

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

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Lösliche Harnsäure bei akuter Gicht und chronischer Niereninsuffizienz

Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Experimentelle Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Stefanie Steiger, Ph.D.

2020

Inhaltsverzeichnis

1. Stand der Forschung	3
1.1. Hyperurikämie	3
1.2. Gichtarthritis	4
1.3. Beteiligung der Niere bei Hyperurikämie und Gicht	6
1.4. Die Rolle der Makrophagen bei Gichtarthritis und Niereninsuffizienz	7
2. Zusammenfassung und Zielsetzung	11
3. Eigene Vorarbeiten	12
3.1. Die immunregulatorischen Effekte der löslichen Harnsäure bei akuter Gichtkristall-induzierter Entzündung auf die Funktionen von Neutrophilen und Monozyten.	12
3.2. Der Einfluss renaler Harnsäurekristalle auf die Progression der granulomatösen Nephritis und die Rolle der Hyperurikämie bei akuten Nierenversagen.	18
3.3. Die Regulierung und Differenzierung von Makrophagen bei Kristall-induzierten akuten und chronischen Erkrankungen.	28
4. Ausblick	34
5. Literaturverzeichnis	36

1. Stand der Forschung

1.1 Hyperurikämie

Die Harnsäure ist das Endprodukt des Purin-Stoffwechsels bei vielen Lebewesen, wie Reptilien, Vögeln, Primaten und Menschen. Da die Harnsäure nur schwer wasserlöslich ist, verfolgen verschiedene Lebewesen unterschiedliche Strategien, um Harnsäure auszuscheiden. Beispielsweise scheiden Vögel weiße Harnsäurekristalle als wesentlichen Bestandteil des Vogelkots aus. Die meisten Säugetiere, einschließlich Nagetiere, die sich den Energiebedarf für die intestinale Ausscheidung von Harnsäure, wie es bei Vögeln der Fall ist, nicht leisten können, wird die Harnsäure durch das hepatische Enzym Urikase in die wasserlöslichere Verbindung Allantoin umgewandelt und über den Urin ausgeschieden.¹ Den höheren Primaten, einschließlich des Menschen, ist jedoch durch Mutation die Urikase abhandengekommen, so dass die Harnsäure das finale Abbauprodukt des Purin-Stoffwechsels ist.¹ Harnsäure wird zu etwa 70% renal und zu 30% über den Darm ausgeschieden, dennoch haben Menschen und höhere Primaten 3-fach höhere Harnsäurespiegel als andere Säugetiere einschließlich Nagetiere.¹ Beim Menschen hängt die Kapazität zur renalen Harnsäureausscheidung im Wesentlichen von der Anzahl der Nephrone in der Niere und der Expression renaler Harnsäuretransportproteine, wie z.B. URAT-1, SLC2A9/GLUT9 und ABCG2, ab.² Nachdem sowohl eine verminderte Nephronenzahl (=Niereninsuffizienz) als auch genetische Varianten in Harnsäuretransportern in der Bevölkerung häufig sind, handelt es sich bei der Hyperurikämie um ein prävalentes Phänomen. Ob und wann dies auch ein medizinisches Problem ist, und ggf. sogar mit Harnsäure-senkenden Therapien behandelt werden muss, ist seit Jahrzehnten Gegenstand andauernder Kontroversen.

Die Hyperurikämie ist durch einen erhöhten Harnsäurespiegel gekennzeichnet (≥ 6.5 mg/dL) und verläuft in 60 bis 70% der Fälle asymptomatisch ohne Anzeichen einer klinischen Symptomatik. Früher oder später kann eine persistierende asymptomatische Hyperurikämie in eine manifeste Gichtarthritis oder Urat-Nephropathie übergehen als Folge des Ausfallens der Harnsäure in Form von Kristallen in Gelenken und den Nieren. Das ein kausaler Zusammenhang zwischen asymptomatischer Hyperurikämie und Gichtarthritis besteht, gilt als unbestritten.³⁻⁵ Diskutiert wird, inwieweit die asymptomatische Hyperurikämie mit Komorbiditäten, wie Niereninsuffizienz, metabolischem Syndrom, Bluthochdruck und Herz-

Kreislauf-Erkrankungen assoziiert ist.⁶⁻¹⁰ Eine eindeutige Evidenz für einen kausalen Zusammenhang gibt es bisher nicht.

Die Harnsäure ist unter anderem als Gefahrensignal des Immunsystems bekannt. *In vitro* Studien zeigen, dass die Harnsäure pro-entzündliche Signalwege, wie Toll-like Rezeptoren und AKT-PRAS40-vermittelte Autophagie bei humanen Blutmonozyten³ und das NLRP3 Inflammasom bei Knochenmark-differenzierten Makrophagen⁴ aktiviert, oxidativen Stress verursacht⁵, die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine vermindert,⁶ sowie die Dysfunktion von Endothelzellen⁷ und Zellproliferation vaskulärer Muskelzellen^{8,9} fördert. Im Gegensatz dazu stehen Arbeiten, die der Harnsäure eine protektive Wirkung im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen^{10, 11} sowie auf kardiovaskuläre Komplikationen, Alterung und Krebserkrankungen zuschreiben,^{12, 13} da die Harnsäure als Scavenger für Sauerstoffradikale agiert.^{12, 14-18} Die entscheidende Frage ist, wie diese kontroversen Daten zur funktionellen Rolle der Harnsäure zu Stande kommen. Zum einen könnte an den Harnsäure-Präparationsmethoden liegen, die für *in vitro* Experimente verwendet werden.^{4, 19-21} In der Literatur werden bisher zwei Wege beschrieben, um die Harnsäure in Lösung zu bringen, entweder das Erwärmen bei 37°C^{3-5, 22, 23} oder das Auflösen mittels Natriumhydroxid (NaOH).²⁴ Zum anderen zeigen Tiermodelle, die auf der intraperitonealen Injektion hoher Harnsäurekonzentrationen,^{25, 26} oraler Kaliumoxonat-Gabe,^{7, 27} chirurgisch-induzierter oder diabetischen Nephropathie^{19, 20} basieren, dass die Hyperurikämie (2-5 mg/dL) einen Nierenschaden verursacht und zur Progression beiträgt. Allerdings sind diese Tiermodelle ungeeignet, da sie keine asymptotische Hyperurikämie mit klinisch relevanten Harnsäurespiegeln aufweisen. Um diese Diskrepanzen zu überwinden, wurden beide Erklärungsmöglichkeiten im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht (siehe Eigene Forschungsarbeiten).

1.2 Gichtarthritis

Die Gichtarthritis ist die häufigste Form der Arthritis und gilt als Wohlstandskrankheit. Ein Anstieg der Prävalenz ist weltweit zu vermerken. Populationsbasierte Daten von 1999 aus Großbritannien dokumentierten eine Prävalenz von 1,4%, wohingegen 2012 ein Anstieg auf 2,5% zu verzeichnen war.^{28, 29} Zu den Risikofaktoren einer Gichtarthritis zählen die Hyperurikämie, Alter und Geschlecht, Übergewicht,

Lebensstil/Ernährung und die Einnahme Harnsäure-steigernder Medikamente. Die Gichtarthritis tritt häufiger bei Männern als bei Frauen auf. Während die Prävalenz bei Männern >65 Jahre bei 7% liegt, erleiden nur ca. 2,8% der Frauen >85 Jahre einen akuten Gichtanfall.²⁹ Eine US-amerikanische Studie zeigt, dass die Anzahl der Patienten mit akuten Gichtanfällen in der Altersgruppe der 75-Jährigen von 21 im Jahr 1990 auf 41 pro 1000 Personen im Jahr 1999 anstieg.³⁰ Retrospektive Daten mit vergleichbar hoher Prävalenz liegen aus Deutschland vor.³¹ Patienten mit Komorbiditäten können wesentlich häufiger an Gichtarthritis erkranken als Patienten ohne Komorbiditäten. Hierbei haben Niereninsuffizienz und metabolisches Syndrom die größte Bedeutung und stellen damit eine besondere therapeutische Herausforderung dar.^{32, 33}

Ursächlich für einen akuten Gichtanfall ist eine Ablagerung von Harnsäurekristallen im Gelenk oder Weichgewebe. Die äußerst schmerzhafteste Arthritis tritt meist akut auf und ist von einer lokalen Entzündungsreaktion begleitet.^{34, 35} Ein kausaler Zusammenhang besteht zwischen Hyperurikämie und Gichtarthritis. Dennoch erleiden nicht alle Patienten mit einer Hyperurikämie einen akuten Gichtanfall. Kohortenstudien zeigen, dass nur etwa 22% der Patienten mit einem Serum-Harnsäurespiegel von ≥ 9.0 mg/dL entwickeln innerhalb von 5 Jahren einen akuten Gichtanfall.³⁶

Harnsäurekristalle lösen eine akute Entzündungsreaktion aus. Dabei werden proinflammatorische Zytokine und Chemokine, wie z.B. Interleukin (IL)-8, S100 Proteine, GM-CSF, Monozyten-aktivierendes Chemoprotein-1 (MCP-1) und Komplementproteine,³⁷⁻³⁹ von residenten Zellen (Synoviozyten, residente Makrophagen)⁴⁰⁻⁴² sezerniert, was wiederum die Infiltration von Blut-Leukozyten ins Gewebe begünstigt. Für die Migration durch das Endothel benötigen Leukozyten Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Selectin, ICAM-1, und VCAM-1) und Integrine (z.B. MAC-1, LFA-1).⁴³ Im Gewebe phagozytieren Neutrophile Harnsäurekristalle. Dabei wird reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt und *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) gebildet.⁴⁴⁻⁴⁶ NETs sind Netzwerke aus extrazellulären Chromatin-Fasern, die primär aus DNA sowie Proteinen und Proteasen (z.B. Neutrophile Elastase, Cathepsin-G, Histone und Myeloperoxidase) bestehen.^{45, 47} Diese Form des Zelltods wird als NETose bezeichnet.⁴⁸ Neben Neutrophilen spielen auch Monozyten eine entscheidende Rolle. *In vitro* Studien zeigen, dass humane CD14+ Blutmonozyten nach Stimulierung mit Harnsäurekristallen *tumor necrosis factor* (TNF) α und IL-1 β freisetzen,^{49, 50} und somit zur Entzündungsreaktion beitragen. Eine weitere wichtige Funktion ist die Fähigkeit der

Monozyten in pro- oder anti-inflammatorische M1- oder M2-Makrophagen zu differenzieren, ein Prozess der von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (GM-CSF und M-CSF) gesteuert wird.⁴⁹⁻⁵¹ Zur Rolle der Makrophagen bei akuter Gichtarthritis wird untenstehend näher eingegangen.

Ein akuter Gichtanfall kann ohne Therapie innerhalb von 7-10 Tagen spontan abklingen.⁵² Verschiedene anti-inflammatorische molekulare und zelluläre Mechanismen spielen dabei eine wichtige Rolle. Studien haben gezeigt, dass z.B. die Bindung von Proteinen an Harnsäurekristalle, die Phagozytose apoptotischer Neutrophile durch Makrophagen, die Differenzierung von Monozyten in anti-inflammatorische M2-Makrophagen, die Sekretion anti-inflammatorischer Mediatoren (z.B. TGF β , Lipide, Omega-3-Fettsäuren, Negativ-Regulatoren des NLRP3 Inflammasom und pro-entzündlicher Zytokine), sowie aggregierte NETs-Bildung eine entscheidende Rolle spielen.^{46, 53} Allerdings lässt sich durch eine schnelle, gezielte Behandlung mit Harnsäuresenkern (z.B. Allopurinol und Febuxostat) die Gichtanfall-Dauer deutlich verkürzen und die Beschwerden, wie Schmerzen (z.B. mit Colchizin), lindern.

In diesem Zusammenhang lässt sich sagen, dass die Pathophysiologie der akuten Gichtarthritis komplex ist und weiterhin Untersuchungen auf molekularer und zellulärer Ebene notwendig sind, um herauszufinden, warum die asymptomatische Hyperurikämie nicht bei allen Patienten in eine symptomatische Gichtarthritis übergeht.

1.3 Beteiligung der Niere bei Hyperurikämie und Gicht

Die Niere spielt bei der Homöostase des Harnsäurespiegels im Körper eine entscheidende Rolle. Es liegt also nahe, dass eine eingeschränkte Nierenfunktion mit einem gehäuften Auftreten Hyperurikämie-assoziiierter Gichtanfälle korreliert. Klinische Studien zeigen, dass Patienten mit Gichtarthritis häufiger an Harnsäurenierensteinen leiden als normourikämie Patienten.^{33, 54} Bei Patienten mit normaler Nierenfunktion liegt die Gicht-Prävalenz bei ca. 2,9%, diese steigt jedoch auf 24% bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion [Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) von $<60 \text{ mL/min/1,73m}^2$].⁵⁵ Auch in einer deutschen prospektiven Kohortenstudie (GCKD) mit 5085 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz konnte Jing *et al.* zeigen, dass die Anzahl der Gichtkranken bei chronisch Niereninsuffizienten (eGFR $<30 \text{ mL/min/1,73m}^2$) besonders hoch (34,5%) ist im Vergleich zu 16% bei Patienten mit einer GFR $>60 \text{ mL/min/1,73m}^2$.³² Im Gegensatz dazu nimmt die

Häufigkeit neu auftretender Gichtanfälle bei dialysepflichtigen Patienten im Stadium G5D ab, trotz persistierende Hyperurikämie.^{56, 57} Obwohl eine verminderte Nierenfunktion das Risiko an einer Hyperurikämie-bedingten Gichtarthritis zu erkranken erhöht, stellt sich die Frage, warum nur etwa 50% aller chronisch Niereninsuffizienten akute Gichtanfälle erleiden?

