber durch eine gestörten B-Zell Aktivität zu einer größeren Sterblichkeit in nephritischen mTNF-Mäusen führen. Da das heterologe Modell der NTN, das ohne eine vorherige Präimmunisierung erfolgt, nur 5 Tage andauert und die Versuchsmäuse bereits nach 24-48 Stunden im Versuch moribund waren, ist es unwahrscheinlich, dass in dieser kurzen Zeit eine starke Beteiligung des adaptiven Immunsystems mit veränderter B-Zell-Aktivität der hohen Mortalität in den mTNF-Mäusen zuzuschreiben ist.

Um auszuschließen, dass eine vermehrte systemische Entzündungsreaktion in den mTNF-Mäusen außerhalb der Niere stattfindet, welche die erhöhte Mortalität in den transgenen Mäusen verursachen könnte, wurde in dieser Arbeit zusätzlich die IL-6 Konzentration im Serum der Wildtyp- und mTNF-Mäuse an Tag 5 der heterologen NTN verglichen. Da in den mTNF-Mäusen mithilfe eines ELISA weniger IL-6 im Serum im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nachgewiesen wurde, macht dies eine stärkere systemische Inflammationsreaktion als Ursache für die erhöhte Mortalität im mTNF-Genotyp unwahrscheinlich (Abbildung 17 B).

Nachdem keine unspezifische Anfälligkeit der mTNF-Mäuse durch Organdysfunktion oder eine dysregulierte TNF-Antwort unter physiologischen Bedingungen beschrieben sind und auch keine vermehrte systemische Entzündungsreaktion außerhalb der Niere nachgewiesen werden konnte, erscheint eine verstärkte Ausprägung der heterologen NTN für die erhöhte Mortalität in den mTNF-Mäusen verantwortlich zu sein. Einerseits ist als erstes die stärkere

funktionelle Niereneinschränkung mit höherem Serumharnstoff in den mTNF-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen als mögliche mortalitätssteigernde Ursache zu diskutieren. Andererseits ist eine hohe Morbidität und Sterblichkeit an den sehr frühen Zeitpunkten im NTN-Modell nach 24-48 Stunden selbst durch einen im Verlauf stärkeren Abfall der Nierenfunktion nicht zu erwarten. Dies wäre eher zu einem späteren Zeitpunkt zu überlegen, nachdem sich toxische Konzentrationen von harnpflichtigen Substanzen angesammelt haben oder massive Überwässerung in den verstärkt niereninsuffizienten Mäusen aufgetreten ist. Daher scheint die durch die NTN ausgelöste renale Funktionseinschränkung zwar eine mögliche, aber unwahrscheinliche Erklärung für die erhöhte Mortalität in den mTNF-Mäusen im frühen Verlauf der NTN zu sein.

In der Literatur ist die nephrotoxische Serumnephritis bereits zu Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben worden und wurde in vielen verschiedenen Spezies und Modellvarianten untersucht. Laus und Hadler entdeckten 1960, dass das nephrotoxische Serum aus Kaninchen auch pulmonale Läsionen in Ratten auslösen kann [148]. Die gleichzeitige Reaktion von Antikörpern gegen Lungen- und Nierenparenchym sind wahrscheinlich auf den ähnlichen Aufbau der alveolären und glomerulären Basalmembran mit Kollagen IV zurückzuführen, was auch beim *Goodpasture-Syndrom* des Menschen beobachtet werden kann [149]. Möglicherweise weisen auch die mTNF-Mäuse eine pulmonale Beteiligung in der NTN auf, die zu frühen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf zu einer erhöhten Mortalität führen könnten. Diese Hypothese wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht weiter untersucht. Sie bleibt als mögliche Erklärung zu bedenken.

Abschließend lässt sich die erhöhte frühe Mortalität in den mTNF- im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen am ehesten mit einem größeren durch das nephrotoxische Serum ausgelösten renalen oder pulmonalen Parenchymschaden erklären, der in den mTNF-Mäusen durch das alleinige Vorhandensein von mTNF vermittelt wird.

4.1.2. mTNF-Mäuse entwickeln einen vermehrten funktionellen und morphologischen Nierenschaden

Die Phänotypanalyse der mTNF-Mäuse in der heterologen NTN zeigte im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollmäusen eine signifikant höhere Albuminurie an Tag 5 nach Induktion

(Abbildung 18). Zusammen mit den erhöhten Serumharnstoffwerten spricht die Albuminurie für eine größere renale Schädigung und Funktionseinschränkung in den transgenen mTNF-Mäusen (Abbildung 19). Der größere renale Schaden spiegelte sich auch in der histologischen Evaluation der Glomeruli in Form einer vermehrten PAS-positiven Glomerulosklerose im mTNF-Genotyp wider (Abbildung 20 A). Um den verstärkten nephritischen Phänotyp in den mTNF-Mäusen weiter zu untersuchen, wurde zunächst das Ausmaß der abgelagerten Schaf-IgG aus dem nephrotoxischen Serum und die darauffolgende Komplementbindung mit Ablagerung des Komplementfaktors C3d entlang der glomerulären GBM analysiert. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen an Tag 5 nach Injektion des Serums (Abbildung 20 B und C). Dies legt eine gleichsamer Induktion des heterologen NTN-Modells in beiden Genotypen nahe und spricht gegen eine abweichende primäre Immunantwort in Form einer verstärkten Komplementaktivierung in den mTNF-Mäusen als mögliche Erklärung für die renale Schädigung.

Korrelierend mit den verstärkten funktionellen und strukturellen Schadensmarkern konnte histologisch in den Glomeruli der mTNF-Mäuse eine größere Anzahl von nekrotischen TUNEL⁺- (Abbildung 20 D) und auch proliferierenden PCNA⁺-Zellen (Abbildung 20 E) gesehen werden. Der vermehrte Zelluntergang und die stärkere glomeruläre Schädigung ging einher mit im Vergleich zum Wildtyp abgeschwächter glomerulärer Expression des Endothelzellmarkers CD31, was auf einen vermehrten Schaden des glomerulären Endothels hinweist (Abbildung 20 H). Auch der Podozytenmarker Nephritin wurde in den stärker geschädigten Nieren der mTNF-Mäuse als Zeichen einer Podozytenschädigung vermindert exprimiert (Abbildung 20 G). Dagegen zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der Podozyten pro Glomerulus (Abbildung 20 F). Diese Daten weisen somit auf einen vermehrten glomerulären Zelltod und verstärkte Schädigung glomerulärer Endothelzellen und Podozyten durch membranständiges TNF hin. Tatsächlich zeigen *in vitro*-Studien, dass membranständiges TNF in der Lage ist, Zelltod in benachbarten Zellen zu induzieren [91, 150, 151]. Entsprechend der Hypothese, dass membranständiges TNF zu einer vermehrten Induktion von Apoptose oder regulierter Nekrose führen könnte, zeigten sich in den mTNF-Mäusen signifikant mehr TUNEL⁺-Zellen im Glomerulus in der Immunfluoreszenzmikroskopie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Passend dazu war die Anzahl der PCNA⁺-Zellen, die sich im Zellzyklus befinden, in den Glomeruli der mTNF-Mäuse an Tag 5 der NTN signifikant

gegenüber dem Wildtyp erhöht. Dies kann als Ausdruck eines verstärkten Reparaturvorgangs als Reaktion auf den vermehrt aufgetretenen Zelluntergang in den Glomeruli der mTNF-Mäuse gesehen werden, der jedoch offenbar den vermehrten glomerulären Schaden nicht ausreichend kompensieren kann [152].

Diese Daten unterstützend konnte von Kresse et al. in Experimenten an *ex vivo* isolierten Mäuselebern gezeigt werden, dass der durch membranständiges TNF ausgelöste Zelltod in Hepatozyten ausschlaggebend für die Toxizität des Chemotherapeutikums Melphalan ist [95]. Außerdem wurde membranständiges TNF auf Alveolarmakrophagen durch seine Fähigkeit, vermehrten Zelltod zu induzieren, als möglicher Auslöser der Schädigung des Lungenparenchyms im akuten Lungenversagen identifiziert [94]. Auch *in vivo*-Studien mit mTNF exprimierenden T-Zellen lassen auf den direkten zellschädigenden Effekt von membranständigem TNF im Gewebe schließen [153]. Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erhärten diese Daten die Hypothese, dass membranständiges TNF *in vivo* vor allem in der Vermittlung des akuten Gewebeschadens durch die Induktion von Zelltod involviert ist.

Auch die Vordaten von Vielhauer et al., die im Modell der autologen NTN eine essentielle Rolle von auf intrinsischen Nierenzellen exprimiertem TNFR2 für die Induktion der Nephritis nachgewiesen haben [116], unterstützen diese Hypothese. TNFR2-defiziente Mäuse könnten vor Zelltod-induzierenden Effekten von membranständig exprimiertem TNF, dem bevorzugten Liganden von TNFR2, geschützt sein, was trotz initialer glomerulärer Ablagerung der anti-GBM-Antikörper des nephrotoxischen Serums einen verminderten oder ausbleibenden glomerulären Zellschaden zur Folge hätte und auch die deutlich verminderte glomeruläre Komplementablagerung, die nach Endothelschädigung verstärkt auftritt, in TNFR2-defizienten Mäusen mit autologer NTN erklärt [116].

Diese Ergebnisse führen zu der Frage, welcher glomeruläre Zelltyp das Ziel des durch membranständigem TNF induzierten Zelltods und damit ursächlich für die vermehrte glomeruläre Schädigung in den mTNF-Mäusen sein könnte. Eine Möglichkeit sind dabei die glomerulären Endothelzellen, bei denen in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe einerseits die Oberflächenexpression des TNFR2 in der murinen Immunkomplex-Nephritis immunhistologisch nachgewiesen wurde [116] und andererseits der TNFR2 nach inflammatorischer Stimulation deutlicher induzierbar war als der TNFR1 [113]. Auch in

humanen Nierenbiopsien konnte die Expression des TNFR2 nach Auftreten einer Anti-GBM Nephritis auf glomerulären Endothelzellen bestätigt werden [154]. Diese Befunde legen eine Beteiligung der glomerulären Endothelzellen am mTNF-TNFR2-Signalweg vor allem in der akuten pathologischen Situation nahe, in der die aktivierten Endothelzellen und ihr exprimierter TNFR2 in direkten Kontakt mit von Leukozyten, Podozyten oder Mesangialzellen stammenden oder unter Umständen sogar durch glomeruläre Endothelzellen selbst produziertes membranständiges TNF kommen. Kürzlich konnte von Kumar et al. bereits gezeigt werden, dass das Absterben von glomerulären Endothelzellen als Angriffspunkt von neutrophilen Granulozyten die renale Pathologie im Modell der heterologen NTN mitverursacht [155]. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen waren in der vorliegenden Arbeit die glomerulären Endothelzellen, welche mittels CD31⁺-Färbung in der Immunfluoreszenzmikroskopie quantifiziert werden konnten, in den Glomeruli der mTNF-Mäuse 5 Tage nach Induktion signifikant im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen vermindert (Abbildung 20 H). Jedoch exprimieren nicht nur Endothelzellen nach inflammatorischer Stimulation den TNFR2, sondern auch Mesangialzellen [113] und Podozyten [112]. Bei der Untersuchung der WT1⁺/Nephrin⁺-Podozyten zeigte sich eine starke Reduktion der Podozytenzahl pro Glomerulus, diese war jedoch in beiden Versuchsgruppen gleich stark ausgeprägt. Allerdings wies die signifikant reduzierte renale Nephrin-mRNA-Expression in nephritischen mTNF-Mäusen auf eine verstärkte Podozytenschädigung hin. Außerdem kann auch eine Rolle der Mesangialzellen als weiteren geschädigten glomerulären Zelltyp infolge der mTNF-vermittelten glomerulären Schädigung in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zum glomerulären Schaden, konnte in der histologischen Beurteilung der tubulointerstitiellen Morphologie noch keine vermehrte Schädigung am 5. Tag der NTN gesehen werden (Abbildung 21 A). Jedoch wurde analog zur Untersuchung des glomerulären Zelltods ein signifikant vermehrter Zelluntergang und tendenziell auch mehr Zellproliferation im Tubulointerstitium der mTNF-Mäuse nachgewiesen (Abbildung 21 B und C). Außerdem zeigten sich auch auf molekularer Ebene durch die vermehrte mRNA-Expression der tubulären Schadensmarkern L-FABP und α -GST Anzeichen für eine stärkere Schädigung im Tubulussystem der mTNF-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen (Abbildung 21 D). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Schaden im Tubulussystem erst sekundär infolge des glomerulären Schadens vor allem durch die vermehrte Filtration von

Albumin während der NTN entsteht [156]. Das pathologisch vermehrt filtrierte Albumin im Primärharn wird von den Tubuluszellen rückresorbiert und führt zu einer tubulotoxischen Akkumulation von Albumin in den Zellen des proximalen Tubulus, die in der Folge zugrunde gehen. Da dieser Vorgang zeitlich erst nach dem Auftreten der Albuminurie abläuft und diese erst am 5. Tag nach Induktion des Modells einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen zeigte, sind eventuell noch keine histomorphologisch fassbaren Zeichen einer vermehrten Tubulusschädigung in mTNF-Nieren nachvollziehbar. Dabei könnten jedoch die schneller reagierenden molekularen Stressmarker und Proliferationsmarker in Form von induzierten Enzymen wie α -GST oder Bindeproteinen wie L-FABP sowie die Analyse des tubulointerstitiellen Zelltods an Tag 5 der heterologen NTN als sensitives Zeichen der tubulointerstitiellen Schädigung der Morphologie vorausgehen.

Bei Vergleich der vorliegenden Ergebnisse im NTN-Modell mit publizierten Daten zeigte sich ein uneinheitliches Bild in Bezug auf den durch membranständig exprimiertes TNF vermittelten Parenchymschaden in unterschiedlichen Organen und Krankheitsmodellen. So konnte in Experimenten mit mTNF-Mäusen im Gegensatz zu löslichem TNF kein Effekt für membranständiges TNF auf die Pathogenese und Parenchymschädigung in der LPS-induzierten Hepatitis nachgewiesen werden [101]. Darüber hinaus wurde in Versuchen mit dem gleichen Maus-Genotyp gezeigt, dass membranständiges TNF neuroprotektiv in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) wirkt und die Hemmung von membranständigem TNF sogar zu einer Exazerbation in diesem Modell der Multiplen Sklerose führen kann [122]. Dies könnte durch mTNF-vermittelte Apoptose aktivierter autoimmuner T-Zellen erklärt werden [157]. In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurden auch im klinischen Bereich bereits Fälle von Multipler Sklerose nach Therapie mit TNF-Blockern oder die exazerbierte Demyelinisierung bei bestehender MS unter dem Therapieversuch mit Lenercept, einem TNFR1-Fusionsprotein, berichtet [158, 159]. Dabei gilt es jedoch auch zu bedenken, dass nur ein sehr kleiner Teil der verwendeten TNF-Blocker auch die Blut-Hirnschranke überwindet und dementsprechend membranständiges TNF im ZNS nicht auf diesem Wege blockiert werden kann [159].

Im Kontrast dazu zeigte sich in Versuchen mit mTNF-Mäusen eine größere pulmonale Morbidität und Pathologie in der experimentellen Influenza-Infektion mit stärkerem Gewichtsverlust, größerem Albuminübertritt durch die geschädigte alveoläre Basalmembran

und geringerer peripherer O₂-Sättigung in den transgenen Mäusen [147]. Auch bei der durch Concanavalin A-induzierten Hepatitis konnte ein schädigender Effekt durch membranständiges TNF über den TNFR2-Signalweg und eine damit induzierte Leberzellnekrose nachgewiesen werden, wobei die Aussagekraft dieser Studie durch die Verwendung von Mäusen mit einer erhöhten basalen TNF-Expression eingeschränkt ist [96]. Neuere Experimente mit der doppelt-negative TNF-Mutante (XPro™1595), die aufgrund ihrer TNF-ähnlichen Struktur Heterotrimere mit nativem löslichen TNF bildet, was die Signalübertragung des trimerisierten TNF-Proteins an beiden Rezeptoren unterbindet und das membranständige TNF nicht beeinflusst [160], bestätigen nochmals den protektiven, antiinflammatorischen Effekt für membranständiges TNF in der EAE bei Mäusen [161]. Jedoch wurde von Perrier et al. in Studien mit dem gleichen selektiven Hemmstoff des löslichen TNFs gezeigt, dass vor allem membranständiges TNF und nicht das lösliche in der murinen experimentellen Kolitis für die vermehrte Organschädigung und verschlechterten Krankheitsverlauf verantwortlich ist [99]. Dazu passend zeigte Khera et al. im Modell der experimentellen autoimmunen Uveoretinitis (EAU), dass bei einer selektiven Blockade des löslichen TNFs vor allem die Leukozyteneinwanderung in das Auge, insbesondere T-Zellen und Makrophagen, beeinträchtigt ist. Dabei vermochte nur die pan-TNF Blockade, von sowohl löslichem, als auch membranständigem TNF, die Uveitis zu verbessern [100], was wie in der vorliegenden Arbeit membranständiges TNF als entscheidenden gewebeschädigenden Faktor identifizierte.

Nach Betrachtung der Literatur scheint membranständiges TNF kontextspezifisch, je nach betroffenem Organsystem und je nach Pathogenese der Erkrankung, eine unterschiedliche Rolle in der Vermittlung des parenchymatösen Schadens zu spielen. Dabei sind teils protektive und teils schädigende Effekte für die membranständige TNF-Form beschrieben worden. Im Verlauf der heterologen NTN scheint membranständiges TNF, ähnlich wie bei der Concanavalin A-induzierten Hepatitis, der experimentellen Mauskolitis oder der autoimmunen Uveoretinitis, jedoch eine Parenchymschädigung im betroffenen Organ zu vermitteln.

4.1.3. Molekulare Mechanismen der mTNF-abhängigen renalen

Gewebeschädigung

Eine mögliche Erklärung, wie es zur stärkeren Nierenschädigung in den mTNF-Mäusen während des heterologen NTN-Modells kommt, ergibt sich aus der TNF-abhängigen Induktion des Zelltods, der direkt über die vermehrte Anzahl von TUNEL⁺-Zellen in den Glomeruli der mTNF-Mäuse während der NTN nachgewiesen werden konnte. Trotz vermehrter TUNEL-Positivität ergab sich in den vorliegenden Untersuchungen allerdings bei fehlendem Nachweis abgespaltener aktivierter Caspase 3 im Gesamtnierenlysat beider Genotypen kein Anhalt für eine ablaufende Apoptose in nephritischen Nieren. Dies weist darauf hin, dass die Apoptose an dem frühen Zeitpunkt des NTN-Modells im Vergleich zu anderen Formen des regulierten Zelltods wie Nekroptose nur eine untergeordnete Rolle spielt.

In intrinsischen Nierenzellen kann allerdings nach Schädigung durch ein Trauma, Ischämie, Toxine, Immunkomplexablagerungen oder auch bei Zytokinkontakt eine regulierte Nekrose induziert und dabei *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) bei Auflösung der Zellmembran freigesetzt werden. Diese DAMPs stimulieren über *Toll-like* Rezeptoren des angeborenen Immunsystems die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen und leiten damit eine Entzündungsreaktion mit der sekundären Infiltration von Leukozyten ein [162]. Dabei könnte eine durch membranständiges TNF auf intrinsischen Nierenzellen mittels Zell-Zell-Interaktion ausgelöste Induktion des Zelltods in Form von Nekroptose eine initiale Rolle spielen. In den letzten Jahren wurde zunehmend die pathophysiologische Rolle des Nekroptose-Signalweges gegenüber der Induktion der Apoptose bei verschiedenen Modellen des akuten Nierenversagens beschrieben [129, 163-165]. Passend hierzu konnten wir in der Western Blot-Analyse aus Gesamtnierenlysat signifikant größere RIP1 und größere RIP3-Proteinmengen, beides Effektor-Kinasen der Nekroptose, in den nephritischen Nieren der mTNF-Mäuse an Tag 5 der heterologen NTN im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle nachweisen (Abbildung 22). Die erhöhten Konzentrationen dieser beiden Proteine lassen auf vermehrt ablaufende Nekroptose schließen [130] und bestätigen die in der mikroskopischen Evaluation nachgewiesene vermehrte Zelltodinduktion in den mTNF-Mäusen auf molekularer Ebene. Einerseits könnte membranständiges TNF über einen TNFR2-vermittelten Signalweg direkt zur Induktion des Zelltods führen, wie das bereits durch

Verwendung eines passenden Ligandensystems *in vitro* bereits für die Apoptose gezeigt wurde [166, 167]. Allerdings wurde bisher experimentell noch keine direkte TNFR2-vermittelte Nekroptose beschrieben. Andererseits ist auch bekannt, dass membranständiges TNF über die Aktivierung von TNFR2 eine vermehrte TNFR1 vermittelte Zytotoxizität auslösen kann [82, 86, 168]. Schließlich könnte einer vermehrten Nekroptose in mTNF-Mäusen auch zugrunde liegen, dass antiapoptotische Faktoren wie cIAP1 [169] und XAIP [170] über ihre Funktion als Ubiquitin-Ligasen zu einem vermehrten Abbau oder Hemmung der Kinasefunktion von RIP1 oder RIP3 *in vivo* führen und auf diese Weise die RIP1/RIP3-abhängige Nekroptose kontrollieren. Da diese Faktoren in den Nieren der mTNF-Mäuse durch die geringere NFκB-Aktivierung auch auf mRNA-Ebene geringer exprimiert waren (Abbildung 28) würde dies den Abbau von RIP1 und RIP3 hemmen und dadurch zur Nekroptose in diesen Zellen prädestinieren.