Diskutiert wird inwiefern die Niereninsuffizienz mit der asymptomatischen Hyperurikämie assoziiert ist.⁵⁸ Ein kausaler Zusammenhang konnte bislang nicht bestätigt werden. Frühere Studien zeigten, dass die lösliche Harnsäure eine Entzündungsreaktion und oxidativen Stress in Endothelzellen auslöst,⁵⁹ und die Hyperurikämie zur Verschlechterung der Nierenfunktion beiträgt.⁶⁰ Kleinere retrospektiv-randomisierte Studien konnten eine verbesserte Nierenfunktion nach Harnsäure-senkender Therapie bei Niereninsuffizienten beobachten.⁶¹⁻⁶⁵ Aktuelle einzel- und multizentrisch, randomisierte, kontrollierte, klinische Studien zeigen, dass die asymptomatische Hyperurikämie keinen Effekt auf die Progression der Niereninsuffizienz nach Harnsäure-senkender Therapie hat,⁶⁶⁻⁷¹ so dass entsprechende Behandlungsempfehlungen vermieden werden sollten. Offen bleibt eine eindeutige Evidenz für die Kausalität zwischen Hyperurikämie mit renalen Harnsäurekristallen, bekannt als Nierentophi oder -granulome, und Progression der Niereninsuffizienz.

1.4 Die Rolle der Makrophagen bei Gichtarthritis und chronischer Niereninsuffizienz

Makrophagen sind für ihre Heterogenität bekannt. Sie können in den meisten Organen gefunden werden, z.B. der Lunge, Peritoneum, Leber, als Typ A Zellen im Gelenk, im zentralen Nervensystem und in der Niere.⁵¹ Sie sind entweder als residente Makrophagen vorhanden, um die Gewebemöostase zu gewährleisten oder sie differenzieren von Monozyten in Makrophagen je nach Gewebeentzündung und -schädigung.⁷² Obwohl Makrophagen aufgrund der Mikroumgebung phänotypisch und funktionell Unterschiede aufweisen, besitzen sie dennoch Gemeinsamkeiten, wie z.B. die Fähigkeit apoptotische und nekrotische Zellen oder kristalline Partikel zu phagozytieren, Antigene zu präsentieren oder Zytokine und Chemokine zu sezernieren.⁷³⁻⁷⁵

In vitro Studien zeigen, dass Makrophagen nach Harnsäurekristall-Stimulation pro-inflammatorische Mediatoren, wie z.B. IL-1 β , TNF α , MCP-1, IL-18, Interferon (IFN) γ und iNOS, freisetzen.^{40, 41, 73, 74, 76} Diese pro-inflammatorischen Mediatoren, wie z.B. IL-1 β , tragen

unter anderem zur NETs-Bildung bei und verstärken somit die akute Immunantwort.⁷⁷ Unter anderen konnten Hall C.J. und Kollegen in einem Gichtmodell in Zebrafischen zeigen, dass die Makrophagen-Aktivierung von der Fettsäureoxidation-vermittelten mitochondrialen ROS Produktion abhängt, um eine NFκB-bedingte Freisetzung der Zytokine IL-1β und TNFα zu gewährleisten.⁷⁸ In einem Peritonitis-Tiermodell zur akuten Gicht führte die Depletion von Makrophagen zur verminderten Freisetzung von IL-1β und Leukozytenmigration,⁷⁹ was für eine Schlüsselrolle der Makrophagen während der initialen Phase des akuten Gichtanfalls spricht. Nicht nur während der akuten Phase spielen Makrophagen eine entscheidende Rolle, sondern auch während der Auflösungsphase der akuten Entzündungsreaktion. Zu den bekannten Mechanismen in der Auflösungsphase zählen u.a. die Phagozytose von Harnsäurekristallen⁵⁰ und apoptotischen Neutrophilen durch Makrophagen, dies wiederum begünstigt die Freisetzung des anti-entzündlichen Zytokin TGFβ.⁴⁹ D.h., dass die Funktionen von Makrophagen vielfältig und komplex sind, und von der Entzündung-bedingten Mikroumgebung abhängigen. Darüber hinaus sind weitere Untersuchungen notwendig, um die zellulären und molekularen Mechanismen, die zur Regulierung und Differenzierung verschiedener Makrophagen-Phänotypen verantwortlich sind, zu identifizieren (siehe Abschnitt Eigene Forschungsarbeiten).

Makrophagen führen nicht nur während einer akuten Erkrankung, sondern auch bei chronischen Nierenerkrankungen wichtige Effektor-Funktionen aus. Zum Beispiel löst eine Nierenschädigung eine Entzündungsreaktion aus, was wiederum die Differenzierung eines pro-inflammatorischen M1-Makrophagen-Phänotyps und die Freisetzung pro-inflammatorische Zytokine begünstigt (Abbildung 1).^{80, 81}

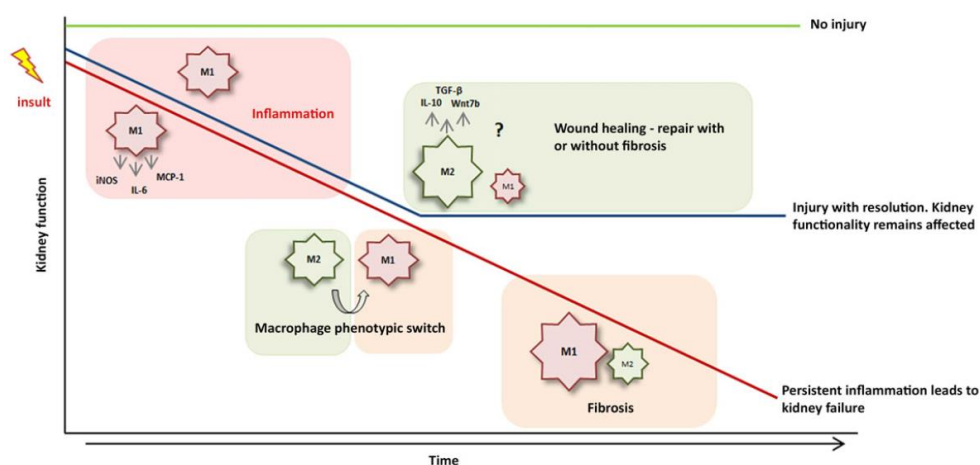


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Makrophagen-Gleichgewichts in Abhängigkeit zur Progression der chronischen Niereninsuffizienz. Die Nierenfunktion variiert mit der Zeit, abhängig von der Art und Schwere des Nierenschadens und der Regenerationsfähigkeit der Niere (adoptiert von Guiteras R et al. ⁷⁵).

Für die Differenzierung von M1-Makrophagen während der frühen Phase eines chronischen Nierenschadens spielt der Transkriptionsfaktor IRF5 sowie die Sekretion pro-inflammatorische Mediatoren, wie z.B. ROS, IL-6, IL-1 β , MCP-1, und TNF α , eine wichtige Rolle.^{75, 82} Die Mikroumgebung im Gewebe ändert sich durch die Phagozytose apoptotische und nekrotische Zellen von Makrophagen, was die Freisetzung anti-inflammatorische Zytokine IL-10 und TGF β begünstigt und somit die Differenzierung anti-inflammatorischer M2c-Makrophagen. M2c-Makrophagen sind für die Wundheilung und den Gewebeumbau wichtig. Eine progressive Abnahme der Nierenfunktion wird somit verhindert (Abbildung 1 und 2). *In vivo* Studien zeigen, dass die Depletion von Makrophagen mittels Anti-Makrophagen-Serum oder Clodronat-Liposomen eine persistierende Entzündungsreaktion und Fibrose verhindern.^{82, 83}

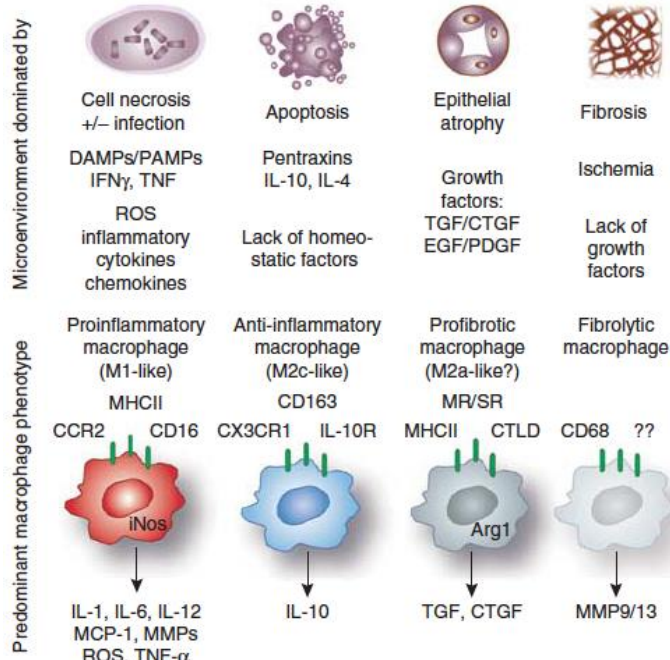


Abbildung 2: Modell der Milieu-abhängigen Differenzierung von Makrophagen in der Niere. Ein charakteristisches Merkmal des akuten Nierenversagens ist der nekrotische Zelltod, was zur Freisetzung von DAMPs/PAMPs und zur Produktion pro-inflammatorische Mediatoren beiträgt. Dieses Milieu begünstigt die Differenzierung pro-entzündliche M1-Makrophagen. Die Phagozytose apoptotischer Zellen sowie die Freisetzung anti-inflammatorische Zytokine begünstigt die Differenzierung von anti-inflammatorischen M2-Makrophagen. Somit ändert sich die renale Mikroumgebung und es kommt zum Abklingen der Entzündungsreaktion. Wachstumsfaktoren und Zytokine fördern diesen Wundheilungsprozess (Epithelreparatur). Allerdings kann eine persistierende, chronische Entzündung mit

Fibrose zur Differenzierung von pro-fibrotischen M2a-Makrophagen führen. Ob fibrolytische Makrophagen existieren ist bisher noch nicht in *in vivo* Studien bestätigt worden. (adoptiert von Anders HJ et al.⁸²)

Im Fall einer persistierenden Niereninsuffizienz kann das Gleichgewicht zwischen M1- und M2-Makrophagen außer Kontrolle geraten. Es treten vermehrt M1-Makrophagen auf, die kontinuierlich pro-inflammatorische und pro-fibrotische Mediatoren freisetzen, und letztendlich zur Nierenfibrose beitragen.⁷⁵ Diese Faktoren begünstigen die Differenzierung eines pro-fibrotischen M2a-Makrophagen-Phänotyp (Abbildung 2).⁸² Was zunächst als Wundheilungsprozess erscheint, kann sich langfristig schädigend (pathologisch) und progressiv auf die Niere auswirken. Mehrere *in vivo* Studien bestätigen, dass neben M1-

Makrophagen auch M2a-Makrophagen zur renalen Fibrose und Progression der Niereninsuffizienz beitragen.⁸⁴⁻⁸⁷ Neben den Entzündungs-bedingten Zytokinen und Chemokinen, können auch Transkriptionsfaktoren (z.B. NFAT, IRF9, und AhR) sowie metabolische Faktoren (z.B. Fettsäureoxidasen, Hemoxygenase, HIF-1 α , und HIF-2 α) die Differenzierung von Makrophagen-Phänotypen beeinflussen.⁸⁸ Zusammenfassend lässt sich sagen, dass verschiedene Makrophagen-Phänotypen im Gewebe, auch in der Niere, koexistieren, und deren Funktionen von der Immunphase nach Schädigung abhängig sind.

2. Zusammenfassung und Zielsetzung

Menschen und höheren Primaten fehlt die Uricase-Aktivität, daher ist die Harnsäure das Endprodukt des Purinabbauprozesses. Infolgedessen sind die Harnsäure-Spiegel im Blut beim Menschen im Vergleich zu anderen Säugetieren relative hoch. Erhöhte Harnsäure-Spiegel sind hauptsächlich für ihre schädlichen Effekte bei der Pathogenese, wie der Gichtarthritis, akuten Uratnephropathie, Urolithiasis und Nierensteinerkrankungen bekannt. Epidemiologische Studien dokumentieren einen Zusammenhang zwischen Hyperurikämie und Fettleibigkeit, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, metabolischem Syndrom und chronischen Nierenerkrankungen. Bisher wurde jedoch keine Kausalität in diesen Kontexten festgestellt. Bisherige Daten zur Wirkung der löslichen Harnsäure und asymptomatischen Hyperurikämie sind kontrovers (siehe Stand der Forschung). Wenn die Hyperurikämie, wie angenommen, als metabolisches Syndrom akute Entzündungsreaktionen auslösen würde, warum erkranken dann nicht alle Patienten mit einer asymptomatischen Hyperurikämie an akuten Gichtanfällen (ca. 15-20%)? Warum kann eine rapide Harnsäuresenkung mit Harnsäure-senkender Therapie akute Gichtanfälle auslösen? Warum weisen 15% oder mehr der Patienten mit asymptotische Hyperurikämie trotz Kristallablagerungen in Gelenken keine klassischen Symptome der Gichtarthritis auf? Warum soll eine asymptotische Hyperurikämie zur Progression einer Niereninsuffizienz beitragen? Es ist also möglich, dass die Harnsäure entzündungshemmende und immunregulatorische Eigenschaften im Zusammenhang mit Niereninsuffizienz und assoziierter Komplikationen, wie z.B. Kristallurie, Diabetes, Infektionen und sterile Entzündungen, aufweist. Allerdings ist dies bisher unklar. Unter der Annahme, dass die Harnsäure als endogener Negativregulator des Immunsystems agiert, habe ich das Habilitationsprojekt dementsprechend fokussiert. Im nächsten Absatz wird näher auf die eigenen Vorarbeiten und die drei gesetzten Themen eingegangen.

3. Eigene Vorarbeiten

Seit meiner Promotion und Zeit als Postdoktorandin beschäftige ich mich mit den immunregulatorischen Effekten löslicher und kristalliner Metabolite bei Immunzellen. Speziell, sind die Auswirkungen der löslichen Harnsäure sowie der Harnsäure- und Kalziumoxalatkristalle auf die Funktionen von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen von großen Interesse, und in wie fern diese die Entzündungsreaktion/angeborene Immunantwort beeinflussen.

3.1 Die immunregulatorischen Effekte der löslichen Harnsäure bei akuter Gichtkristall-induzierter Entzündung auf die Funktionen von Neutrophilen und Monozyten.

Der Zusammenhang zwischen Hyperurikämie und Gichtarthritis ist kausaler Natur und offensichtlich bei Patienten mit Niereninsuffizienz sehr komplex (siehe Stand der Forschung). Jedoch kann zum einen eine rapide Senkung des Harnsäure-Spiegels mittels Harnsäure-senkender Therapien akute Gichtanfälle auslösen und zum anderen erleiden nicht alle Niereninsuffizienten (etwa 50%) akute Gichtanfälle trotz persistierender Hyperurikämie.^{56, 57} Es soll daher untersucht werden, ob die Hyperurikämie eine regulatorische Rolle bei der Immunabwehr spielt. Um dies zu untersuchen, wurde ein Tiermodell zur asymptomatischen Hyperurikämie etabliert, welches auf dem Urattransporterprotein *Glut9* basiert. *Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox}* Mäuse und *Glut9^{lox/lox}* Kontrolltiere wurden mit Tamoxifen gespritzt, um *Glut9* in den Hepatozyten auszuschalten. Anschließend wurde entweder eine Standarddiät angereichert mit dem Purin Inosin oder eine azidogene Spezialdiät mit Inosin für drei Wochen verabreicht. *Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox}* Mäuse mit Standarddiät+Inosin entwickelten eine asymptomatische Hyperurikämie (Serum-Harnsäure: 8-12 mg/dL) ohne Nierenschaden und *Alb-creERT2;Glut9^{lox/lox}* Tiere mit Spezialdiät+Inosin eine Hyperurikämie mit Niereninsuffizienz. *Glut9^{lox/lox}* Tiere mit Standarddiät+Inosin waren gesund und dienten als Kontrollgruppe (unveröffentlichte Daten).

Um eine akute Gichtarthritis zu induzieren, wurden Harnsäurekristalle subkutan in ein *Air pouch* auf den Rücken der transgenen Mäuse gespritzt. Durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass bei hyperurikämischen Tieren signifikant weniger Neutrophile und Monozyten in den mit Harnsäurekristall-gespritzten *Air pouch* infiltrierte im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Hyperurikämie. Die Harnsäurekristall-induzierte

Leukozytenmigration und Zytokinfreisetzung waren deutlich stärker bei Tieren mit einer Niereninsuffizienz-bedingten Hyperurikämie reduziert im Vergleich zu Tieren mit einer asymptomatischen Hyperurikämie. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Markus Sperandio (Kardiovaskuläre Physiologie und Physiopathologie, Biomedizinisches Centrum München) konnten wir mittels Intravitalmikroskopie vom Cremaster-Muskel zeigen, dass die Hyperurikämie das Rollverhalten von Leukozyten im Blutgefäß erhöht, aber die Leukozytenadhäsion und -migration in den Harnsäurekristall-induzierten Cremaster-Muskel inhibiert im Vergleich zu gesunden Tieren (Abbildung 3, unveröffentlichte Daten). Harnsäure-senkende Therapie mit Rasburicase konnte den inhibierenden Effekt der Hyperurikämie bei Tieren mit Niereninsuffizienz-bedingter Hyperurikämie aufheben. Dies spricht für einen immunregulatorischen Effekt der Hyperurikämie (unveröffentlichte Daten).

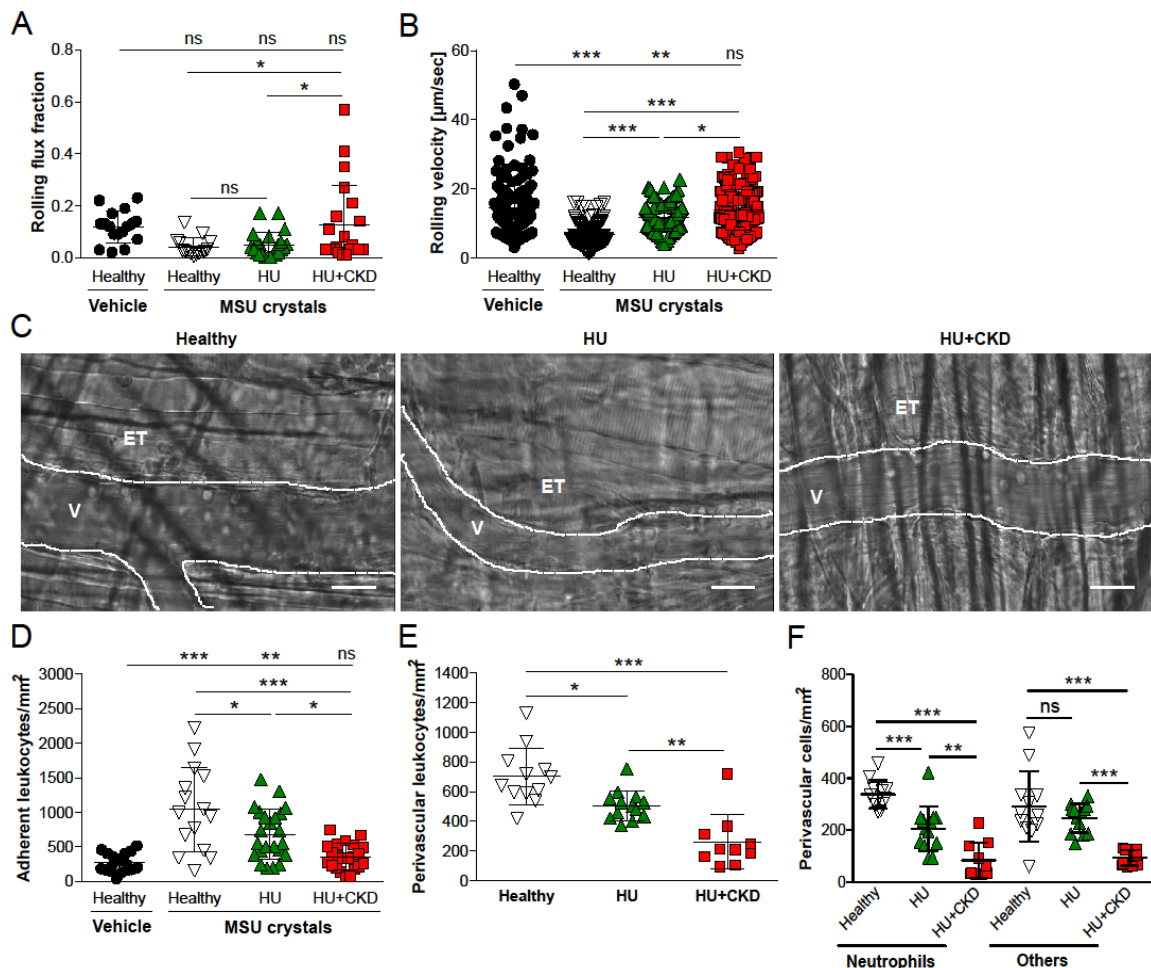


Abbildung 3: Verminderte Leukozytenadhäsion und -migration in Harnsäurekristall-stimulierten Cremaster-Muskel bei hyperurikämischen Mäusen mit Niereninsuffizienz. Alb-creERT2; *Glut9*^{lox/lox} Mäuse und *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltiere wurden mit Tamoxifen injiziert. Beide Gruppen erhielten entweder eine mit Inosin angereicherte Spezialdiät oder eine Standard-Chow-Diät. Nach 22 Tagen wurde den Mäusen 4 Stunden vor der Intravitalmikroskopie Harnsäurekristalle oder Vehikel injiziert. (A-B) Rollflussfraktion und Rollgeschwindigkeit von Leukozyten. (C) Repräsentative Bilder postkapillarer Venen des Cremster-Muskels. (D-F) Quantifizierung adherenter und perivaskulärer Leukozyten bzw. Neutrophile. V = Gefäße, ET = extravaskuläres Gewebe, HU = Hyperurikämie, CKD = chronische Niereninsuffizienz, healthy = gesund. (unveröffentlichte Daten)

Die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut ins entzündete Gewebe ist ein komplexer Prozess, der in mehreren Schritten abläuft, der Adhäsion, dem Rollen und der Migration ins Gewebe. Diese Prozesse hängen u.a. von der Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und Integrinen ab. Um den Einfluss der löslichen Harnsäure auf das Migrationsverhalten von Neutrophilen im Detail zu untersuchen, wurden Neutrophile aus dem Blut gesunder Individuen sowie Niereninsuffizienten im Stadium G2-4 und G5D isoliert. Anschließend wurden Neutrophile *ex vivo* mit dem Chemokin CXCL8 aktiviert, und die Expression von Adhäsionsmolekülen und Aktivierung von $\beta 2$ Integrinen mittels Durchflusszytometrie, sowie deren Migrationspotential mit Hilfe von Transwell-Migrationsassays ermittelt. Für alle *ex vivo* Experimente wurde eine physiologisch-relevante Harnsäurekonzentration von 10 mg/dL verwendet. Die verwendete Harnsäurekonzentration entspricht den Serum-Harnsäurespiegeln der in die Studie eingeschlossenen hyperurikämischen Niereninsuffizienten sowie dem Tiermodell. Die Daten zeigten, dass die lösliche Harnsäure die $\beta 2$ Integrin-Aktivierung sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen bei CXCL8-aktivierten Neutrophilen und deren Migrationsfähigkeit vermindert. Dies war auf die intrazelluläre Aufnahme der löslichen Harnsäure durch Urattransportproteine, wie z.B. SLC2A9/GLUT9, zurückzuführen. Beobachtungen mit Neutrophilen von Niereninsuffizienten im Stadium G2-4 und G5D waren vergleichbar, das heißt, dass die Hyperurikämie zur signifikant verminderten Migrationsfähigkeit im Vergleich zu Neutrophilen von gesunden Individuen beiträgt (unveröffentlichte Daten). Ob die lösliche Harnsäure auch die Endozytose und das *Recycling* von $\beta 2$ Integrinen oder andere Integrine, wie z.B. $\beta 1$ Integrin, beeinflusst, ist bisher unklar und soll in weiteren Experimenten untersucht werden.

Neben der Leukozytenmigration spielt die NET-Bildung bei der Gichtarthritis eine wichtige Rolle. Um den Effekt der löslichen Harnsäure auf die NETs-Bildung zu untersuchen, wurden Neutrophile von gesunden Individuen mit oder ohne Harnsäure inkubiert und anschließend mit Harnsäurekristallen oder PMA *ex vivo* aktiviert. Allerdings konnten keine Unterschiede bei Harnsäurekristall- oder PMA-induzierten NETs zwischen Harnsäure-behandelten oder -unbehandelten Neutrophilen beobachtet werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten mit Neutrophilen von hyperurikämischen Niereninsuffizienten erzielt werden. Das heißt, dass die Hyperurikämie keinen Effekt auf die NETs-Bildung bei Niereninsuffizienz-bedingter sekundärer Immundefizienz hat (unveröffentlichte Daten).

Die Effekte der löslichen Harnsäure sind stark umstritten und bisherige Studien deuten vielmehr auf eine pro-inflammatorische Funktion hin (siehe Stand der Forschung). Somit ergab sich die Fragestellung, wie diese kontroversen Daten zur funktionellen Rolle der Harnsäure zu Stande kommen können. In der Literatur werden für *in vitro* Experimente zwei Harnsäure-Präparationsmethoden beschrieben, das Erwärmen bei 37°C und das Auflösen mittels NaOH (Abbildung 4A und 4B).⁸⁹ Die Anwendung beider Methoden zeigte *in vitro*, dass die Harnsäurelösungen nach Erwärmen bei 37° Mikrokrystallverunreinigungen aufwiesen (Abbildung 4C), nicht aber nach Auflösen der Harnsäure mittels NaOH (Abbildung 4D).⁸⁹ Darüber hinaus waren die Harnsäurekonzentrationen und pH-Werte der Lösungen nach Erwärmen im Vergleich zu den erwartenden Konzentrationen (nur 30% bei der höchsten Konzentration) sowie den Präparationen mit NaOH (Abbildung B) viel niedriger.⁸⁹ Es ist bekannt, dass die Löslichkeit der Harnsäure stark vom pH abhängig ist.⁹⁰ Das optimale Löslichkeitsniveau der Harnsäure liegt zwischen pH 7.0–7.4.