Ein anderer Ansatz, um den vermehrten glomerulären Schaden in den mTNF-Mäusen auf molekularer Ebene zu erklären, besteht in einer mTNF-vermittelten frühen podozytären Schädigung mit entsprechend vermehrter Albuminurie. Dabei könnte die bereits beschriebene abgeschwächte Expression der beiden für die glomeruläre Filtrationsbarriere wichtigen Bestandteile Nephrin und Podozin in Podozyten durch die Aktivierung des TNF-abhängigen p38 MAPK-Signalweges eine wichtige Rolle spielen [171, 172]. Hiermit wären die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Form eines signifikant geringeren Nephrin mRNA-Expressionslevels in Gesamtnieren des mTNF-Genotyps im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vereinbar (Abbildung 20 H). Die reduzierte Nephrin-Produktion in geschädigten Podozyten könnte zu einer größeren Durchlässigkeit der Filtrationsbarriere und damit zu vermehrter Albuminurie führen. Untermauert wird diese Hypothese von der Entdeckung, dass der p38 MAPK-Signalweg NFκB unabhängig über TNFR2 und membranständigem TNF aktiviert werden kann [173]. Gleichzeitiger Nachweis der verminderten glomerulären CD31-Expression als Hinweis auf einen glomerulären Endothelzellschaden, aber erhaltene Podozytenzahl in mTNF-Mäusen weisen allerdings darauf hin, dass eine initial verstärkte Endothelzellschädigung zum podozytären Schaden führt.

Zusammenfassend könnte ein möglicher Mechanismus für einen exazerbierten Phänotyp in den mTNF-Mäusen die verstärkte Induktion des Zelltods in Form von Nekroptose im Glomerulus durch Zell-Zell-Interaktion von membranständigem TNF mit dem TNFR1 oder vor

allem TNFR2 auf glomerulären Endothelzellen sein. In Einklang mit diesen Daten wurde TNFR2, der bevorzugte Rezeptor für membranständiges TNF, auf intrinsischen Nierenzellen unabhängig von der TNFR2 Expression auf infiltrierenden Leukozyten als entscheidender Faktor für die Induktion der autologen NTN, möglicherweise durch Auslösen glomerulären Zelltods, identifiziert [116]. Alternativ könnte eine durch membranständiges TNF oder durch die Abwesenheit von löslichem TNF abgeschwächte NF κ B-Aktivierung aufgrund der geringeren Expression antiapoptotischer Faktoren wie cIAP1 und XIAP zum Absterben von Zellen durch Nekroptose prädestinieren. Zusätzlich ist auch eine sekundäre Podozytenschädigung infolge des vermehrten Endothelzellschadens in mTNF-Glomeruli sowie eine direkte mTNF- und p38-MAPK-vermittelte Expressionminderung von Nephrin in mTNF-aktivierten Podozyten als Erklärung für die vermehrte Albuminurie in den mTNF-Mäusen denkbar.

4.1.4. mTNF-Mäuse zeigen trotz größerer renaler Gewebeschädigung einen verminderten renalen Leukozyteninflux

Ausgehend von der Annahme, dass ein vermehrter renaler Gewebeschaden auch mit einer stärkeren Entzündungsreaktion in den mTNF-Mäusen einhergehen müsste, erfolgte die Analyse der renalen Leukozyteninfiltration. Überraschenderweise zeigte sich jedoch ein genau gegensätzliches Bild in der durchflusszytometrischen Untersuchung der renalen Leukozyteninfiltration. Anstatt einer vermehrten Leukozyteneinwanderung wiesen die mTNF-Mäuse eine um ein Drittel niedrigere renale CD45⁺Leukozytenzahl im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen an Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN auf (Abbildung 23 A). Analog dazu waren auch die untersuchten Leukozytensubpopulationen der CD3⁺-, CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, sowie der CD11c⁺ und F4/80⁺ mononukleären Phagozyten signifikant und die Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten tendenziell in den Nieren der mTNF-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt (Abbildung 23 B, C). Dieses Ergebnis konnte immunhistologisch durch die kompartiment-spezifische Quantifizierung der renalen Leukozyten bestätigt werden. Der renale Influx von neutrophilen Granulozyten war in mTNF-Mäusen immunhistologisch sowohl in Glomeruli als auch im tubulointerstitiellen Kompartiment im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erniedrigt (Abbildung 24 A, B). Diese Befunde ließen sich auch in Bezug auf die eingewanderten Makrophagen

nachvollziehen, die sowohl in den Glomeruli als MAC2⁺-Makrophagen wie auch im Tubulointerstitium als F4/80⁺-Makrophagen signifikant weniger in die Nieren der mTNF-Mäuse nachweisbar waren (Abbildung 24 C, D). Bei den gezählten CD3⁺-Lymphozyten zeigte sich sowohl im Glomerulus, wie auch im Tubulointerstitium eine tendenziell, aber nicht signifikant verminderte Einwanderung in mTNF-Nieren (Abbildung 24 E, F). Insgesamt bestätigt somit die Immunhistochemie die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit der Ausnahme, dass das Signifikanzniveau bei der kompartiment-spezifischen immunhistologischen Analyse nicht bei allen Leukozytensubpopulationen erreicht wurde. Dabei ist zu bedenken, dass die Leukozytenzählung im Gewebeschnitt nur den kortikalen Anteil der Niere erfasst, die Durchflusszytometrie dagegen die Leukozytenzahl in der Gesamtniere.

Im Vergleich mit publizierten Studien in mTNF-Mäusen zur Leukozyteninfiltration in geschädigte Organe ergibt sich wieder ein uneinheitliches Bild. Einerseits zeigte sich in der experimentellen Influenza-Infektion eine vermehrte Anzahl von pulmonal einwandernden Leukozyten und Lymphozyten in Mäusen mit zwei mTNF^{Δ1-9,K11E} Allelen, hier korrelierend zur verstärkten pulmonalen Schädigung [147]. Andererseits wurde im Mausmodell der EAE in mTNF-Mäusen festgestellt, dass weniger CD45⁺-Leukozyten in das Rückenmark einwanderten als in den Wildtyp-Kontrollen. Die Reduktion der Leukozyteneinwanderung in den mTNF-Mäusen entsprach in dieser Studie von Ruuls et al. im Ausmaß der von komplett TNF-defizienten Mäusen in der EAE [122], was neben einer potentiellen Autoimmunität begrenzenden Funktion von membranständigem TNF (z.B. durch Apoptose aktivierter autoimmuner T-Zellen) auf lösliches TNF als Mediator der inflammatorischen Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Entzündung hinweist. Letzteres konnte auch im Modell der experimentellen autoimmunen Uveoretinitis (EAU) bestätigt werden, bei dem nach Inhibition des löslichen TNFs durch die doppelt-negative TNF-Mutante (XPro™1595) weniger Leukozyten in das entzündete Gewebe einwanderten und diese Reduktion dem Niveau nach der pan-TNF-Hemmung durch ein TNFR1-IgG Fusionsprotein, das lösliches TNF und mTNF neutralisiert, entsprach [100]. Dementsprechend wurden zwar in Bezug auf die Leukozyteninfiltration gegensätzliche Ergebnisse in der Literatur beschrieben, jedoch unterstreichen mehrere Studien die essentielle Rolle von löslichem TNF für die Leukozytenmigration in geschädigtes Zielgewebe. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit, die in den *in vivo*-Untersuchungen bei alleiniger Expression von

membranständigem TNF und Fehlen von löslichem TNF eine geringere Leukozyteninfiltration in nephritische mTNF-Nieren nachweist.

Interessanterweise beschreiben die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals im NTN-Modell eine Situation, in der vermehrter renaler Schaden mit einer verminderten renalen Leukozyteninfiltration einhergeht. In der Regel korreliert im Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritismodellen wie der NTN das Ausmaß der renalen Leukozyteninfiltration mit dem Grad der Organschädigung [26], was auch in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt wurde [131]. Die vorliegenden Ergebnisse in mTNF-Mäusen stehen auch im Kontrast zu diversen Depletionsstudien, die eine essentielle Rolle von einwandernden Makrophagen, dendritischen Zellen und CD4⁺-Lymphozyten in der Vermittlung der renalen Gewebeschädigung in der Immunkomplex-Glomerulonephritis beschreiben [174-177]. Bei geringerem renalen Leukozyteninfiltrat wäre dementsprechend auch mit einer abgeschwächten Nephritis in den mTNF-Mäusen zu rechnen gewesen. Dass in den mTNF-Mäusen trotz reduzierter renaler Leukozyteninfiltration ein verstärkter Nierenparenchymschaden auftritt, unterstreicht die Bedeutung von membranständigem TNF für die Induktion des Nierenzellschadens. Die dargestellten Ergebnisse sprechen dafür, dass auch mTNF-induzierte Nekroptose hierbei verantwortlich sein könnte. Andererseits belegt die verminderte Leukozytenzahl in nephritischen mTNF-Nieren, dass tatsächlich in mTNF-Mäusen nicht vorhandenes lösliches TNF einen entscheidenden Mediator der renalen Leukozyteninfiltration darstellt.

Passend dazu konnte in dieser Arbeit in NTN-Experimenten mit kürzerem Endpunkt bereits 2 Stunden nach Induktion der NTN eine geringere Infiltration von neutrophilen Granulozyten in den mTNF-Mäusen festgestellt werden. Für diesen Zelltyp wurde beschrieben, dass er vor allem in der frühen NTN eine pathophysiologische Rolle in der Vermittlung der glomerulärer Schädigung spielt [133]. Dennoch war in den mTNF-Mäusen trotz signifikant geringerer renaler Granulozyteneinwanderung eine größere renale Schädigung in Form von höheren Serumharnstoffwerten nachzuweisen (Abbildung 25 und Abbildung 26). Zusammen mit den Vorarbeiten in knochenmarkschimären Mäusen, die einer TNF-Expression vor allem in intrinsischen Nierenzellen, unabhängig von einwandernden Leukozyten, eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der renaler Schädigung zuschreiben [121], sprechen diese Daten dafür, dass mTNF-Expression auf renalen Parenchymzellen unabhängig von der

verminderten Leukozytenzahl den ausgeprägten renalen Schaden in mTNF-Mäusen vermittelt.

Zusammenfassend zeigten sich in den mTNF-Mäusen sowohl in der Durchflusszytometrie, wie auch in der Immunhistochemie eine geringere Infiltration von Leukozyten und Leukozytensubpopulationen in die Glomeruli und in das Tubulointerstitium der Niere im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Da der renale Schaden trotz geringerer Leukozyteneinwanderung in den mTNF-Mäusen verstärkt ist, lässt dies auf eine geringere Rolle von einwandernden Leukozyten im Vergleich zu intrinsischen Nierenzellen in der Vermittlung der mTNF-abhängigen Gewebeschädigung schließen.

4.1.5. mTNF-Mäuse weisen eine abgeschwächte renale NFκB-Aktivierung mit verringerter Expression proinflammatorischer Mediatoren auf

Um zu untersuchen, welcher Mechanismus für die verminderte renale Leukozyteneinwanderung in den mTNF-Mäusen verantwortlich ist, analysierten wir die Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Chemokinen in nephritischen Nieren von Wildtyp- und mTNF-Mäusen. Die Leukozytenmigration ist abhängig von der Expression dieser proinflammatorischen Mediatoren, die Leukozyten zum Ort der Entzündung führen.