Es liegt also nahe, dass die pro-entzündlichen Effekte der Harnsäure, die in der Literatur beschrieben werden,⁴¹ auf Mikrokrystallverunreinigungen zurückzuführen sind. In der Tat, Mikrokrystallverunreinigungen in der Harnsäurelösung induzieren NLRP3 Inflammasom-Aktivierung und IL-1 β Freisetzung bei humanen Blutmonozyten (Abbildung 4G und 4H).⁸⁹ Im Gegensatz dazu unterdrückte die Harnsäurelösung ohne Kristallverunreinigungen die Funktionen aktivierter humaner Monozyten (Abbildung 4I).⁸⁹ Die mRNA Expressionwerte von NLRP3, ASC, IL-6, TNF α und NF κ B waren bei CD14+ Monozyten von hyperurikämischen Niereninsuffizienten nach Stimulation mit Harnsäurekristallen oder *lipopolysaccharide* (LPS) im Vergleich zu CD14+ Monozyten von gesunden Individuen stark vermindert. Des Weiteren wurde ein neues Tiermodell mit klinisch relevanten Harnsäurekonzentrationen von 9-11 mg/dL etabliert und die Daten zeigten, dass die asymptomatische Hyperurikämie die Entzündungsreaktion bei akuter Gichtarthritis im Vergleich zu Tieren ohne Hyperurikämie inhibiert, d.h., dass die Harnsäure als negativ Regulator des Immunsystems agiert.⁸⁹

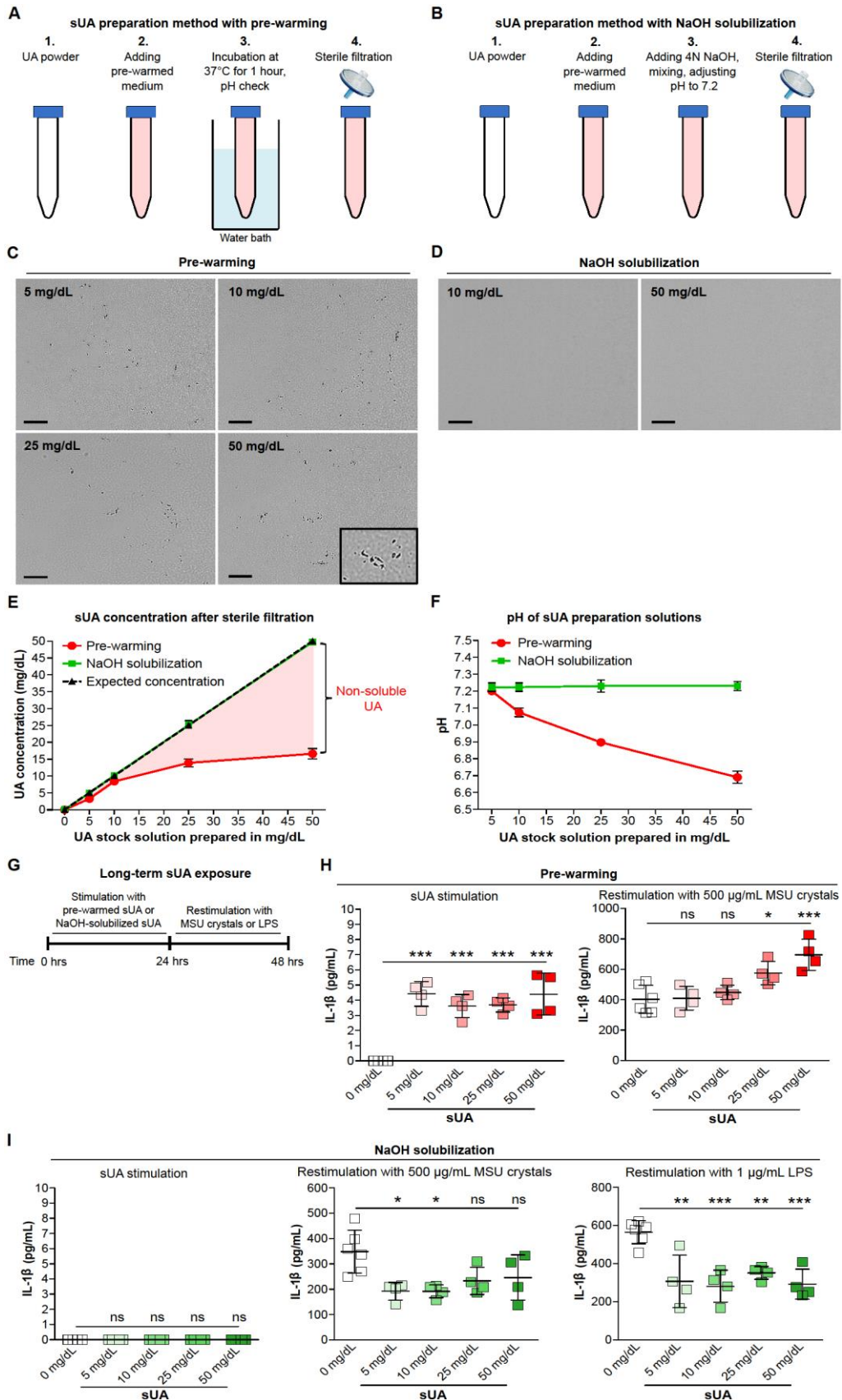


Abbildung 4: NaOH solubilierte Harnsäure hemmt die Funktion aktivierter Monozyten. (A und B) Harnsäurepräparationsmethoden: Erwärmen (A) und Auflösen mit NaOH (B). (C und D) Lichtmikroskopie zeigt Harnsäurekristalle nach Erwärmen aber nicht nach Auflösen in NaOH. (E) Bestimmung der Harnsäure der Harnsäurepräparationen. (F) pH Messung der Harnsäurelösungen. (G-I) *In vitro* Stimulation von Monozyten mit erwärmter Harnsäure (H) und NaOH-gelöster Harnsäure (I). Von den Überständen wurde IL-1 β gemessen.⁸⁹

Nun stellte sich die Frage: Ob und wie die lösliche Harnsäure von den Monozyten aufgenommen werden kann? Es ist bekannt, dass humane Tubulusepithelzellen für die Harnsäureaufnahme und -ausscheidung Urattransportproteine benötigen, wie z.B. SLC2A9/GLUT9, SLC22A6, 11, 12, 13 und ABCC4, ABCG2.² Im Gegensatz zu humanen primären Tubulusepithelzellen exprimieren humane Monozyten nur SLC2A9/GLUT9. Der Knockdown von SLC2A9/GLUT9 in Monozyten mittels siRNA führte zur reduzierten intrazellulären Aufnahme der löslichen Harnsäure und folglich zur Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren bei den aktivierten Monozyten.⁸⁹

Schlussfolgernd sei hervorzuheben, dass die lösliche und kristalline Harnsäure entgegengesetzte Eigenschaften aufweisen. Die asymptotische Hyperurikämie (lösliche Harnsäure) agiert als Negativregulator des Immunsystems (Abbildung 5, unveröffentlichte Daten). Genauer gesagt, hemmt die lösliche Harnsäure die $\beta 2$ Integrin-abhängige Neutrophilenmigration und die pro-inflammatorischen Funktionen der aktivierten Monozyten durch die intrazelluläre Harnsäureaufnahme mittels SLC2A9, molekulare Mechanismen, die eine mögliche Erklärung für die oben beschriebenen ungeklärten klinischen Beobachtungen darstellen.

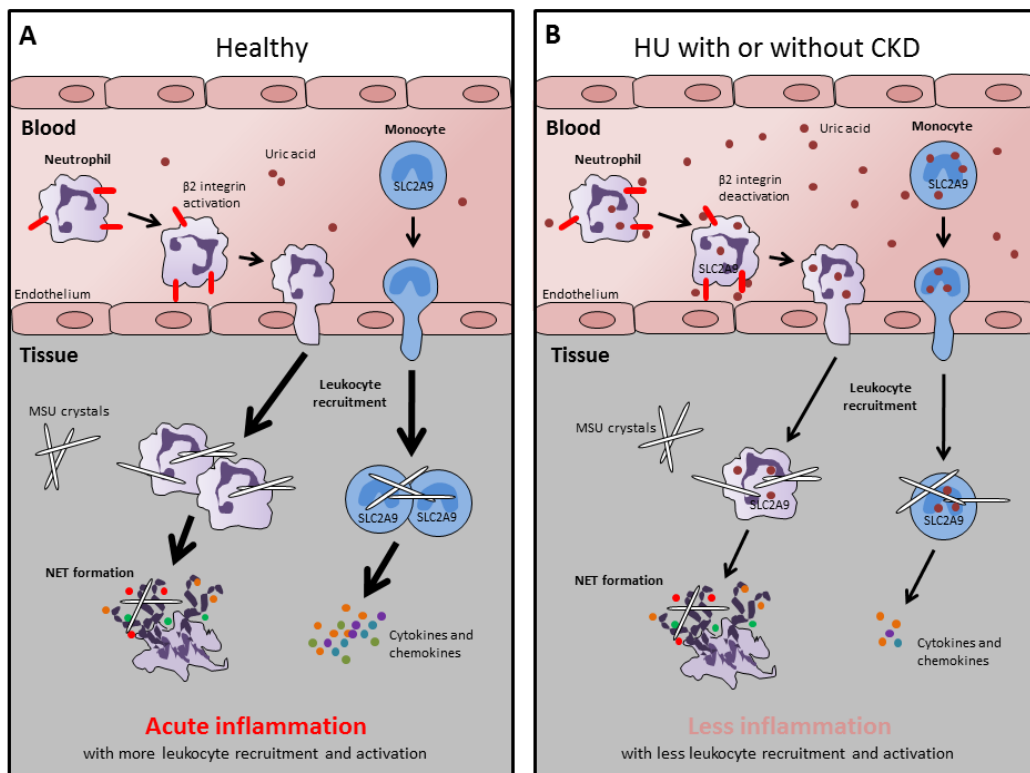


Abbildung 5: Schematische Darstellung der immunmodulatorischen Effekte der Hyperurikämie auf die Rekrutierung von Neutrophilen ($\beta 2$ Integrin Aktivierung) und die Funktionen von Monozyten mittels intrazellulärer Harnsäureaufnahme durch das Urattransportprotein SLC2A9/GLUT9 bei steriler Entzündung, z.B. akuter Gichtarthritis mit und ohne Niereninsuffizienz.

3.2 Der Einfluss renaler Harnsäurekristalle auf die Progression der granulomatösen Nephritis und die Rolle der Hyperurikämie bei akuten Nierenversagen.

Das zweite Thema befasst sich zum einen mit dem Einfluss renaler Harnsäurekristalle auf die Progression der granulomatösen Nephritis, und zum anderen mit dem Effekt der asymptomatischen Hyperurikämie auf Makrophagen nach akuten Nierenversagen.

Hyperurikämie mit Kristallurie bei chronischer Niereninsuffizienz

Ein kausaler Zusammenhang zwischen asymptomatische Hyperurikämie und Progression der Niereninsuffizienz ist bisher stark umstritten (siehe Stand der Forschung). Dies liegt vor allem an der unzureichend experimentellen und klinischen Evidenz. Um die Rolle der asymptomatischen Hyperurikämie bei Niereninsuffizienz genauer zu untersuchen, wurde ein zweites Tiermodell etabliert. Dazu wurde Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen und *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltieren Aristolochinsäure⁹¹ gespritzt und den Tieren eine Standarddiät mit Inosin für 42 Tage verabreicht (Abbildung 6A, unveröffentlichte Daten). Die Injektion von Aristolochinsäure induzierte in beiden Gruppen (CKD und HU+CKD) gleichermaßen eine Niereninsuffizienz nach 42 Tagen (CKD vs. HU+CKD, Abbildung 6C und 6D, unveröffentlichte Daten), was durch einen Anstieg des Serum-Harnstoff und Abfall der GFR gekennzeichnet war. Allerdings war die Nierenfunktion der Tiere mit nur einer asymptomatischen Hyperurikämie (HU) normal, d.h., dass eine asymptomatische Hyperurikämie keinen Nierenschaden verursacht. Vergleichend waren keine Unterschiede zwischen den Tieren mit einer Niereninsuffizienz (CKD) und Tieren mit einer asymptomatischen Hyperurikämie und Niereninsuffizienz (HU+CKD) hinsichtlich Nierenfunktion, Tubulusatrophie und interstitieller Fibrose zu beobachten (Abbildung 6E und 6F, unveröffentlichte Daten). Das heißt, dass die asymptomatische Hyperurikämie weder einen Nierenschaden verursacht noch zur Progression einer Niereninsuffizienz beiträgt (unveröffentlichte Daten). Aktuelle multizentrische, randomisierte, kontrollierte, klinische Studien bestätigten, dass die asymptomatische Hyperurikämie keinen Effekt auf die Progression der Niereninsuffizienz nach Harnsäure-senkender Therapie hat.^{92, 93} Obwohl Sato Y., *et al.* sich in einem Literaturbericht bei *Nature Review Nephrology* für Empfehlungen einer Harnsäure-senkenden Therapie bei Niereninsuffizienten ausgesprochen hat,⁹⁴ wurde diese Aussage in einer detaillierten Metaanalyse von allen mono- und multizentrischen Studien zu Harnsäure-senkenden Therapien widerlegt.⁹⁵ Demnach besteht nach aktuellem Stand der

Forschung kein kausaler Zusammenhang zwischen asymptotische Hyperurikämie und Progression der Niereninsuffizienz, sodass keine Therapieempfehlungen für Harnsäure-senkende Therapien bei Niereninsuffizienz ausgesprochen werden sollten.⁹⁵ Dies ist möglicherweise anders, wenn eine asymptotische Hyperurikämie in eine symptomatische übergeht und es zur Bildung renaler Harnsäurekristalle kommt.

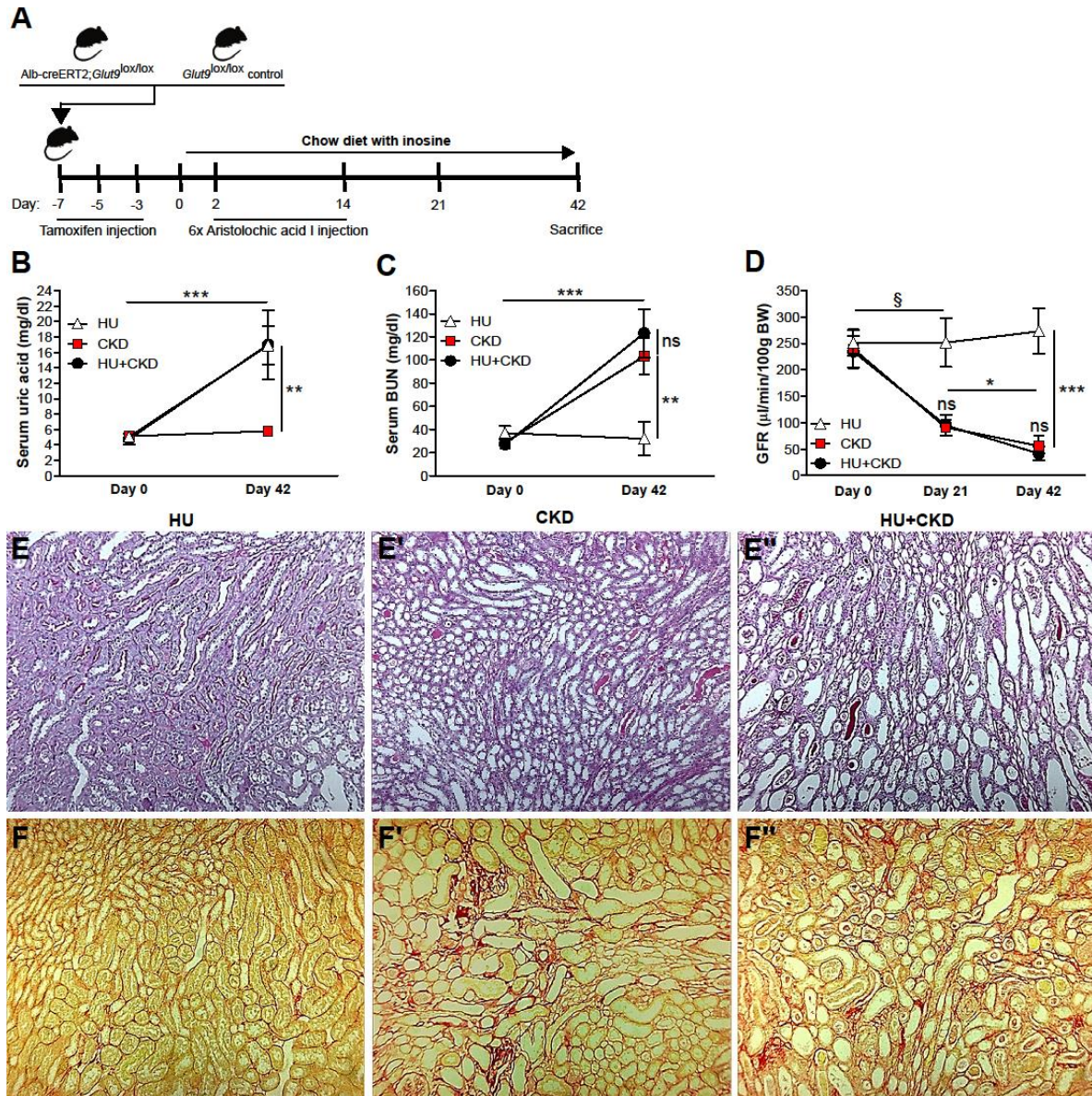


Abbildung 6: Die Hyperurikämie induziert weder einen Nierenschaden noch trägt sie zur CKD Progression bei. (A) Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse und *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltriere wurden mit Tamoxifen intraperitoneal injiziert. Beide Gruppen erhielten entweder eine mit Inosin angereicherte Spezialdiät oder eine Standard-Chow-Diät für 42 Tage. (B-D) Serum Harnsäure (B) und Harnstoff (BUN) (C). (D) Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) aller drei Gruppen vom Tag 0 bis zum Tag 42. (E) PAS-Färbung verdeutlicht tubuläre Obstruktion in CKD Mäusen mit und ohne Hyperurikämie. (F) Interstitielle Fibrose, dargestellt auf Rot-gefärbten Picro-Sirius-Nierenschnitten. HU = Hyperurikämie, CKD = chronische Niereninsuffizienz, healthy = gesund. (unveröffentlichte Daten)

Harnsäurekristalle können sich nicht nur in Gelenken ablagern, wie es bei der Gichtarthritis der Fall ist, sondern gelegentlich auch in Nierenbiopsien diagnostiziert werden. Pathologisch werden diese Harnsäurekristallablagerungen als Nierentophi oder -granulome bezeichnet. Ob eine asymptomatische Hyperurikämie oder eine Hyperurikämie mit Kristallurie (Harnsäurekristalle) zur Progression der Niereninsuffizienz beiträgt, ist bisher stark umstritten (siehe Stand der Forschung). Um dies zu untersuchen, haben wir ein Mausmodell zur Hyperurikämie mit und ohne Kristallurie etabliert. Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen und *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltieren wurde entweder eine Spezialdiät mit Inosin oder eine Standarddiät mit Inosin für 32 Tage verabreicht (Abbildung 7A, unveröffentlichte Daten). Die Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse (HU und HU+CKD), denen eine Inosin-reiche Diät verabreicht wurde, entwickelten eine Hyperurikämie, die durch erhöhte Harnsäure-Spiegel gekennzeichnet war (Abbildung 7B, unveröffentlichte Daten). Hingegen blieben die Harnsäure-Spiegel bei den *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltieren mit beiden Diäten im Normalbereich (Healthy 1 und Healthy 2). Bei den hyperurikämischen Mäusen (HU+CKD) nahm die Nierenfunktion signifikant von Tag 0 bis Tag 32 ab, was mit einem Abfall der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) und einem Anstieg des Serum-Kreatinins und –Harnstoffs einherging (Abbildung 7C-E, unveröffentlichte Daten). In Kooperation mit Dr. Barbara Lenz (Roche, Basel, Schweiz) konnten wir Ablagerungen von Harnsäurekristallen im polarisierten Licht und mittels MALDI-Massenspektrometrie in Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen mit Hyperurikämie und Niereninsuffizienz nach 32 Tagen nachweisen (HU+CKD; Abbildung 7F und 7G, unveröffentlichte Daten). Allerdings waren auf den Nierenschnitten der Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Tiere (HU), die lediglich eine asymptomatische Hyperurikämie entwickelten, sowie den gesunden Tieren (Healthy) keine Harnsäurekristallablagerungen zu beobachten (Abbildung 7F und 7G, unveröffentlichte Daten).

Ursächlich für die Bildung von Harnsäurekristallen war eine Azidose, d.h. ein Abfall des Urin pH in den sauren Bereich. Die Ablagerung von Harnsäurekristallen führte wiederum zur Tubulusatrophie, vermehrten Infiltration von Immunzellen, wie Makrophagen, und interstitiellen Fibrose bei Tieren mit einer Hyperurikämie und Kristallurie. Eine ausgeprägte interstitielle Fibrose, die bereits nach 14 Tagen zu beobachten war, begünstigte letztlich die Bildung von Harnsäurekristallgranulomen bei des HU+CKD Tieren. D.h., dass ein saurer Urin pH und eine zugrundeliegende interstitielle Fibrose zur Bildung von

Harnsäurekristallgranulomen und letztlich zur Progression der granulomatösen Nephritis beiträgt (unveröffentlichte Daten).

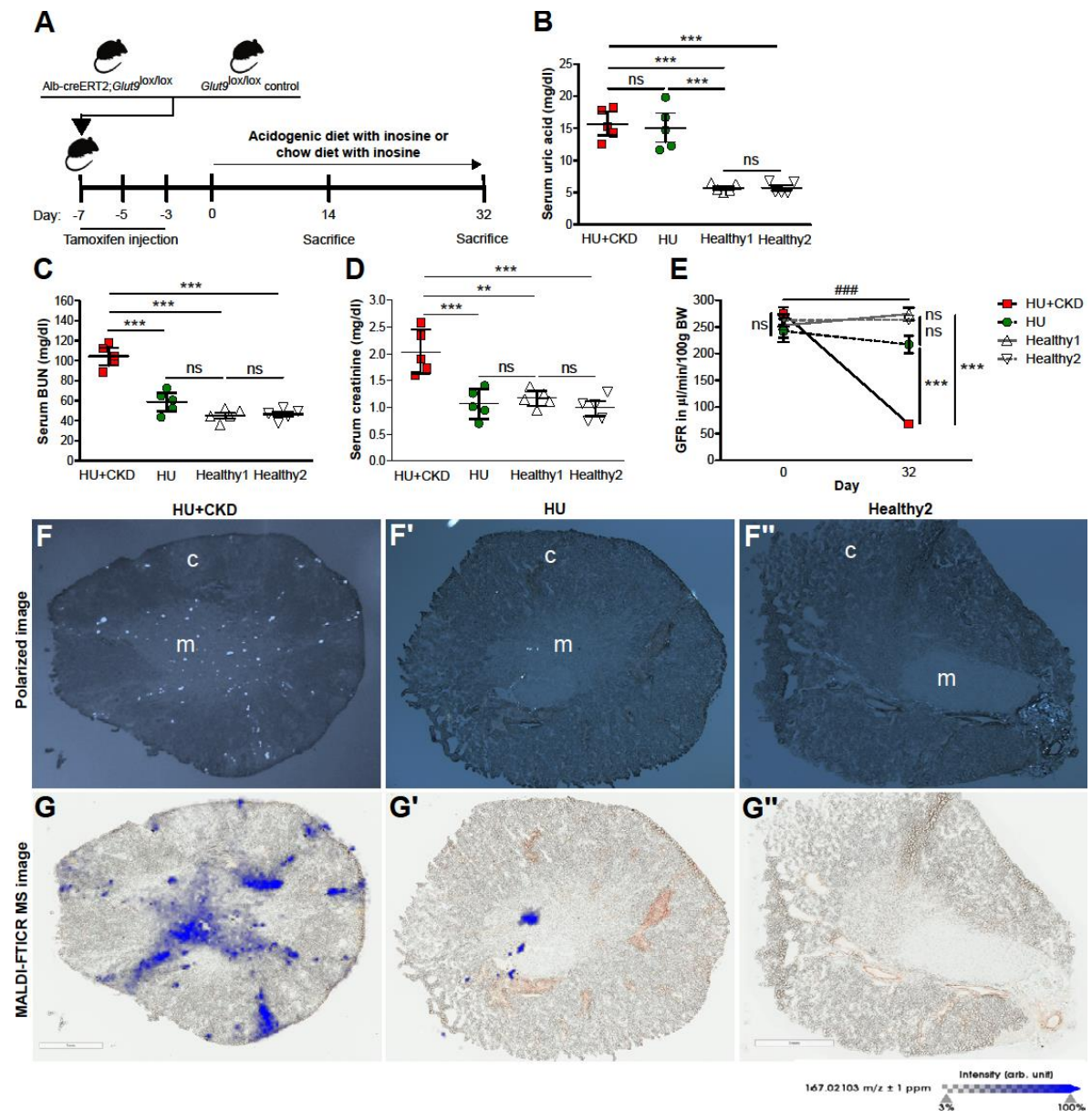


Abbildung 7: Kristallablagerungen in der Niere bestehen aus Harnsäure und führen zur chronischen Niereninsuffizienz. (A) Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse und *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltriere wurden mit Tamoxifen injiziert. Beide Gruppen erhielten entweder eine mit Inosin angereicherte Spezialdiät oder eine Standarddiät für 32 Tage. (B-D) Serumharnsäure an Tag 32 (B), Serum Harnstoff (BUN) (C), und Kreatinin (D). (E) Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) aller vier Gruppen von Tag 0 bis Tag 32. (F) Polarisationslichtmikroskopische Bilder (vor der MALDI-MS-Bildgebung) zur Visualisierung doppelbrechender Kristallablagerungen in Nierengewebeschnitten von Mäusen. (G) Überlagerung eines MALDI-MS-Bildes mit einem optischen Scan zur Visualisierung der räumlichen Verteilung von Harnsäure in den gleichen Gewebeschnitten. C=Kortex, M=Medulla, HU=Hyperurikämie, CKD=Niereninsuffizienz, Healthy=gesund. (unveröffentlichte Daten)

In Kooperation mit Professor Helen Liapis haben wir die Arkana Laboratory Nierenbiopsie-Datenbank (USA) nach Nierenbiopsien von Patienten mit Harnsäurekristallgranulomen durchsucht. Insgesamt umfasste diese Datenbank etwa 81,200 diagnostische Nierenbiopsien (im Jahr 2016), wovon wir 199 Nierenbiopsien von Patienten identifizierten, die eine Vorgeschichte von Hyperurikämie und/oder Gichtarthritis hatten. Von den 199 Nierenbiopsien wiesen 84 renale Harnsäurekristallgranulome auf, was einer Prävalenz von 0,1% entspricht. Als Kontrollgruppe wurden von den restlichen 115 Fällen 84 Nierenbiopsien zufällig ausgewählt. Nierenbiopsien mit Harnsäurekristallgranulomen wiesen histopathologische Anomalien, wie interstitielle Fibrose, Immunzellinfiltrate, Granulome und Riesenzellen auf (Abbildung 8A-8I, unveröffentlichte Daten). Die quantitative Auswertung der diagnostischen Nierenbiopsien ergab, dass Nierenbiopsien mit Harnsäurekristallgranulomen signifikant mehr Glomerulosklerose, vermehrt mäßig bis schweren Podozytenfußprozessabbau, interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie sowie Arteriosklerose aufwiesen im Vergleich zu den Kontrollbiopsien ohne Granulome (Abbildung 8J-8L). Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied im Schweregrad der Arteriosklerose zwischen beiden Gruppen beobachtet werden (Abbildung 8L, unveröffentlichte Daten).

Renale Harnsäurekristallgranulome sind fokale Akkumulationen von Zellen, die von Makrophagen, Lymphozyten, Epitheloidzellen und Riesenzellen umgeben sind. In Kooperation mit Dr. Viviane Gnemmi (Humanpathologie, Universität in Lille, Frankreich) haben wir immunhistochemische Färbungen von Nierenbiopsien mit Harnsäurekristallgranulomen durchgeführt, da bisher unklar ist, welcher Makrophagen-Phänotyp für die Bildung von Harnsäurekristallgranulomen verantwortlich ist. Die Immunfärbungen der Nierenbiopsien verdeutlichten, dass Harnsäurekristallgranulome überwiegend von CD68+ Makrophagen und HLA-DR+ pro-inflammatorische M1 Makrophagen umgeben sind, nicht aber von CD163+ alternativ-aktivierten M2 Makrophagen (Abbildung 8M-8O, unveröffentlichte Daten). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass renale Harnsäurekristallgranulome überwiegend von M1 Makrophagen umgeben sind und mit einer Glomerulosklerose, Arteriosklerose und interstitieller Fibrose assoziiert sind (unveröffentlichte Daten).