Einer geringeren Leukozyteninfiltration entsprechend war auch in den mTNF-Mäusen die renale mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IFN- β), Chemokinen (CCL-2/MCP-1) und Adhäsionsmolekülen (Selektin-E) an Tag 5 nach Induktion der heterologen NTN um etwa ein Drittel niedriger als in den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 27). Die Reduktion der Zytokin- und Chemokinexpression in den mTNF-Mäusen entsprach interessanterweise in seinem Ausmaß ungefähr der im Vergleich zum Wildtyp reduzierten Leukozyteneinwanderung in diesen Mäusen, die auch um ein Drittel weniger renale Leukozyten in der Durchflusszytometrie aufwiesen. Die geringere renale Leukozyteninfiltration in mTNF-Mäusen könnte somit gut durch die geringere Expression dieser Mediatoren verursacht sein.

Die verminderte Expression vieler proinflammatorischer Effektormoleküle in den nephritischen Nieren der mTNF-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp weist darauf hin, dass

lösliches TNF, nicht aber membranständiges TNF diese Expression induziert. Passend hierzu konnten Taubitz et al. in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die Stimulation intakter Glomeruli *in vitro* mit löslichem TNF die Expression proinflammatorischer Effektormoleküle über Aktivierung von TNFR1, nicht aber TNFR2 induziert [178]. Die alleinige Aktivierung von TNFR2 nach Stimulation TNFR1-defizienter Glomeruli mit löslichem TNF führte dagegen zu keiner Induktion einer proinflammatorischen Antwort. Wenn in mTNF-Mäusen bei Fehlen von löslichem TNF das membranständige TNF vorwiegend seinen bevorzugten Rezeptor TNFR2 aktiviert, würde entsprechend dieser Vordaten keine TNFR1-vermittelte Induktion von Entzündungsmediatoren erfolgen, was tatsächlich dem Phänotyp der mTNF-Mäuse entspricht. Viele dieser entzündlichen Mediatoren werden durch eine TNF-Rezeptor-, vor allem TNFR1-abhängige Aktivierung des NFκB-Signalweges induziert. Eine geringere Expression proinflammatorischer Mediatoren könnte somit in den mTNF-Mäusen durch eine geringere Aktivierung des NFκB-Signalweges in Abwesenheit des löslichen TNFs verursacht sein.

Hiermit vereinbar konnte in dieser Arbeit mittels Western Blot-Analyse gezeigt werden, dass in den nephritischen Nieren der mTNF-Mäuse weniger phosphoryliertes IκB als Marker für eine NFκB-Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar war (Abbildung 28 C). Die Phosphorylierung des hemmenden IκB-α führt zu seinem Abbau und in der Folge zur Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges. Interessanterweise war auch der alternative, nicht klassische (nicht kanonische) NFκB2-Signalweg, der hauptsächlich über membranständiges TNF und TNFR2 aktiviert wird [71], in der vorliegenden Arbeit tendenziell vermindert aktiviert (Abbildung 28 D). Tatsächlich wurde eine verminderte NFκB-Aktivierung durch mTNF-vermittelte TNFR2-Stimulierung beschrieben [91]. Zusammen mit einer verminderten mRNA-Expression von ausschließlich durch NFκB regulierten Genen wie IκB oder A20, die als negative Feedbackregulatoren des Signalweges dienen [137, 179, 180], sprechen diese Befunde für eine im Vergleich zum Wildtyp geringere renale NFκB-Aktivierung in den mTNF-Mäusen (Abbildung 28 A). Dies würde erklären, weshalb weniger proinflammatorische Zytokine und Chemokine in den nephritischen Nieren der mTNF-Mäuse exprimiert wurden und weshalb in deren Folge trotz vermehrter Gewebeschädigung weniger Leukozyten in die Niere eingewandert sind.

Bei detaillierter Analyse der einzelnen exprimierten Gene in der Gesamtniere an Tag 5 der heterologen NTN fällt eine deutliche renale mRNA-Expression von TNF in den mTNF-Mäusen auf, welche im Gegensatz zu den meisten anderen Mediatoren nicht niedriger, sondern signifikant höher als in Wildtyp-Tieren war (Abbildung 27 A). Das Ausgangsniveau in naiven Nieren aus beiden Genotypen zeigte dagegen keinen Unterschied, was die normale basale TNF-Expression in den transgenen mTNF-Mäusen bestätigt. Die erhöhte Konzentration von TNF mRNA in den nephritischen Nieren der mTNF-Mäuse, trotz geringerer Expression anderer Zytokine wie IL-1 β , welche teilweise durch die gleichen Transkriptionsfaktoren wie NF κ B induziert werden, könnte auf ein *Reverse signaling* durch membranständiges TNF selbst zurückzuführen sein. Das *Reverse signaling* ist ein Prozess, bei dem membranständiges TNF als Rezeptor wirkt und sogenannte *Outside-inside-Signale* in den Zellkern der mTNF-exprimierenden Zelle vermittelt [90]. *Reverse signaling* über membranständiges TNF könnte vor allem nach seiner Bindung an membranständigen oder löslichen TNFR2 erfolgen. So konnte in *in vitro* Studien an kultivierten Monozyten nachgewiesen werden, dass die Zugabe von löslichem TNFR2 zu einer Induktion der TNF-Expression in diesen Zellen führt, was als Aktivierung des *Reverse signaling* durch die Interaktion von membranständigem TNF auf den Zellen mit seinem löslichen Rezeptor gedeutet wurde [181]. Des Weiteren konnte in einer Studie von Zhang et al. gezeigt werden, dass das membranständige TNF nach Aktivierung als Rezeptor über *Reverse signaling* eine verstärkte TNF mRNA-Produktion auslöst, während es als Ligand über TNFR2 zu einer geringeren NF κ B-Aktivierung führt [91]. Diese Mechanismen könnten somit gut die Diskrepanz zwischen der reduzierten mRNA-Expression vieler inflammatorischer Mediatoren, aber der erhöhten TNF mRNA-Expression in mTNF-Nieren erklären. Ob auch die vermehrte Expression des Neutrophilen-Chemokins CXCL5 in mTNF-Nieren durch *Reverse signaling* induziert werden kann ist nicht bekannt. Ein weiterer Mechanismus könnte auch eine NF κ B-unabhängige TNF-Genexpression durch RIP1-vermittelte c-Jun N-terminale Kinase (JNK) Aktivierung sein, was die erhöhte TNF mRNA im Nierenlysat der mTNF-Mäuse trotz geringerer NF κ B-Aktivierung erklären könnte [182].

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützend ist eine Studie von Olleros et al., in der an den mTNF-Mäusen *in vivo* nach *M. bovis* BCG-Infektion eine geringere CCL2/MCP-1 Proteinkonzentration im Serum und in der Lunge nachgewiesen werden konnte. Übereinstimmend mit Daten aus der vorliegenden Arbeit zeigten aus mTNF-Mäusen isolierte Makrophagen 2 Stunden nach BCG-Infektion eine im Vergleich zum Wildtyp geringere

klassische NFκB-Aktivierung [102]. Außerdem konnte in *in vitro*-Experimenten dargestellt werden, dass die konstitutive NFκB-Aktivität in Lymphomzellen absinkt, wenn sie zuvor durch membranständiges TNF aktiviert wurden [91]. Damit einhergehend wurde in einer Arbeit von Cabal-Hierro et al. nachgewiesen, dass die Aktivierung des TNFR2 über membranständiges TNF und die nachfolgende Degradierung des *TNF Receptor Associated Factor 2* (TRAF2) einerseits zu einer vermehrten TNFR1 vermittelten Zytotoxizität in der *Human embryonic kidney 293* Zelllinie führt, andererseits aber auch eine abgeschwächte NFκB-Antwort nach löslicher TNF-Stimulation mit sich bringt [86]. Als Erklärung dieser Ergebnisse wird eine geringere Produktion von intrazellulären Apoptoseblockern durch NFκB angeführt, die dazu führt, dass eine verstärkte Induktion der Apoptose eingeleitet wird. Folglich zeigte sich in den *in vitro*-Experimenten nach der Stimulation des TNFR2 ein Übergang vom proinflammatorischen TNF-Effekt hin zur Induktion des Zelltods. Dieser Mechanismus ließ sich teilweise auch in dieser Arbeit durch eine verminderte renale mRNA-Expression des durch NFκB induzierten Apoptose/Nekroptoseblocker cAIP1 und XIAP in den mTNF-Mäusen nachvollziehen (Abbildung 28 B).

In seiner Folge würde eine geringere NFκB-Aktivierung einerseits den gesteigerten Untergang von residenten Nierenzellen durch Nekroptose infolge geringerer Expression von Nekroptoseblockern und den damit verbundenen größeren renalen Gewebeschaden in den transgenen mTNF-Mäusen auf molekularer Ebene erklären. Gleichzeitig erklärt sich auch die geringere renale Leukozyteninfiltration durch verminderte NFκB-abhängige Expression proinflammatorischer Mediatoren in den mTNF-Mäusen.

4.1.6. Die verringerter Expression proinflammatorischer Mediatoren ist in intrinsischen Nierenzellen nachweisbar und unabhängig von einwandernden Leukozyten

Um auszuschließen, dass die geringere Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren in den Nieren der mTNF-transgenen Mäuse auf die verminderte Anzahl von eingewanderten Leukozyten in diesen Tieren zurückzuführen ist, wurden ergänzende *in vitro* Stimulationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden aus naiven unbehandelten Wildtyp- und mTNF-Mäusen durch ein paramagnetisches Separationsverfahren Glomeruli und

tubulointerstitielles Gewebe isoliert, in Zellkultur kultiviert und für 24 Stunden mit IL-1 β stimuliert. Unter diesen Bedingungen ist die Expression inflammatorischer Mediatoren in dem isolierten Wildtyp- und mTNF-Nierengewebe unabhängig von der unterschiedlichen Zahl infiltrierender Leukozyten. Die Stimulation erfolgte mit IL-1 β , da Timoshanko et al. gezeigt haben, dass eine durch IL-1 β induzierte TNF-Expression vor allem in intrinsischen Nierenzellen im Verlauf der NTN glomerulären Schaden vermittelt.

Mit IL-1 β stimulierte Wildtyp-Glomeruli zeigten eine um das 3,6-fach höhere Proteinkonzentration von sezerniertem TNF im Vergleich zu unstimulierten Glomeruli. Im Gegensatz hierzu konnte erwartungsgemäß im Zellkulturüberstand von unstimulierten und stimulierten Glomeruli aus mTNF-Mäusen kein TNF-Protein mittels ELISA nachgewiesen werden. (Abbildung 29 A). Dies spricht einerseits für eine im Wildtyp vorhandene Sezernierung von TNF durch intrinsische Nierenzellen nach inflammatorischer Aktivierung durch IL-1 β und andererseits für die im mTNF^{A1-9,K11E}-Genotyp fehlende Abspaltung von membranständigem TNF zur löslichen Form. Im Tubulointerstitium konnte dagegen keine deutliche IL-1 β -abhängige TNF-Sekretion im Wildtyp- oder mTNF-Genotyp nachgewiesen werden (Abbildung 29 B).