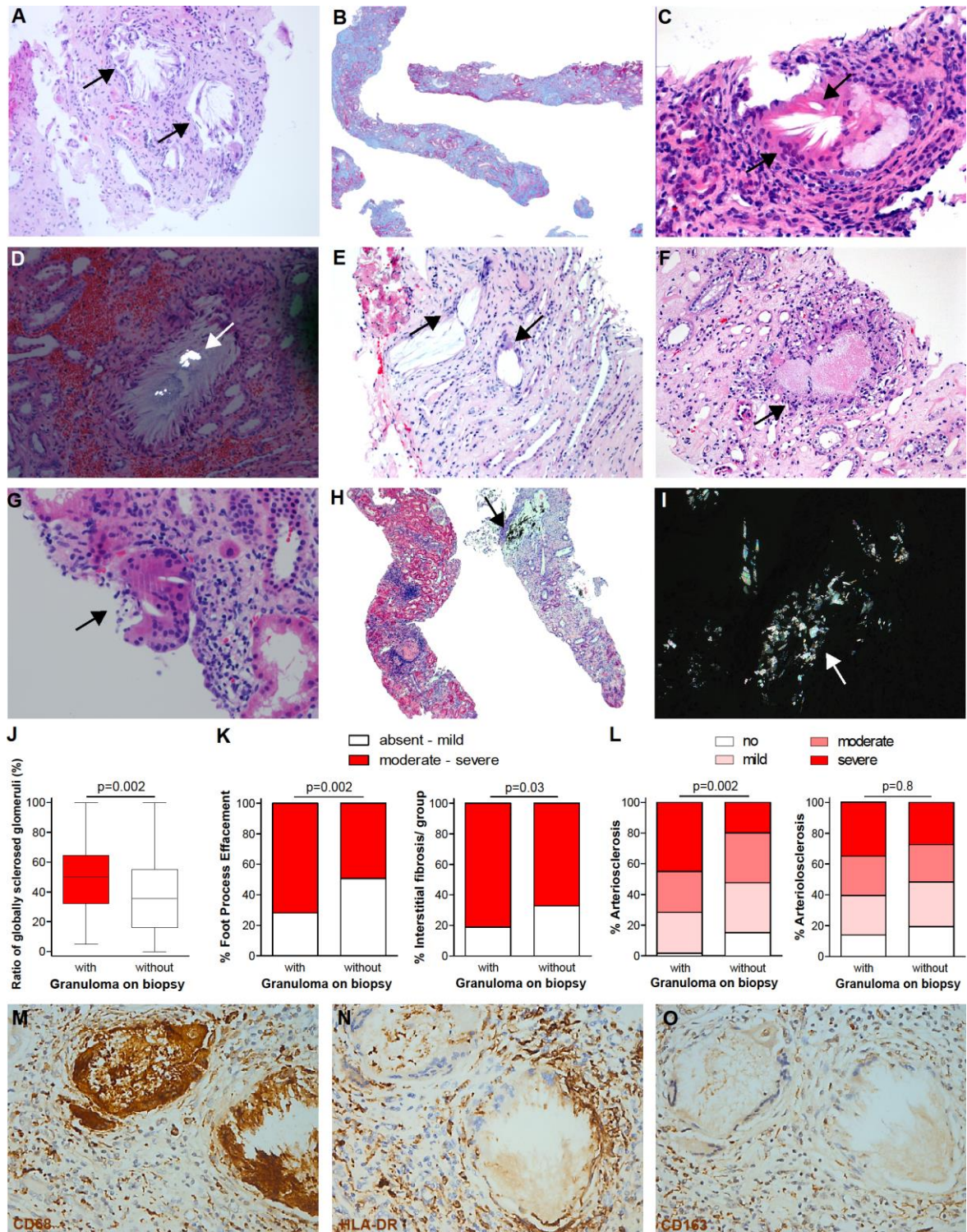


Abbildung 8: Histopathologische Anomalien bei Patienten mit renalen Harnsäurekristallgranulomen. (A) Nierenbiopsie zeigt Epithelioid-Granulome mit farblosen Harnsäurekristallen. (B) Nierenbiopsie mit interstitieller Fibrose. (C, E) Harnsäurekristall-granulom umgeben von Riesenzellen und Epithelioidzellen. (D) Polarisationslichtmikroskopisches Bild von Harnsäurekristallen. (F) PAS-Färbung zeigt amorphe körnige Rückstände und starke Entzündungsinfiltrate. (G) Harnsäurekristallgranulom einschließend Riesenzellen mit mehr als 30 Zellkernen. (H) Interstitielle Fibrose und fokale Glomerulosklerose sowie ungelöste Kristalle. (I) Harnsäurekristalle unter polarisiertem Licht. (J-L) Quantitative Analyse von 84 Nierenbiopsien mit Harnsäurekristallgranulomen im Vergleich zu 84 Biopsien ohne (Kontrollgruppe). (M-O) Immunfärbungen von Nierenbiopsien zeigt Harnsäurekristallgranulome, die positiv für CD68 Makrophagen (M) und HLA-DR proinflammatorische M1 Makrophagen (N), aber nicht für CD163 alternativ aktivierte M2 Makrophagen (O). (unveröffentlichte Daten)

Um die Nierenbiopsie-Daten zu den Makrophagen auch in unserem Tiermodell zu bestätigen, haben wir eine detaillierte Charakterisierung der renalen Makrophagen mittels Durchflusszytometrie und immunhistochemische Färbung durchgeführt. Durchflusszytometrie zeigte, dass sowohl pro-inflammatorische M1-Makrophagen (CD45+F4/80+CD11b+CX3CR1+CD206-) als auch anti-inflammatorische M2-Makrophagen (CD45+F4/80+CD11b+CX3CR1+CD206+) in den Nieren von hyperurikämischen Mäusen mit Niereninsuffizienz an Tag 14 und 32 vorhanden waren (unveröffentlichte Daten). Allerdings war die Anzahl an M1-Makrophagen im Vergleich zu M2-Makrophagen an Tag 14 signifikant höher, ein Zeitpunkt (Tag 14) an dem bereits eine interstitielle Fibrose aber noch keine Harnsäurekristallgranulome zu beobachten waren. Daraus lässt sich schließen, dass Harnsäurekristallgranulome überwiegend von M1-Makrophagen gebildet werden (unveröffentlichte Daten).

Unter dieser Annahme haben wir einen Therapieansatz verfolgt, womit wir einen Makrophagen-Phänotypwechsel von M1- zu M2-Makrophagen induzieren können, um so die Granulom-Bildung zu inhibieren und letztlich die Progression der Niereninsuffizienz zu verlangsamen. Zwei Therapien wurden getestet. Therapiebeginn war Tag 14. Zum einen wurden hyperurikämische Mäuse mit Niereninsuffizienz mit Tofacitinib, einem Immunsuppressivum aus der Wirkstoffgruppe der selektiven Januskinase-Inhibitoren, und zum anderen mit Adenosin, welches Adenosinrezeptoren bei Makrophagen aktiviert, behandelt. Obwohl die pharmakologische Behandlung der Tiere mit Tofacitinib keinen protektiven Effekt hatte, induzierte Adenosin einen Makrophagen-Phänotypwechsel von M1- zu M2-Makrophagen. Dieser Makrophagen-Phänotypwechsel reduzierte die Anzahl renaler Harnsäurekristallgranulome und verbesserte somit die Nierenfunktion im Vergleich zu Vehicle-behandelten Tieren (unveröffentlichte Daten). Diese Daten stehen im Einklang mit anderen *in vivo* Studien, die zeigen, dass die Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren bei Makrophagen einen protektiven Effekt auf die Nierenfunktion hat.⁹⁶⁻¹⁰²

Zusammenfassend sei gesagt, dass die asymptotische Hyperurikämie keinen Nierenschaden verursacht und auch nicht zur Progression einer bestehenden Niereninsuffizienz beiträgt. Nur eine Hyperurikämie mit Kristallurie begünstigt die Progression einer Niereninsuffizienz. Harnsäurekristallgranulome treten in 1 von 1,000 Nierenbiopsien auf und assoziieren mit mehr interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie. Unser innovatives Tiermodell verdeutlichte, dass Harnsäurekristallgranulome überwiegend

aus M1-Makrophagen bestehen und sich sekundär zu einer existierenden interstitiellen Fibrose bilden, was letztendlich zur Progression der Niereninsuffizienz beiträgt (Abbildung 9, unveröffentlichte Daten). Eine Therapie mit Adenosin könnte der Progression der granulomatösen Nephritis entgegenwirken.

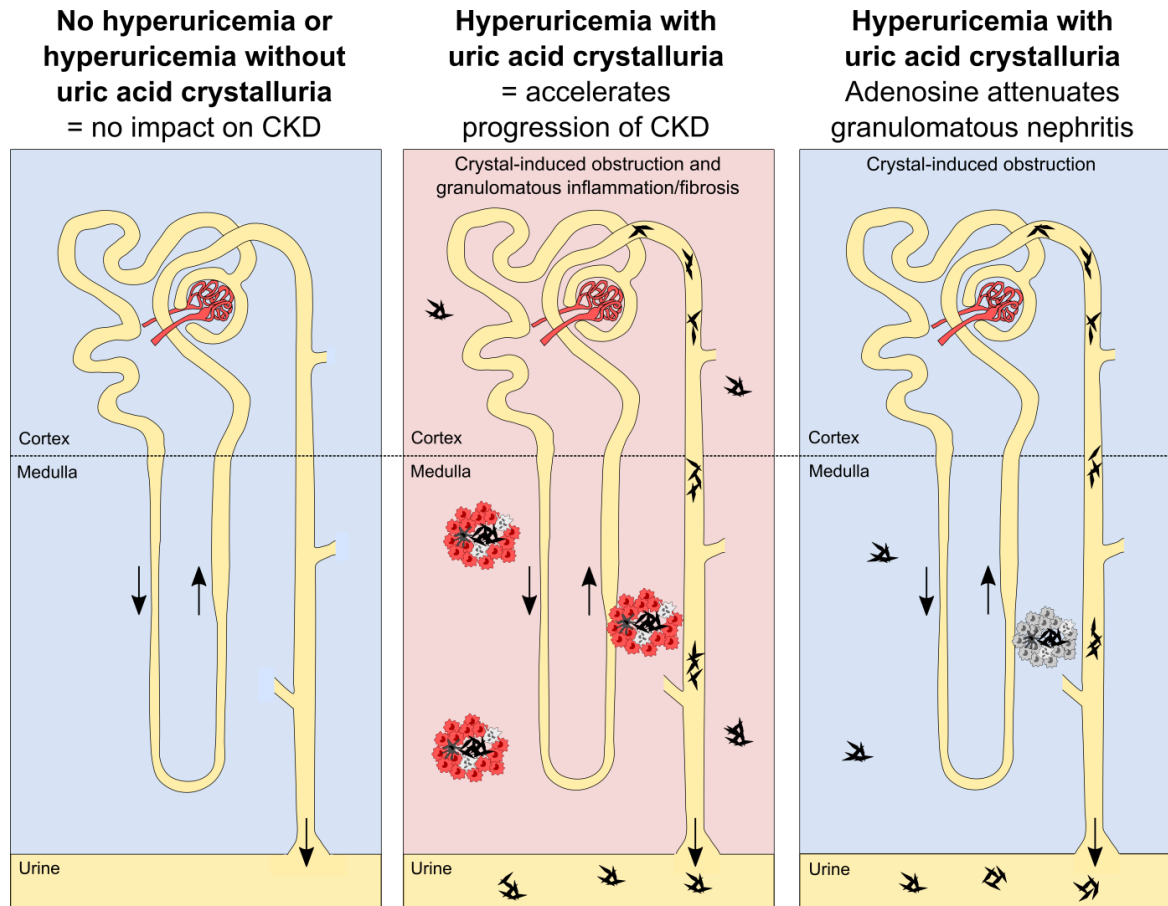


Abbildung 9: Mechanismen der Hyperurikämie und Harnsäurekristallurie bei chronischer Niereninsuffizienz mit granulomatöser Nephritis. Das Fehlen oder Vorhandensein einer Hyperurikämie ohne Kristallurie verursacht keine chronische Nierenerkrankung. Nur wenn Harnsäure aufgrund eines niedrigen pH-Werts im Urin ausfällt, verursachen Harnsäurekristallablagerungen (Kristallurie) eine tubuläre Obstruktion, was zu einer Hyperurikämie-bedingten Niereninsuffizienz führt, die mit Entzündung und interstitieller Fibrose einhergeht. Schließlich schieben sich die Kristallablagerungen ins Interstitium. Im Interstitium führt frustrierte Phagozytose großer Kristallmassen zur Bildung von Harnsäurekristall-granulomen, die aus M1-Makrophagen bestehen. Diese Harnsäurekristallgranulome tragen zum Fortschreiten der chronischen Niereninsuffizienz mit granulomatöser Nephritis bei. Während einer Hyperurikämie mit Harnsäurekristallurie wird durch die Modulation des pro-inflammatorischen M1-Makrophagen-Phänotyps mit Adenosin die granulomatöse interstitielle Nephritis abgeschwächt.

Hyperurikämie bei akuten Nierenversagen

Das akute Nierenversagen geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Die Hyperurikämie ist bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion häufig. Obwohl es keinen Zweifel gibt, dass die kristalline Harnsäure akute und chronische Nephropathien, Urolithiasis und Nierensteinerkrankungen verursacht, ist die Pathogenese der asymptomatischen Hyperurikämie bei akuten Nierenversagen unvollständig verstanden. *In vivo* Studien zeigen, dass erhöhte Harnsäure-Spiegel zu endothelialer Dysfunktion, Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und oxidativen Stress führen. Allerdings sind diese Tiermodelle ungeeignet, da sie nicht das klinische Bild einer Hyperurikämie widerspiegeln (siehe Stand der Forschung). Um dieses Problem zu lösen, haben wir ein Tiermodell zum akuten Nierenversagen mit klinisch relevanten Harnsäure-Spiegeln etabliert und die Hypothese aufgestellt, dass die asymptomatische Hyperurikämie die Nierenfunktion nach akuten Nierenversagen verbessert, indem die Stoffwechselaktivität und die mitochondriale Biogenese in Makrophagen und Tubulusepithelzellen wiederhergestellt wird. Makrophagen spielen sowohl während der akuten Phase (als pro-inflammatorische M1-Makrophagen) als auch der Regenerationsphase (als alternativ-aktivierte M2-Makrophagen) bei dem akuten Nierenversagen eine wesentliche Rolle.¹⁰³ Für die Differenzierung von M2-Makrophagen ist u.a. die Oxidation von Fettsäuren (FAO) und oxidative Phosphorylierungen (OXPHOS) entscheidend,¹⁰⁴ hingegen die aerobe Glykolyse für einen pro-inflammatorischen M1-Makrophagen-Phänotyp.¹⁰⁵ Es ist möglich, dass die Hyperurikämie (lösliche Harnsäure) anti-oxidativ wirkt.

Um dies zu testen, wurden Knochenmarkzellen von Mäusen isoliert und *in vitro* mit dem Wachstumsfaktor M-CSF in Makrophagen differenziert. Anschließend wurden die Makrophagen unter Hypoxie-Bedingungen, um einen Ischämischen Nierenschaden zu simulieren, mit oder ohne lösliche Harnsäure kultiviert. Im Vergleich zu Normoxie-Bedingungen induzierte die Hypoxie eine vermehrte Produktion von IL-6 bei Makrophagen, ein pro-entzündlicher Effekt, der in Gegenwart von Harnsäure inhibiert wurde (unveröffentlichte Daten). Zudem erhöhten sich die mRNA Expressionswerte oxidativer Fettsäuren bei Makrophagen unter Hypoxie-Bedingungen signifikant. Hingegen verstärkte die lösliche Harnsäure diesen Effekt. Ähnliche Ergebnisse konnten bei Makrophagen beobachten, die mit Zellüberständen nekrotischer Tubulusepithelzellen stimuliert wurden. Das heißt, dass die lösliche Harnsäure die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren

unterdrückt, aber die Fettsäureoxidation und metabolische Aktivität signifikant bei Makrophagen steigert (unveröffentlichte Daten).

Um dies auch *in vivo* zu untersuchen, wurde ein akutes Nierenversagen durch Ischämie/Reperfusion (IR) bei Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäusen und *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltieren mit und ohne Hyperurikämie induziert. Folgende Analysen wurden durchgeführt: kolorimetrischen Assays, Immunfärbungen, Bestimmung der GFR, Durchflusszytometrie und RT-qPCR. Unsere Daten zeigen, dass die Harnsäure-Spiegel von 7 auf 10 mg/dL bei hyperurikämischen Tieren drei Tage nach IR-induzierten Nierenversagen anstiegen (HU+IR), hingegen nach 14 Tagen auf 7 mg/dL abnahmen (Abbildung 10A, unveröffentlichte Daten). Nach IR-induzierten Nierenversagen verschlechterte sich die Nierenfunktion (GFR) in beiden Gruppen signifikant (Abbildung 10B, unveröffentlichte Daten). Allerdings konnten wir keinen Unterschied am Tag 3 zwischen hyperurikämischen Tieren (HU+IR) und Tieren ohne Hyperurikämie (w/o HU+IR) beobachten (Abbildung 10B, unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz dazu war die Nierenfunktion bei hyperurikämischen Tieren (HU+IR) am Tag 14 signifikant besser – Abnahme von Serum-Harnstoff und –Kreatinin und Anstieg der GFR – im Vergleich zu Tieren ohne Hyperurikämie (w/o HU+IR). Immunhistologische Färbungen und RT-PCR zeigten einen verminderten Tubulusschaden, Entzündung und interstitielle Fibrose in hyperurikämischen Mäusen nach akuten Nierenversagen sowie eine gesteigerte renale Fettsäureoxidation (*Cpt1*, *Pparg* und *Pgc1b*) und mitochondriale Biogenese bei Tubulusepithelzellen (Abbildung 10C, unveröffentlichte Daten) sowie ein vermehrtes Auftreten von M2-Makrophagen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die asymptotische Hyperurikämie das *Outcome* nach IR-induzierten akuten Nierenversagen verbessert, da die Hyperurikämie den tubulären Schaden und die Entzündungsreaktion abschwächt. Darüber hinaus, verstärkt die Hyperurikämie die Stoffwechselaktivität und die Akkumulation entzündungshemmender M2-Makrophagen sowie die Mitochondrien-Biogenese der Tubuluszellen. Das heißt, dass die Hyperurikämie möglicherweise als Antioxidans wirkt, indem sie die Regeneration der Niere nach akuten Nierenversagen verbessert.

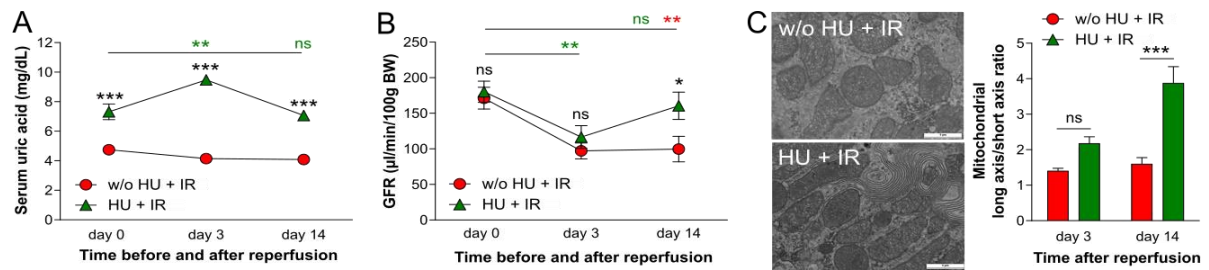


Abbildung 10: Asymptomatische Hyperurikämie verbessert die *Outcomes* nach akuten Nierenversagen. Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Mäuse (HU+IR) und *Glut9*^{lox/lox} Kontrolltriere (w/o HU+IR) wurden mit Tamoxifen injiziert. Beiden Gruppen wurde eine Standarddiät mit Inosin verabreicht und ein akutes Nierenversagen mittels Ischämie-Reperfusion induziert. (A) Serumharnsäure-Werte. (B) Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) beider Gruppen von Tag 0 bis Tag 14. (C) Elektronmikroskopie von Tubulusepithelzellen beider Gruppen und Quantifizierung. (unveröffentlichte Daten)

3.3 Die Regulierung und Differenzierung von Makrophagen bei Kristall-induzierten akuten und chronischen Erkrankungen.

Das letzte Thema dieser Habilitationsarbeit befasst sich mit der Regulierung und Differenzierung verschiedener Makrophagen-Phänotypen bei Kristall-induzierten akuten und chronischen Erkrankungen, wie der Gichtarthritis und Nephrolithiasis.

Makrophagen bei akuter Gichtarthritis

Studien zeigen, dass der selbstlimitierende Charakter eines akuten Gichtanfalls unter anderen mit dem Differenzierungsstatus von Makrophagen zusammenhängt. Zum Beispiel begünstigt die Phagozytose apoptotischer Neutrophile die Freisetzung des anti-entzündlichen Zytokins *transforming growth factor* (TGF) β und somit die Differenzierung von M1- in M2-Makrophagen (Abbildung 11).⁷⁹ Wie genau das Immunsystem auf einen sekundären Gichtanfall reagiert, ist derzeit nicht bekannt. Um dies genauer zu untersuchen wurden Mäusen intraperitoneal Harnsäurekristalle gespritzt, um somit eine akute Entzündungsreaktion auszulösen. 48 Stunden später erhielten diese Tiere eine zweite Harnsäurekristall-Injektion. Anschließend wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Immunzellinfiltrate aus dem Peritoneum extrahiert und weitere *ex vivo* Experimente durchgeführt, wie z.B. Phagozytose-Assays mit Makrophagen.^{79, 106} Die Daten zeigten, dass Monozyten nach wiederkehrender Harnsäurekristall-induzierten Entzündung in einen pro-inflammatorischen M1-Makrophagen-Phänotyp differenzieren, ein Prozess, der von dem Wachstumsfaktor *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* abhängig ist. Dies

bedeutet auf eine verstärkte Entzündungsreaktion nach einem erneuten Gichtanfall hin.⁷⁹

106

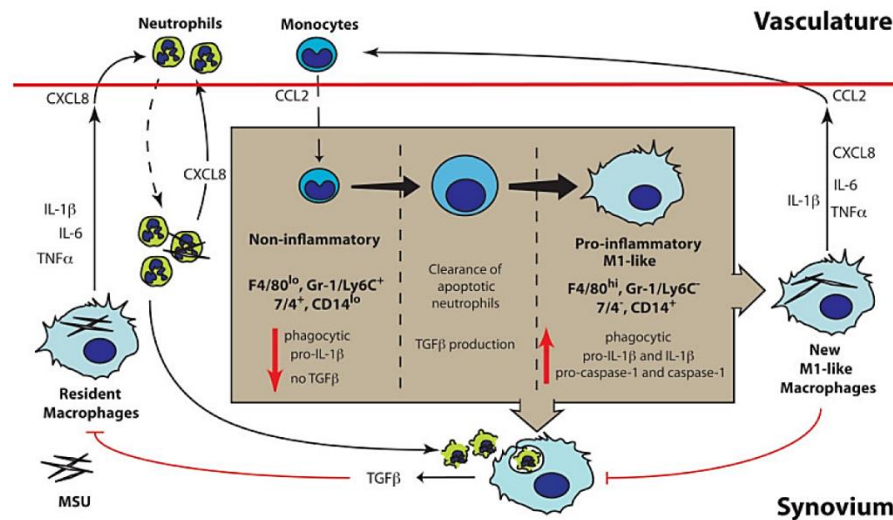


Abbildung 11: Schematische Darstellung verbildlicht das phänotypische Profil der Monozyten-zu-Makrophagen-Differenzierung *in vivo* nach einer akuten Harnsäurekristall-induzierten Entzündung.⁷⁹

Makrophagen bei chronischer Niereninsuffizienz

Ein charakteristisches Merkmal der chronischen Niereninsuffizienz ist die Infiltration und Differenzierung von Makrophagen. Die Anzahl infiltrierender Makrophagen in die Niere hängt u.a. vom Schweregrad des Nierenschadens ab.⁸⁰ Dies bedeutet, dass aufgrund eines Nierenschadens endogene Faktoren, wie Zytokine und Chemokine, freigesetzt werden, die letztlich zur Aktivierung residenter und infiltrierender Makrophagen führt. Je nach lokalem Schweregrad des Nierenschadens werden unterschiedliche Faktoren freigesetzt, auch bekannt als Mikroumgebung, welche die Differenzierung unterschiedlicher Makrophagen-Phänotypen begünstigt (Abbildung 1 und 2).¹⁰⁷

Akute und chronische Nierenerkrankungen sind multifaktorielle Erkrankungen unterschiedlicher Ursache. Daher ist die Wahl eines geeigneten Tiermodells entscheidend, um wichtige Aspekte der Nierenschädigung und ihre pathophysiologischen Mechanismen zu untersuchen. Die Umsetzung experimenteller Daten in die Klinik stellt eine große Herausforderung dar, daher sollte eine besondere Aufmerksamkeit den *in vitro* und *in vivo* Studien gewidmet werden. Aus diesem Grund wurden eine Reihe von *in vitro* Experimenten durchgeführt und verschiedene bereits publizierte Tiermodelle zur Nierenschädigung miteinander verglichen: 1. Aristolochinsäure-induzierte akute und chronische Nierenschädigung, 2. unilaterale Ischämie-Reperfusion, 3. Cisplatin- sowie 4. Folsäure–

induzierte Niereninsuffizienz.⁹¹ Im Vergleich zu allen getesteten Tiermodellen waren Serum-Kreatinin und –Harnstoff nach Injektion von Aristolochinsäure significant erhöht. Die Aristolochinsäure-induzierten Tiermodelle zeigten klassische Eigenschaften einer akuten und chronischen Nierenschädigung, u.a. kam es zur Abnahme der Nierenfunktion, zum vermehrten Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen, zur Tubulusatrophie und interstitiellen Fibrose.⁹¹ Unsere *in vitro* und *in vivo* Daten zeigen, dass Makrophagen bei der Pathogenese der Aristolochinsäure-induzierten Niereninsuffizienz eine wichtige Rolle spielen, da sie vermehrt in der Niere akkumulieren und in einen M2-Makrophagen-Phänotyp differenzieren.⁹¹ Aus diesem Grund stellt das Aristolochinsäure-induzierte Tiermodell ein geeignetes und relativ einfaches Tiermodell dar, um Untersuchungen bei akuten und chronischen Nierenerkrankungen durchzuführen,⁹¹ aber insbesondere um detaillierte Fragestellungen zu Makrophagen-Phänotypen in der Niere zu beantworten.