Interessanterweise war in den unstimulierten und stimulierten Glomeruli des mTNF-Genotyps trotz ausbleibender Sezernierung eine mit dem Wildtyp vergleichbare TNF mRNA-Expression nachweisbar (Abbildung 30 A). Der Grund für die signifikant erniedrigte TNF mRNA-Expression im stimulierten Tubulointerstitium der mTNF-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp bleibt unklar (Abbildung 30 B) und steht im Widerspruch zu der erhöhten TNF mRNA-Expression *in vivo* am Tag 5 der NTN. Möglicherweise kommt es in der *in vitro*-Situation zu einer Selbststimulation der TNF mRNA-Expression durch sezerniertes lösliches TNF, die im tubulointerstitiellen Gewebe der mTNF-Mäuse ausbleibt.

Die Experimente mit *in vitro*-stimulierten Glomeruli zeigen weiterhin eine signifikant geringere CCL2/MCP-1- und Interleukin-6-Protein Sekretion im mTNF-Genotyp im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 29 C-F). Auch die mRNA-Expression in den mTNF-Glomeruli wies nach IL-1 β -Stimulation eine signifikant geringere CCL2/MCP-1 und tendenziell geringere IL-6 mRNA Expression im Vergleich zum Gewebe aus Wildtyp-Mäusen auf (Abbildung 30 C-F). Im tubulointerstitiellen Gewebe konnte durch IL-1 β in beiden Genotypen, konsistent mit der fehlenden TNF-Induktion, keine deutliche Sekretion von CCL2/MCP-1 oder IL-6 ausgelöst

werden, ebenso zeigte sich keine deutlich reduzierte mRNA-Expression. Die glomerulären Daten bestätigen damit die Ergebnisse aus den vorangegangenen *in vivo*-Experimenten mit einer abgeschwächten Expression von Zytokinen und Chemokinen im mTNF-Genotyp. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt unabhängig vom Ausmaß der renalen Einwanderung knochenmarksstämmiger Leukozyten ist und damit im Umkehrschluss tatsächlich primär von intrinsischen Nierenzellen ausgeht.

Die *in vitro*-Daten legen damit nahe, dass die reduzierte Expression inflammatorischer Mediatoren in nephritischen mTNF-Nieren tatsächlich primär durch das Fehlen einer löslichen TNF-Produktion in intrinsischen Nierenzellen hervorgerufen wird, was nachfolgend trotz vermehrtem mTNF-vermittelten Nierenschaden eine geringere renale Leukozyteninfiltration bedingt. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Studien mit knochenmarkschimären Mäusen wie die von Timoshanko et al. im Modell der autologen NTN [121] und von Zhang et al. in der Cisplatin-induzierten Nephropathie [144] oder den Studien zur Entwicklung eines arteriellen Hypertonus bei chronischen Nierenerkrankungen [183]. In diesen Studien wurde TNF exprimiert von intrinsischen Nierenzellen und nicht von einwandernden Leukozyten als ausschlaggebend für die Nierenschädigung beschrieben.

4.2. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

4.2.1. Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass membranständig exprimiertes TNF eine entscheidende Rolle in der frühen Vermittlung des glomerulären Gewebeschadens in der Immunkomplex-Glomerulonephritis bei Mäusen spielt. Der akut schädigende Effekt von membranständigem TNF beruht möglicherweise auf der Induktion des Zelltods in Form von Nekroptose in intrinsischen Nierenzellen. Dabei scheint ein entscheidender Angriffspunkt die glomerulären Endothelzellen zu sein, die durch juxtakrine Interaktion mit mTNF-exprimierenden intrinsischen Nierenzellen oder auch zirkulierenden Leukozyten vermehrt geschädigt werden, was gemeinsam mit einem begleitenden Podozytenschaden zu einer Funktionseinschränkung der glomerulären Filtrationsbarriere führt und damit eine stärkere Proteinurie verursacht. Auf molekularer Ebene könnte entsprechend der

vorgelegten Ergebnisse eine vermehrte Nekroptoseinduktion die Folge einer geringeren NF κ B-Aktivierung durch Abwesenheit von löslichem TNF bei ausschließlicher Expression von membranständigem TNF sein, die dazu führt, dass weniger Apoptose/Nekroptose-Hemmer wie cIAP1 oder XIAP induziert werden. Auch eine direkte Zelltodinduktion durch membranständiges TNF nach Bindung an seinen bevorzugten Rezeptor TNFR2 erscheint möglich. Konsistent hierzu sind Vorarbeiten im autologen NTN-Modell, in der eine prominente Expression von TNFR2 in glomerulären Endothelzellen vorlag und TNFR2-Defizienz in intrinsischen Nierenzellen die Ausbildung einer renalen Schädigung und Nephritis komplett verhinderte, während TNFR1-Defizienz nur zu einem verzögerten Auftreten der NTN führte [116].

Interessanterweise zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass der Mechanismus der mTNF-abhängigen renalen Gewebeschädigung unabhängig von der renalen Leukozyteneinwanderung und auch von der Genexpression anderer proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β oder IL-6 in den nephritischen Nieren ist. Die Expression beider Zytokine, bei denen in Studien der NTN eine wichtige pathophysiologische Rolle nachgewiesen werden konnte, zeigten sich in den nephritischen Nieren der mTNF-Mäuse, trotz schlechterer Nierenfunktion und größerem renalem Gewebeschaden signifikant verringert. Damit konnte erstmalig die gewebeschädigende Wirkung von membranständig exprimiertem TNF unabhängig von löslichem TNF in der akuten Immunkomplex- Glomerulonephritis aufgezeigt werden. Außerdem bestätigt die vorliegende Arbeit das Konzept, das lösliches TNF als entscheidender Mediator der NF κ B-abhängigen Zytokin- und Chemokinproduktion und der renalen Leukozyteninfiltration fungiert. Dies wird auch durch die eigenen Vordaten der Arbeitsgruppe unterstützt, die in isolierten Glomeruli nach *in vitro*-Stimulation mit löslichem TNF eine TNFR1-, nicht jedoch TNFR2-abhängige Expression inflammatorischer Mediatoren beschreiben [178].

4.2.2. Ausblick

Angesichts der großen Unterschiede bei Ergebnissen mit TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen in der autologen NTN und des nachgewiesenen Einflusses dieser beiden Rezeptoren auf die Ausbildung autoimmunologischer Prozesse, bleibt die Untersuchung der jeweils spezifischen durch TNFR1- und TNFR2-vermittelten Effekte im durch membranständigen TNF hervorgerufenen Phänotyp von großer Bedeutung. Ein geeignetes Modell, um dieser Fragestellung nachzugehen, besteht in der Einkreuzung der mTNF-Mäuse mit jeweils TNFR1- oder TNFR2-defizienten Mäusen, die eine spezifische Betrachtung der Rezeptorfunktion in der mTNF-Wirkung ermöglichen würde. Ein weiterer interessanter Ansatz, um die Hypothese zu bestätigen, dass membranständiges TNF auf intrinsischen Nierenzellen von größerer Bedeutung für die Ausbildung des Gewebeschadens ist, als das auf einwandernden Leukozyten, liegt in der Herstellung von knochenmarkschimären Mäusen. Durch die Transplantation von Knochenmark aus Wildtyp-Mäusen in transgene mTNF-Mäuse und umgekehrt wäre es möglich, das NTN-Modell in Versuchstieren zu testen, die membranständiges TNF und kein lösliches TNF entweder nur auf einwandernden Leukozyten oder nur auf intrinsischen Nierenzellen exprimieren.

Außerdem sollte im Zuge weiterer Experimente der Frage nachgegangen werden, in wie weit die alleinige Expression von membranständigem TNF in den transgenen Mäusen für den jeweiligen Phänotyp verantwortlich ist und welche Rolle dabei die Abwesenheit von löslichem TNF in diesem Kontext spielt. Um diese Frage zu beantworten, könnte das lösliche TNF selektiv durch das dominant negative TNF-Biologikum *XENP1595* in Wildtyp-Mäusen geblockt werden, ohne jedoch die Signalübermittlung durch das transmembrane TNF zu beeinflussen. Die Ergebnisse könnten dann mit denen der mTNF-Mäuse oder bei kompletter TNF-Blockade durch einen pan-TNF-Inhibitor verglichen werden. Weitere geplante Experimente sind außerdem die Untersuchung der funktionellen Rolle von membranständigem TNF in anderen akuten renalen Krankheitsmodellen, wie einer primär tubulären Schädigung im Ischämie-Reperfusion-Modell oder dem Medikamenten-induzierten akutem Nierenversagen im Modell der durch Cisplatin induzierten Nephropathie.

Die Identifizierung von membranständigem TNF als Vermittler der renalen Gewebeschädigung in der Glomerulonephritis macht die transmembrane TNF-Form zu

einem potentiellen therapeutischen Zielmolekül bei entzündlichen Nierenerkrankungen. Eine selektive Blockade von gewebeschädigendem membranständigem TNF könnte effektiver und im Vergleich zu einer kompletten TNF-Blockade wie durch Etanercept oder Infliximab, weniger immunsuppressiv sein. Jedoch lässt sich eine spezifische mTNF-Blockade momentan noch nicht realisieren, da noch kein passender Wirkstoff mit diesen Eigenschaften in klinischer Erprobung ist. Aus diesem Grund sind weitere Studien erforderlich, die die Rolle von membranständigem TNF bei der renalen Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung, der Nekroinflammation, genauer definieren und die Möglichkeit eines spezifischen therapeutischen Ansatzes in entzündlichen Nierenerkrankungen untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. 2002: http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/toc.htm.
2. International Society of Nephrology. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Volume 3, Issue 1, 2013. http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf.
3. Registry E-E. ERA-EDTA Registry Annual Report 2013: <http://www.era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2013.pdf> 2013.
4. Geberth S, Nowack R. Praxis der Dialyse. Berlin: Springer; 2014.
5. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013;382:260-72.
6. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2095-128.
7. United States Renal Data System. 2014 Annual Data Report. Minneapolis, MN, USA 2014. http://www.usrds.org/2014/view/v1_00.aspx.
8. United States Renal Data System. Minneapolis, MN, USA 2013; <http://www.usrds.org/reference.aspx>.
9. Frei U, Schober-Halstenberg H-J. Nierenersatztherapie in Deutschland, Jahresbericht 2006/2007. Berlin: QuaSi Niere gmbH; 2008.
10. Deutsche Gesellschaft für Nephrologie e. V. Statistik Dialyse. 2013 <http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich/dialysehtml>.
11. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Organspende und Transplantation in Deutschland 2016. https://www.dso.de/uploads/tx_dsodl/JB_2016_Web.pdf.
12. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, Matsushita K, Wen CP. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*. 2013;382:339-52.
13. Weiner DE, Tighiouart H, Amin MG, Stark PC, MacLeod B, Griffith JL, Salem DN, Levey AS, Sarnak MJ. Chronic kidney disease as a risk factor for cardiovascular disease and all-cause mortality: a pooled analysis of community-based studies. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1307-15.
14. Barsoum RS. Chronic kidney disease in the developing world. *N Engl J Med*. 2006;354:997-9.
15. Fauci A BE, Kasper D, Hauser S. Harrisons's Principles of Internal Medicine. Columbus, OH, USA: The McGraw-Hill Companies; 2008.
16. Klinke R, Pape H-C, Silbernagl S. Physiologie. Stuttgart: Thieme Verlag; 2010.
17. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R. Duale Reihe Physiologie. Stuttgart: Thieme; 2012.
18. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Organspende und Transplantation in Deutschland 2013. http://www.dso.de/uploads/tx_dsodl/JB_2013_Web_05.pdf.

19. Javaid B, Quigg RJ. Treatment of glomerulonephritis: will we ever have options other than steroids and cytotoxics? *Kidney Int.* 2005;67:1692-703.
20. Heitz PU, Böcker W. *Pathologie*. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2012.
21. Kuhlmann U, Walb D, Luft F. *Nephrologie, Pathophysiologie - Klinik - Nierenersatzverfahren*. Stuttgart: Thieme Verlag; 2008.
22. Riede U-N. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart: Thieme; 2004.
23. Krams M. *Kurzlehrbuch Pathologie*. Stuttgart: Thieme; 2013.
24. Unanue ER, Dixon FJ. Experimental glomerulonephritis: immunological events and pathogenetic mechanisms. *Adv Immunol.* 1967;6:1-90.
25. Smadel JE. Experimental nephritis in rats induced by injection of anti-kidney serum: III. Pathological studies of the acute and chronic disease. *J Exp Med.* 1937;65:541-55.
26. Hoppe JM, Vielhauer V. Induction and analysis of nephrotoxic serum nephritis in mice. *Methods Mol Biol.* 2014;1169:159-74.
27. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214:149-60.
28. Beutler B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Investig Med.* 1995;43:227-35.
29. Vielhauer V, Mayadas TN. Functions of TNF and its receptors in renal disease: distinct roles in inflammatory tissue injury and immune regulation. *Semin Nephrol.* 2007;27:286-308.
30. Al-Lamki RS, Mayadas TN. TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction. *Kidney Int.* 2015;87:281-96.
31. Behm BW, Bickston SJ. Tumor necrosis factor-alpha antibody for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008CD006893.
32. Chaudhari U, Romano P, Mulcahy LD, Dooley LT, Baker DG, Gottlieb AB. Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial. *Lancet.* 2001;357:1842-7.
33. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:364-71.
34. van Deventer SJ. Transmembrane TNF-alpha, induction of apoptosis, and the efficacy of TNF-targeting therapies in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2001;121:1242-6.
35. Piga M, Chessa E, Ibba V, Mura V, Floris A, Cauli A, Mathieu A. Biologics-induced autoimmune renal disorders in chronic inflammatory rheumatic diseases: systematic literature review and analysis of a monocentric cohort. *Autoimmun Rev.* 2014;13:873-9.
36. Richez C, Blanco P, Dumoulin C, Schaevebeke T. Lupus erythematosus manifestations exacerbated by etanercept therapy in a patient with mixed connective tissue disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2005;23:273.
37. Stokes MB, Foster K, Markowitz GS, Ebrahimi F, Hines W, Kaufman D, Moore B, Wolde D, D'Agati VD. Development of glomerulonephritis during anti-TNF-alpha therapy for rheumatoid arthritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20:1400-6.
38. Kassiotis G, Kollias G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med.* 2001;193:427-34.

39. van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, Boringa JB, Bertelsmann FW, von Blomberg BM, Woody JN, Hartung HP, Polman CH. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology*. 1996;47:1531-4.
40. Hernandez T, Mayadas TN. Immunoregulatory role of TNFalpha in inflammatory kidney diseases. *Kidney Int*. 2009;76:262-76.
41. Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14:185-91.
42. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995;2:561-72.
43. de Oliveira Pinto LM, Garcia S, Lecoer H, Rapp C, Gougeon ML. Increased sensitivity of T lymphocytes to tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)- and TNFR2-mediated apoptosis in HIV infection: relation to expression of Bcl-2 and active caspase-8 and caspase-3. *Blood*. 2002;99:1666-75.
44. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*. 2001;345:1098-104.
45. Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest*. 1988;81:1925-37.
46. Tumanov AV, Kuprash DV, Mach JA, Nedospasov SA, Chervonsky AV. Lymphotoxin and TNF produced by B cells are dispensable for maintenance of the follicle-associated epithelium but are required for development of lymphoid follicles in the Peyer's patches. *J Immunol*. 2004;173:86-91.
47. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal*. 2012;24:1297-305.
48. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25:453-72.
49. Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:3127-31.
50. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal*. 2002;14:477-92.
51. Schwarz M, Taubitz A, Eltrich N, Mulay SR, Allam R, Vielhauer V. Analysis of TNF-mediated recruitment and activation of glomerular dendritic cells in mouse kidneys by compartment-specific flow cytometry. *Kidney Int*. 2013;84:116-29.
52. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature*. 1985;318:665-7.
53. Decker T, Lohmann-Matthes ML, Gifford GE. Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J Immunol*. 1987;138:957-62.
54. Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell*. 1990;63:251-8.
55. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL, et al. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*. 1994;370:555-7.

56. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995;83:793-802.
57. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997;385:729-33.
58. Naude PJ, den Boer JA, Luiten PG, Eisel UL. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J*. 2011;278:888-98.
59. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002;296:1634-5.
60. Christofferson DE, Li Y, Yuan J. Control of life-or-death decisions by RIP1 kinase. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:129-50.
61. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines. *Semin Immunol*. 2014;26:253-66.
62. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*. 2015;517:311-20.
63. Mahul-Mellier AL, Pazarentzos E, Datler C, Iwasawa R, AbuAli G, Lin B, Grimm S. De-ubiquitinating protease USP2a targets RIP1 and TRAF2 to mediate cell death by TNF. *Cell Death Differ*. 2012;19:891-9.
64. Dannappel M, Vlantis K, Kumari S, Polykratis A, Kim C, Wachsmuth L, Eftychi C, Lin J, Corona T, Hermance N, Zelic M, Kirsch P, Basic M, Bleich A, Kelliher M, et al. RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis. *Nature*. 2014;513:90-4.
65. Dillon CP, Weinlich R, Rodriguez DA, Cripps JG, Quarato G, Gurung P, Verbist KC, Brewer TL, Llambi F, Gong YN, Janke LJ, Kelliher MA, Kanneganti TD, Green DR. RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3. *Cell*. 2014;157:1189-202.
66. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*. 1998;8:297-303.
67. Walsh CM. Grand challenges in cell death and survival: apoptosis vs. necroptosis. *Front Cell Dev Biol*. 2014;2:3.
68. Feng S, Yang Y, Mei Y, Ma L, Zhu DE, Hoti N, Castanares M, Wu M. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell Signal*. 2007;19:2056-67.
69. Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;35C:14-23.
70. Marchetti L, Klein M, Schlett K, Pfizenmaier K, Eisel UL. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway. *J Biol Chem*. 2004;279:32869-81.
71. Rauert H, Wicovsky A, Muller N, Siegmund D, Spindler V, Waschke J, Kneitz C, Wajant H. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *J Biol Chem*. 2010;285:7394-404.
72. Matsuzawa A, Tseng PH, Vallabhapurapu S, Luo JL, Zhang W, Wang H, Vignali DA, Gallagher E, Karin M. Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science*. 2008;321:663-8.
73. Sabio G, Davis RJ. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol*. 2014;26:237-45.

74. Chandrasekharan UM, Mavrakis L, Bonfield TL, Smith JD, DiCorleto PE. Decreased atherosclerosis in mice deficient in tumor necrosis factor- α receptor-II (p75). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:e16-7.
75. Depuydt B, van Loo G, Vandenabeele P, Declercq W. Induction of apoptosis by TNF receptor 2 in a T-cell hybridoma is FADD dependent and blocked by caspase-8 inhibitors. *J Cell Sci.* 2005;118:497-504.
76. Biragyn A, Coscia M, Nagashima K, Sanford M, Young HA, Olkhanud P. Murine beta-defensin 2 promotes TLR-4/MyD88-mediated and NF-kappaB-dependent atypical death of APCs via activation of TNFR2. *J Leukoc Biol.* 2008;83:998-1008.
77. Herbein G, Mahlknecht U, Batliwalla F, Gregersen P, Pappas T, Butler J, O'Brien WA, Verdin E. Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature.* 1998;395:189-94.
78. Ban L, Zhang J, Wang L, Kuhlreiber W, Burger D, Faustman DL. Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:13644-9.
79. Crowe PD, Walter BN, Mohler KM, Otten-Evans C, Black RA, Ware CF. A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995;181:1205-10.
80. Xanthoulea S, Pasparakis M, Kousteni S, Brakebusch C, Wallach D, Bauer J, Lassmann H, Kollias G. Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases. *J Exp Med.* 2004;200:367-76.
81. Idasiak-Piechocka I, Oko A, Pawliczak E, Kaczmarek E, Czekalski S. Urinary excretion of soluble tumour necrosis factor receptor 1 as a marker of increased risk of progressive kidney function deterioration in patients with primary chronic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:3948-56.
82. Weiss T, Grell M, Siemienski K, Muhlenbeck F, Durkop H, Pfizenmaier K, Scheurich P, Wajant H. TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60. *J Immunol.* 1998;161:3136-42.
83. Chan FK, Lenardo MJ. A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2000;30:652-60.
84. Fotin-Mleczek M, Henkler F, Samel D, Reichwein M, Hausser A, Parmryd I, Scheurich P, Schmid JA, Wajant H. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci.* 2002;115:2757-70.
85. Rauert H, Stuhmer T, Bargou R, Wajant H, Siegmund D. TNFR1 and TNFR2 regulate the extrinsic apoptotic pathway in myeloma cells by multiple mechanisms. *Cell Death Dis.* 2011;2:e194.
86. Cabal-Hierro L, Artime N, Iglesias J, Prado MA, Ugarte-Gil L, Casado P, Fernandez-Garcia B, Darnay BG, Lazo PS. A TRAF2 binding independent region of TNFR2 is responsible for TRAF2 depletion and enhancement of cytotoxicity driven by TNFR1. *Oncotarget.* 2014;5:224-36.
87. Cabal-Hierro L, Rodriguez M, Artime N, Iglesias J, Ugarte L, Prado MA, Lazo PS. TRAF-mediated modulation of NF-kB and JNK Activation by TNFR2. *Cell Signal.* 2014;26:2658-66.
88. Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:482-93.
89. Declercq W, Vandenabeele P, Fiers W. Dimerization of chimeric erythropoietin/75 kDa tumour necrosis factor (TNF) receptors transduces TNF signals: necessity for the 75 kDa-TNF receptor transmembrane domain. *Cytokine.* 1995;7:701-9.
90. Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:353-66.

91. Zhang H, Yan D, Shi X, Liang H, Pang Y, Qin N, Chen H, Wang J, Yin B, Jiang X, Feng W, Zhang W, Zhou M, Li Z. Transmembrane TNF-alpha mediates "forward" and "reverse" signaling, inducing cell death or survival via the NF-kappaB pathway in Raji Burkitt lymphoma cells. *J Leukoc Biol.* 2008;84:789-97.
92. Eissner G, Kirchner S, Lindner H, Kolch W, Janosch P, Grell M, Scheurich P, Andreesen R, Holler E. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. *J Immunol.* 2000;164:6193-8.
93. Agostini C, Sancetta R, Cerutti A, Semenzato G. Alveolar macrophages as a cell source of cytokine hyperproduction in HIV-related interstitial lung disease. *J Leukoc Biol.* 1995;58:495-500.
94. Armstrong L, Thickett DR, Christie SJ, Kendall H, Millar AB. Increased expression of functionally active membrane-associated tumor necrosis factor in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;22:68-74.
95. Kresse M, Latta M, Kunstle G, Riehle HM, van Rooijen N, Hentze H, Tiegs G, Biburger M, Lucas R, Wendel A. Kupffer cell-expressed membrane-bound TNF mediates melphalan hepatotoxicity via activation of both TNF receptors. *J Immunol.* 2005;175:4076-83.
96. Kusters S, Tiegs G, Alexopoulou L, Pasparakis M, Douni E, Kunstle G, Bluethmann H, Wendel A, Pfizenmaier K, Kollias G, Grell M. In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. *Eur J Immunol.* 1997;27:2870-5.
97. Dibbs ZI, Diwan A, Nemoto S, DeFreitas G, Abdellatif M, Carabello BA, Spinale FG, Feuerstein G, Sivasubramanian N, Mann DL. Targeted overexpression of transmembrane tumor necrosis factor provokes a concentric cardiac hypertrophic phenotype. *Circulation.* 2003;108:1002-8.
98. Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:81-101.
99. Perrier C, de Hertogh G, Cremer J, Vermeire S, Rutgeerts P, Van Assche G, Szymkowski DE, Ceuppens JL. Neutralization of membrane TNF, but not soluble TNF, is crucial for the treatment of experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19:246-53.
100. Khera TK, Copland DA, Boldison J, Lait PJ, Szymkowski DE, Dick AD, Nicholson LB. Tumour necrosis factor-mediated macrophage activation in the target organ is critical for clinical manifestation of uveitis. *Clin Exp Immunol.* 2012;168:165-77.
101. Olleros ML, Vesin D, Fotio AL, Santiago-Raber ML, Tauzin S, Szymkowski DE, Garcia I. Soluble TNF, but not membrane TNF, is critical in LPS-induced hepatitis. *J Hepatol.* 2010;53:1059-68.
102. Olleros ML, Vesin D, Bisig R, Santiago-Raber ML, Schuepbach-Mallepell S, Kollias G, Gaide O, Garcia I. Membrane-bound TNF induces protective immune responses to *M. bovis* BCG infection: regulation of memTNF and TNF receptors comparing two memTNF molecules. *PLoS ONE.* 2012;7:e31469.
103. Mueller C, Corazza N, Trachsel-Loseth S, Eugster HP, Buhler-Jungo M, Brunner T, Imboden MA. Noncleavable transmembrane mouse tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) mediates effects distinct from those of wild-type TNFalpha in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1999;274:38112-8.
104. Torres D, Janot L, Quesniaux VF, Grivennikov SI, Maillat I, Sedgwick JD, Ryffel B, Erard F. Membrane tumor necrosis factor confers partial protection to *Listeria* infection. *Am J Pathol.* 2005;167:1677-87.
105. Eis V, Luckow B, Vielhauer V, Siveke JT, Linde Y, Segerer S, Perez De Lema G, Cohen CD, Kretzler M, Mack M, Horuk R, Murphy PM, Gao JL, Hudkins KL, Alpers CE, et al. Chemokine receptor CCR1 but not CCR5 mediates leukocyte recruitment and subsequent renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:337-47.

106. Le Hir M, Haas C, Marino M, Ryffel B. Prevention of crescentic glomerulonephritis induced by anti-glomerular membrane antibody in tumor necrosis factor-deficient mice. *Lab Invest.* 1998;78:1625-31.
107. Tomosugi NI, Cashman SJ, Hay H, Pusey CD, Evans DJ, Shaw A, Rees AJ. Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by bacterial lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and IL-1. *J Immunol.* 1989;142:3083-90.
108. Marlor CW, Webb DL, Bombara MP, Greve JM, Blue ML. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in fibroblastlike synoviocytes after stimulation with tumor necrosis factor. *Am J Pathol.* 1992;140:1055-60.
109. Kneilling M, Mailhammer R, Hultner L, Schonberger T, Fuchs K, Schaller M, Bukala D, Massberg S, Sander CA, Braumuller H, Eichner M, Maier KL, Hallmann R, Pichler BJ, Haubner R, et al. Direct crosstalk between mast cell-TNF and TNFR1-expressing endothelia mediates local tissue inflammation. *Blood.* 2009;114:1696-706.
110. Griffin GK, Newton G, Tarrío ML, Bu DX, Maganto-García E, Azcutia V, Alcaide P, Gräbie N, Luscinskas FW, Croce KJ, Lichtman AH. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol.* 2012;188:6287-99.
111. Al-Lamki RS, Wang J, Skepper JN, Thiru S, Pober JS, Bradley JR. Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Lab Invest.* 2001;81:1503-15.
112. Bruggeman LA, Drawz PE, Kahoud N, Lin K, Barisoni L, Nelson PJ. TNFR2 interposes the proliferative and NF- κ B-mediated inflammatory response by podocytes to TNF- α . *Lab Invest.* 2011;91:413-25.
113. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lindenmeyer MT, Vielhauer V. Distinct contributions of TNF receptor 1 and 2 to TNF-induced glomerular inflammation in mice. *PLoS ONE.* 2013;8:e68167.
114. Al-Lamki RS, Wang J, Vandenabeele P, Bradley JA, Thiru S, Luo D, Min W, Pober JS, Bradley JR. TNFR1- and TNFR2-mediated signaling pathways in human kidney are cell type-specific and differentially contribute to renal injury. *FASEB J.* 2005;19:1637-45.
115. Hoffmann U, Bergler T, Rihm M, Pace C, Krüger B, Rummele P, Stoelcker B, Banas B, Mannel DN, Kramer BK. Upregulation of TNF receptor type 2 in human and experimental renal allograft rejection. *Am J Transplant.* 2009;9:675-86.
116. Vielhauer V, Stavrakis G, Mayadas TN. Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis. *J Clin Invest.* 2005;115:1199-209.
117. Tipping PG, Leong TW, Holdsworth SR. Tumor necrosis factor production by glomerular macrophages in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in rabbits. *Lab Invest.* 1991;65:272-9.
118. Baud L, Oudinet JP, Bens M, Noe L, Peraldi MN, Rondeau E, Etienne J, Ardaillou R. Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide. *Kidney Int.* 1989;35:1111-8.
119. Rosa AC, Rattazzi L, Miglio G, Collino M, Fantozzi R. Angiotensin II induces tumor necrosis factor- α expression and release from cultured human podocytes. *Inflamm Res.* 2012;61:311-7.
120. Zager RA, Johnson AC, Hanson SY, Lund S. Ischemic proximal tubular injury primes mice to endotoxin-induced TNF- α generation and systemic release. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289:F289-97.
121. Timoshanko JR, Sedgwick JD, Holdsworth SR, Tipping PG. Intrinsic renal cells are the major source of tumor necrosis factor contributing to renal injury in murine crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:1785-93.

122. Ruuls SR, Hoek RM, Ngo VN, McNeil T, Lucian LA, Janatpour MJ, Korner H, Scheerens H, Hessel EM, Cyster JG, McEvoy LM, Sedgwick JD. Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation. *Immunity*. 2001;15:533-43.
123. Lichtnekert J, Kulkarni OP, Mulay SR, Rupanagudi KV, Ryu M, Allam R, Vielhauer V, Muruve D, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Anders HJ. Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1. *PLoS ONE*. 2011;6:e26778.
124. Vielhauer V. Compartment-specific flow cytometry for the analysis of TNF-mediated recruitment and activation of glomerular leukocytes in murine kidneys. *Methods Mol Biol*. 2014;1155:173-86.
125. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson BR, Saito Y, Betsholtz C. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol*. 2002;161:799-805.
126. El Nahas AM, Zoob SN, Evans DJ, Rees AJ. Chronic renal failure after nephrotoxic nephritis in rats: contributions to progression. *Kidney Int*. 1987;32:173-80.
127. Vielhauer V, Anders HJ, Mack M, Cihak J, Strutz F, Stangassinger M, Luckow B, Grone HJ, Schlondorff D. Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:1173-87.
128. Linkermann A, Hackl MJ, Kunzendorf U, Walczak H, Krautwald S, Jevnikar AM. Necroptosis in immunity and ischemia-reperfusion injury. *Am J Transplant*. 2013;13:2797-804.
129. Linkermann A, Heller JO, Prokai A, Weinberg JM, De Zen F, Himmerkus N, Szabo AJ, Brasen JH, Kunzendorf U, Krautwald S. The RIP1-kinase inhibitor necrostatin-1 prevents osmotic nephrosis and contrast-induced AKI in mice. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24:1545-57.
130. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*. 2009;137:1100-11.
131. Andersen K, Eltrich N, Lichtnekert J, Anders HJ, Vielhauer V. The NLRP3/ASC inflammasome promotes T-cell-dependent immune complex glomerulonephritis by canonical and noncanonical mechanisms. *Kidney Int*. 2014;86:965-78.
132. Robertson H, Wheeler J, Morley AR. Anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in the mouse: the role of macrophages. *Int J Exp Pathol*. 1995;76:157-62.
133. Devi S, Li A, Westhorpe CL, Lo CY, Abeynaike LD, Snelgrove SL, Hall P, Ooi JD, Sobey CG, Kitching AR, Hickey MJ. Multiphoton imaging reveals a new leukocyte recruitment paradigm in the glomerulus. *Nat Med*. 2013;19:107-12.
134. Kuligowski MP, Kitching AR, Hickey MJ. Leukocyte recruitment to the inflamed glomerulus: a critical role for platelet-derived P-selectin in the absence of rolling. *J Immunol*. 2006;176:6991-9.
135. Vielhauer V, Kulkarni O, Reichel CA, Anders HJ. Targeting the recruitment of monocytes and macrophages in renal disease. *Semin Nephrol*. 2010;30:318-33.
136. Wertz IE. TNFR1-activated NF-kappaB signal transduction: regulation by the ubiquitin/proteasome system. *Curr Opin Chem Biol*. 2014;23:71-7.
137. Estornes Y, Bertrand MJ. IAPs, regulators of innate immunity and inflammation. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;39:106-14.

138. Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* 1995;14:2876-83.
139. Takahashi N, Vereecke L, Bertrand MJ, Duprez L, Berger SB, Divert T, Goncalves A, Sze M, Gilbert B, Kourula S, Goossens V, Lefebvre S, Gunther C, Becker C, Bertin J, et al. RIPK1 ensures intestinal homeostasis by protecting the epithelium against apoptosis. *Nature.* 2014;513:95-9.
140. Timoshanko JR, Kitching AR, Iwakura Y, Holdsworth SR, Tipping PG. Contributions of IL-1beta and IL-1alpha to crescentic glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:910-8.
141. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005;115:1-20.
142. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA, Jr. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol.* 1986;136:1680-7.
143. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, Brennan FM, Walker J, Bijl H, Ghayeb J, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 1993;36:1681-90.
144. Zhang B, Ramesh G, Norbury CC, Reeves WB. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells. *Kidney Int.* 2007;72:37-44.
145. McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC, Jr., Boyer CM, Champion B, Connolly KM, Conway JG, Furdon P, Karp S, Kidao S, et al. Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature.* 1994;370:558-61.
146. Decoster E, Vanhaesebroeck B, Vandenabeele P, Grooten J, Fiers W. Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J Biol Chem.* 1995;270:18473-8.
147. DeBerge MP, Ely KH, Enelow RI. Soluble, but not transmembrane, TNF-alpha is required during influenza infection to limit the magnitude of immune responses and the extent of immunopathology. *J Immunol.* 2014;192:5839-51.
148. Laus Filho JA, Hadler WA. [Pneumopathy induced in rat by nephrotoxic sera (rabbit anti-rat-kidney and anti-rat-lung sera)]. *Rev Assoc Med Bras.* 1960;6:185-96.
149. Markowitz AS, Battifora HA, Schwartz F, Aseron C. Immunological aspects of Goodpasture's syndrome. *Clin Exp Immunol.* 1968;3:585-91.
150. Chen H, Xiao L, Zhang H, Liu N, Liu T, Liu L, Hu X, Yan D, Yang K, Yin B, Wang J, Li Q, Li Z. The involvement of beta-actin in the signaling of transmembrane TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *J Leukoc Biol.* 2011;89:917-26.
151. Ardestani S, Deskins DL, Young PP. Membrane TNF-alpha-activated programmed necrosis is mediated by Ceramide-induced reactive oxygen species. *J Mol Signal.* 2013;8:12.
152. Yang B, Johnson TS, Thomas GL, Watson PF, Wagner B, Nahas AM. Apoptosis and caspase-3 in experimental anti-glomerular basement membrane nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:485-95.
153. Georgopoulos S, Plows D, Kollias G. Transmembrane TNF is sufficient to induce localized tissue toxicity and chronic inflammatory arthritis in transgenic mice. *J Inflamm.* 1996;46:86-97.

154. Venkatesh D, Hernandez T, Rosetti F, Batal I, Cullere X, Luscinskas FW, Zhang Y, Stavrakis G, Garcia-Cardena G, Horwitz BH, Mayadas TN. Endothelial TNF receptor 2 induces IRF1 transcription factor-dependent interferon-beta autocrine signaling to promote monocyte recruitment. *Immunity*. 2013;38:1025-37.
155. Kumar SV, Kulkarni OP, Mulay SR, Darisipudi MN, Romoli S, Thomasova D, Scherbaum CR, Hohenstein B, Hugo C, Muller S, Liapis H, Anders HJ. Neutrophil extracellular trap-related extracellular histones cause vascular necrosis in severe GN. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:2399-413.
156. Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:2974-84.
157. Atreya R, Zimmer M, Bartsch B, Waldner MJ, Atreya I, Neumann H, Hildner K, Hoffman A, Kiesslich R, Rink AD, Rau TT, Rose-John S, Kessler H, Schmidt J, Neurath MF. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14(+) macrophages. *Gastroenterology*. 2011;141:2026-38.
158. Sicotte NL, Voskuhl RR. Onset of multiple sclerosis associated with anti-TNF therapy. *Neurology*. 2001;57:1885-8.
159. Steinman L, Zamvil SS. Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends Immunol*. 2005;26:565-71.
160. Steed PM, Tansey MG, Zalevsky J, Zhukovsky EA, Desjarlais JR, Szymkowski DE, Abbott C, Carmichael D, Chan C, Cherry L, Cheung P, Chirino AJ, Chung HH, Doberstein SK, Eivazi A, et al. Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. *Science*. 2003;301:1895-8.
161. Taoufik E, Tseveleki V, Chu SY, Tselios T, Karin M, Lassmann H, Szymkowski DE, Probert L. Transmembrane tumour necrosis factor is neuroprotective and regulates experimental autoimmune encephalomyelitis via neuronal nuclear factor-kappaB. *Brain*. 2011;134:2722-35.
162. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:738-53.
163. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, Dong Z. Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25:2689-701.
164. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med*. 2014;370:455-65.
165. Linkermann A, Brasen JH, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller JO, De Zen F, Weinlich R, Ortiz A, Walczak H, Weinberg JM, Green DR, Kunzendorf U, Krautwald S. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:12024-9.
166. Heller RA, Song K, Fan N, Chang DJ. The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell*. 1992;70:47-56.
167. Cusson N, Oikemus S, Kilpatrick ED, Cunningham L, Kelliher M. The death domain kinase RIP protects thymocytes from tumor necrosis factor receptor type 2-induced cell death. *J Exp Med*. 2002;196:15-26.
168. Weiss T, Grell M, Hessabi B, Bourteele S, Muller G, Scheurich P, Wajant H. Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J Immunol*. 1997;158:2398-404.
169. Feoktistova M, Geserick P, Kellert B, Dimitrova DP, Langlais C, Hupe M, Cain K, MacFarlane M, Hacker G, Leverkus M. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell*. 2011;43:449-63.

170. Yabal M, Muller N, Adler H, Knies N, Gross CJ, Damgaard RB, Kanegane H, Ringelhan M, Kaufmann T, Heikenwalder M, Strasser A, Gross O, Ruland J, Peschel C, Gyrd-Hansen M, et al. XIAP restricts TNF- and RIP3-dependent cell death and inflammasome activation. *Cell Rep.* 2014;7:1796-808.
171. Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Kawachi H, Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M. Activated macrophages down-regulate podocyte nephrin and podocin expression via stress-activated protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376:706-11.
172. Koshikawa M, Mukoyama M, Mori K, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Nagae T, Yokoi H, Kawachi H, Shimizu F, Sugawara A, Nakao K. Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:2690-701.
173. Hu X, Li B, Li X, Zhao X, Wan L, Lin G, Yu M, Wang J, Jiang X, Feng W, Qin Z, Yin B, Li Z. Transmembrane TNF-alpha promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J Immunol.* 2014;192:1320-31.
174. Duffield JS, Tipping PG, Kipari T, Cailhier JF, Clay S, Lang R, Bonventre JV, Hughes J. Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol.* 2005;167:1207-19.
175. Hochheiser K, Engel DR, Hammerich L, Heymann F, Knolle PA, Panzer U, Kurts C. Kidney dendritic cells become pathogenic during crescentic glomerulonephritis with proteinuria. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22:306-16.
176. Rosenkranz AR, Knight S, Sethi S, Alexander SI, Cotran RS, Mayadas TN. Regulatory interactions of alphabeta and gammadelta T cells in glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2000;58:1055-66.
177. Tipping PG, Huang XR, Qi M, Van GY, Tang WW. Crescentic glomerulonephritis in CD4- and CD8-deficient mice. Requirement for CD4 but not CD8 cells. *Am J Pathol.* 1998;152:1541-8.
178. Taubitz A. TNF-Rezeptor 1- und 2-spezifische Entzündungsreaktionen im Glomerulus. Dissertation. LMU München, Medizinische Fakultät. 2012.
179. Puimege L, Libert C, Van Hauwermeiren F. Regulation and dysregulation of tumor necrosis factor receptor-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25:285-300.
180. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature.* 2004;430:694-9.
181. Rossol M, Meusch U, Pierer M, Kaltenhauser S, Hantzschel H, Hauschildt S, Wagner U. Interaction between transmembrane TNF and TNFR1/2 mediates the activation of monocytes by contact with T cells. *J Immunol.* 2007;179:4239-48.
182. Christofferson DE, Li Y, Hitomi J, Zhou W, Upperman C, Zhu H, Gerber SA, Gygi S, Yuan J. A novel role for RIP1 kinase in mediating TNFalpha production. *Cell Death Dis.* 2012;3:e320.
183. Zhang J, Patel MB, Griffiths R, Mao A, Song YS, Karlovich NS, Sparks MA, Jin H, Wu M, Lin EE, Crowley SD. Tumor necrosis factor-alpha produced in the kidney contributes to angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension.* 2014;64:1275-81.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben. Insbesondere sind das die Folgenden:

Meine Eltern, Gertrud und Bernhard, die mich lehrten meinen eigenen Weg zu finden und die mich auf diesem Weg liebevoll und mit uneingeschränktem Vertrauen begleiten.

Besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Volker Vielhauer für seine exzellente Betreuung, und für sein enthusiastisches Engagement für seine Arbeitsgruppe. Mit seinem wissenschaftlichen Weitblick schaffte er es mich immer wieder zu motivieren und für die Forschung zu begeistern. Sein Wissen vermochte er in spannenden und lehrreichen Diskussionen stets mit einem zu teilen. Durch ihn hatte ich die Möglichkeit einen großartigen Einblick in die Welt der experimentellen Forschung zu erlangen, der mich nachhaltig beeindruckt und mich sowohl wissenschaftlich als auch menschlich bereichert hat.

Ein herzliches Dankeschön gilt Nuru Eltrich, der mir bei der täglichen Laborarbeit stets ausgezeichnet geholfen und mir mit großer Geduld und Freude die labortechnischen Methoden beigebracht hat. Außerdem danke ich ihm für seine freundschaftliche Unterstützung im und außerhalb des Labors.

Ebenso danke ich meinen freundschaftlich verbundenen Mitdoktoranden unserer Arbeitsgruppe. Insbesondere danke ich Andrei Bideak, John Hoppe, Moritz Lux, Anja Wilkening, Johannes Kohn und Alexander Blaut für ihre Hilfsbereitschaft, ihre verständnisvolle Unterstützung und vor allem für die großartige im Labor erlebte gemeinsame Zeit.

Bei Herrn Professor Dr. Hans-Joachim Anders bedanke ich mich für die großzügige Mitbenützung seines Labors. Allen Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die inhaltliche und methodische Zusammenarbeit und nicht zuletzt für die tolle Arbeitsatmosphäre danken. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. Maciej Lech und Herrn Privatdozent Dr. Shrikant Ramesh Mulay für sehr hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen. Bei Jana Mandelbaum und Dan Draganovici möchte ich mich für die exzellente technische Unterstützung bedanken.

Schließlich danke ich dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der Universität München für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und für die Möglichkeit den Promotionsstudiengang „molekulare und translationale Medizin“ besuchen zu dürfen.

Eidesstattliche Versicherung

Müller, Martin Bernhard

Name, Vorname

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

Die funktionelle Rolle von membranständig exprimiertem TNF

in der Immunkomplex-Glomerulonephritis

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

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

München, den 29. Oktober 2018

Ort, Datum

Martin Bernhard Müller

Unterschrift Doktorand