Kristallopathien sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die durch intrinsische oder umweltbedingte Faktoren verursacht werden. Zum Beispiel können sich neben Harnsäurekristallen (Uratnephropathie) auch Kalziumoxalatkristalle in der Niere ablagern, die eine Entzündungsreaktion (NLRP3 Inflammasom Aktivierung), Tubulusatrophie und interstitielle Fibrose verursachen.^{108, 109} Kalziumoxalat-Nierensteine führen letztlich zur Niereninsuffizienz. Therapien zur Vorbeugung von Kalziumoxalatkristall-Nephropathien und/oder Nephrokalziosen beruhen überwiegend auf der Senkung von Serum- und Urinoxalat, einer Oxalat-reduzierten Diät, Kalziumergänzungsmitteln sowie entzündungshemmende Therapien bei Patienten mit primärer/sekundärer Hyperoxalurie. Um die Rolle des NLRP3 Inflammasom bei Nephrokalzinose näher zu untersuchen, haben wir Mäusen eine Oxalat-reiche Diät mit und ohne den NLRP3 Inflammasom Inhibitor *b*-hydroxybutyrate precursor 1,3-butanediol (BHB) oder dem IL-1R Antagonist Anakinra gefüttert. Unsere Ergebnisse zeigten, dass BHB-Therapie einen renoprotektiven Effekt bei Kalziumoxalat-induzierter Nephropathie hat.¹¹⁰ Dies ging mit einer reduzierten Anzahl renaler pro-inflammatorischer M1- (CD45+F4/80+CD11b+CX3CR1+CD206-) und pro-fibrotischer M2-Makrophagen (CD45+F4/80+CD11b+CX3CR1+CD206+TGFβ+) einher, wohingegen die Anzahl anti-entzündlicher M2-Makrophagen (CD45+F4/80+CD11b+CD206+TGFβ-) signifikant anstieg. Hingegen hatte Anakinra-Therapie bei Tieren mit einer Nephrokalzinose keinen protektiven Effekt.¹¹⁰ Insgesamt stellt das NLRP3 Inflammasom ein mögliches Target für die Behandlung der Hyperoxalurie und Nephrokalzinose dar.¹¹⁰

Ein weiteres Teilprojekt befasste sich mit der Fragestellung, ob anti-TGF β IgG Therapie die interstitielle Fibrose sowie den Kristallisationsprozess von Kalziumoxalat beeinflussen kann. Bisherige Studien schreiben TGF β eine anti-inflammatorische Rolle zu, wie bei der akuten Gichtarthritis,^{79, 111} hingegen andere eine pro-fibrotische Wirkung. Somit fördert TGF β die Nierenfibrose.¹¹²⁻¹¹⁴ Um dies bei der Nephrokalzinose genauer zu untersuchen, wurde Mäusen eine Oxalat-reiche Diät für 14 Tage gefüttert und anti-TGF β IgG Antikörper oder IgG Kontrollantikörper präventiv injiziert. Die *in vivo* Ergebnisse zeigten, dass die Bildung von Kalziumoxalat-Kristallen nach IgG Kontrollantikörper-Gabe und verstärkt nach anti-TGF β IgG Antikörper-Behandlung signifikant im Vergleich zu Mäusen reduziert war.¹¹⁵ Die verminderte Kristallbildung führte zu einer reduzierten Tubulusatrophie, Entzündung und interstitieller Fibrose sowie einer verbesserten Nierenfunktion. IgG Kontrollantikörper-Behandlung reduzierte die Anzahl renaler pro-inflammatorischer M1- (CD45+F4/80+CD11b+CX3CR1+CD206-) und pro-fibrotischer M2-Makrophagen (CD45+F4/80+CD11b+CX3CR1+CD206+TGF β +), aber erhöhte die Anzahl anti-entzündlicher M2c-Makrophagen (CD45+F4/80+CD11b+CD206+TGF β -) im Vergleich zu unbehandelten Mäusen mit Nephrokalzinose.¹¹⁵ Die Therapie mit anti-TGF β IgG begünstigte die Differenzierung von M2c-Makrophagen im Vergleich zur IgG Kontrolle.¹¹⁵ Unsere Daten deuten auf einen dualen therapeutischen Effekt von anti-TGF β IgG hin. Zum einen inhibiert anti-TGF β IgG die Kalziumoxalat-Kristallbildung, und zum anderen wirkt die anti-TGF β IgG Antikörper-Therapie renoprotektiv bei Nephrokalzinose.¹¹⁵ Ähnliche renoprotektive Effekte konnten wir mit dem Protein Pentraxin 3 bei Hyperoxalurie-vermittelter Nephrokalzinose *in vivo* beobachtet.¹¹⁶

Die Aktivierung verschiedener angeborener Immunrezeptoren trägt zur *IL-1-receptor-assoziiated kinase* (IRAK)-1/IRAK-4-vermittelten Signalwegaktivierung und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine bei, molekulare Mechanismen, die bei renaler Gewebeschädigung und Gewebeumbau eine wichtige Rolle spielen. IRAK-M, auch bekannt als IRAK-3, ist ein Inhibitor pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine.¹¹⁷ Die Rolle von IRAK-M bei der Differenzierung von alternativ-aktivierten Makrophagen und der Nierenfibrose ist bisher nicht gut verstanden. Wir hatten die Hypothese aufgestellt, dass IRAK-M die postobstruktive Tubulusatrophie und Nierenfibrose unterdrückt, indem es die Nierenentzündung inhibiert. Um die funktionelle Rolle von IRAK-M zu untersuchen, haben wir ein durch postobstruktive unilaterale Ureterobstruktion (UUO)-induziertes Tiermodell

verwendet.¹¹⁸ Bereits zwei Tage nach UUO war ein signifikanter Anstieg von IRAK-M mRNA und Protein-Expressionswerten in Wildtypmäußen im Vergleich zu gesunden Tieren zu beobachten.¹¹⁸ IRAK-M-defiziente Mäuse wiesen eine verminderte Anzahl alternativer aktivierter Makrophagen auf, was mit weniger interstitieller Fibrose einherging.¹¹⁸ Im Vergleich zu Wildtypmäusen, zeigten IRAK-M-defiziente Mäuse eine verminderte Tubulusatrophie, Leukozyteninfiltration und Entzündungsreaktion nach UUO.¹¹⁸ Zusammenfassend kann man sagen, dass IRAK-M eine wichtige Rolle bei der Progression der Niereninsuffizienz spielt, da IRAK-M die Differenzierung und Funktionen alternativer aktivierter pro-fibrotischer Makrophagen beeinflusst.¹¹⁸

Die akute Nierenschädigung ist ein komplexes Krankheitsbild, das durchschnittlich 50% der Patienten auf Intensivstationen betrifft und mit erhöhter Mortalität und Morbidität einhergeht. Als häufigste Ursachen einer akuten Nierenschädigung sind die Sepsis, gefolgt von medikamenteninduzierter Schädigung und Herzinsuffizienz. Die ischämisch bedingte akute Nierenschädigung ist eine häufige Komplikation bei Organtransplantation.¹¹⁹ Dabei ist Minderperfusion der Nieren in den meisten Fällen als Ursache für ein akutes Nierenversagen¹²⁰ anzusehen, was letztlich zur interstitiellen Fibrose in der eigenen oder transplantierten Niere beiträgt.¹²¹ In diesem Forschungsprojekt haben wir uns die Rolle von *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) nach renalen Ischämie-Reperfusionsschadens untersucht. Unsere *in vitro* Daten zeigen, dass eine duale Aktivierung von Janus Kinase 2/STAT1- und Toll-like-Rezeptor-4 zur verstärkten STAT1-Aktivierung und Zytokin-Produktion im Vergleich zur individuellen Signalwegaktivierung bei murinen Tubulusepithelzellen beiträgt.¹²² Eine Aktivierung von STAT1 konnte auch bei murinen Tubulusepithelzellen unter Hypoxie-Bedingungen beobachtet werden.¹²² Im Tiermodell begünstigte eine STAT1-Defizienz den *Outcome* nach akuten Nierenversagen (24 Stunden), was letztlich mit weniger Tubulusatrophie und Infiltration von Makrophagen im Vergleich zu Wildtypmäußen einherging.¹²² Nierenschnitte von STAT1-defizienten Mäusen zeigten signifikant mehr interstitielle Fibrose und Makrophagen-Infiltrate 30 Tage nach Nierenischämie. Zudem begünstigte die STAT1-Defizienz die Differenzierung von alternativ-aktivierten M2-Makrophagen.¹²² Die Expression von CD80 und Produktion von intrazellulären ROS war bei den M2-Makrophagen stark reduziert, dagegen deren Fähigkeit apoptotische Zellen zu phagozytieren erhöht.¹²² Immunhistochemische Färbungen von Nierenbiopsien zeigte eine erhöhte STAT1-Expression in Biopsien von

Nierentransplantierten ohne interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie im Vergleich zu Biopsien mit schwerer interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie ohne spezifische Ätiologie nachweisen.¹²² Zusammenfassend kann man sagen, dass die STAT1-Aktivierung einen M2-Makrophagen-Phänotyp fördert und somit die Wundheilung begünstigt. Dies spricht für einen STAT1-gesteuerten Schutzmechanismus beim Gewebeumbau nach Ischämie-Reperfusionsschaden.¹²²

4. Ausblick

Dieses Habilitationsprojekt befasste sich mit den Effekten der löslichen und kristallinen Harnsäure bei akuter Gichtarthritis und bei Nierenerkrankungen. Die *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse verdeutlichen, dass die lösliche Harnsäure als endogener Negativregulator des Immunsystems agiert. Bis dato wurde angenommen, dass die asymptotische Hyperurikämie Entzündungsreaktionen auslöst. Dies ist nicht der Fall. Im Gegenteil, die asymptotische Hyperurikämie wirkt entzündungshemmend (siehe Eigene Vorarbeiten). Unter dieser Annahme können einige bisher ungeklärte klinische Beobachtungen erklärt werden. Dennoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um die molekularen und zellulären Mechanismen der löslichen Harnsäure genauer zu untersuchen, sowie die Effekte der asymptotischen Hyperurikämie bei anderen Formen von steriler Entzündungen und sekundären Immundefekten bei Niereninsuffizienz.

Die lösliche Harnsäure inhibiert die Aktivierung von $\beta 2$ Integrinen bei Neutrophilen durch die intrazelluläre Aufnahme der löslichen Harnsäure mittels Urattransportproteinen, was letztendlich das Migrationspotential vermindert. Neutrophile von hyperurikämischen Niereninsuffizienten weisen im Vergleich zu Neutrophilen von gesunden Individuen ein eingeschränktes Migrationspotential auf. Bisher ist unklar, ob die lösliche Harnsäure auch andere Integrin- oder Chemokinrezeptoren reguliert oder einen direkten Effekt auf das Integrin *Recycling* bei Neutrophilen hat. Diese molekularen Mechanismen sollen nun in Kooperation mit Prof. Markus Sperandio (BMC München) und Dr. Ralph Böttcher (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) genauer untersucht werden. Neutrophile, wie auch Fibroblasten,¹²³ transportieren unter anderen Integrine in intrazellulären Vesikeln zur Zelloberfläche. Dieser Immunprozess ist für eine schnelle Migration von Neutrophilen aus dem Blut ins entzündete Gewebe entscheidend.^{124, 125} Nun sollen zahlreiche *in vitro* Experimente, zum Beispiel Integrin Internalization Assays mit humanen Neutrophilen sowie eine umfangreiche Durchflusszytometrische Analyse zur Expression verschiedener Integrin- und Chemokinrezeptoren durchgeführt werden.

Eine Alternative zu den Alb-creERT2;*Glut9*^{lox/lox} Tieren könnten z.B. homozygote *Uox*^{-/-} Mäuse (B6;129S7-*Uox*^{tm1Bay}/J, Jackson Laboratory) sein. Allerdings entwickeln diese Tiere eine schwere Hyperurikämie und Uratnephropathie, und etwa 65% der homozygoten Mäuse sterben im Alter von 4 Wochen, sofern sie nicht mit Allopurinol behandelt werden. Andere *in vivo* Daten mit *Uox*^{-/-} Mäusen bestätigen diesen starken Phänotyp.^{126, 127} Daher sind diese

Tiermodelle nur schwer kontrollierbar und die Behandlung mit Allopurinol könnte zu pathologischen Veränderungen führen. Um diese Hürden zu überwinden, habe ich in Kooperation mit PD Dr. Bruno Luckow (Universitätsklinikum, LMU München, Med. IV) und dem Helmholtz Zentrum München (EUCOMM, German Research Center for Environmental Health) in den letzten Jahren eine neue $Uox^{-/-}$ Mauslinie generiert (in C57BL/6N embryonalen Stammzellen). Erste *in vivo* Experimente zeigten, dass die homozygoten $Uox^{-/-}$ Tiere keinen spontanen Phänotyp entwickelten, d.h. die Tiere sind gesund und entwickeln keine Hyperurikämie (Harnsäure-Spiegel 3-5 mg/dL) noch eine Uratnephropathie. Nur die Applikation einer Standarddiät+Inosin führte bei den homozygoten $Uox^{-/-}$ Tieren zu einer Hyperurikämie (Harnsäure-Spiegel 7-10 mg/dL), nicht aber bei den heterozygoten $Uox^{+/-}$ und $Uox^{+/+}$ Kontrolltieren. Neben den Uox knockout Mäusen soll ein induzierbares Uox -Mausmodell unter Verwendung von Alb-creERT2; $Uox^{lox/lox}$ Mäusen etabliert werden, um mittels Tamoxifen Uox in den Hepatozyten auszuschalten. Als konzeptioneller Beweis zum bisherigen Hyperurikämie Tiermodell soll zukünftig der Effekt der Hyperurikämie bei steriler Inflammation und Infektion auch in beiden Uox Mauslinien untersucht werden.

Die asymptomatische Hyperurikämie wirkt entzündungshemmend bei steriler Entzündung, wie der Gichtarthritis. Ob dies bei Infektionen auch der Fall ist, ist spekulativ und soll weiterführend untersucht werden. Das terminale Nierenversagen (ESKD) ist ein Zustand erworbener Immunsuppression mit eingeschränkter Impfantwort,^{128, 129} was letztendlich die hohe Mortalitätsrate bei Dialysepatienten erklärt.¹³⁰ Das erhöhte Infektionsrisiko bei ESKD Patienten ist auf eine eingeschränkte Immunantwort zurückzuführen. Mechanismen, die dabei eine Rolle spielen, sind u.a. die eingeschränkte Fähigkeit von Neutrophilen Bakterien zu töten und das verminderte Migrationsverhalten der Neutrophilen.¹³¹⁻¹³³ Des Weiteren zeigen *ex vivo* Studien, dass LPS-aktivierte Monozyten von ESKD Patienten weniger pro-inflammatorische Zytokine freisetzen.^{134, 135} Ob die asymptotische Hyperurikämie zur Immundefizienz bei ESKD Patienten beiträgt und ob diese Patienten von einer Harnsäure-senkenden Therapie zur Abwehr bakterieller und viraler Infekte profitieren könnten, ist bisher unklar. Dies soll in zukünftigen *ex vivo* und *in vivo* Experimenten erforscht werden, z.B. Peritonitis, Sepsis, virale Infektionen.

Meine bisherigen Forschungsarbeiten und die klinische Relevanz der Hyperurikämie bestärken mich, meine berufliche Zukunft der rheumatologischen, physiologischen und nephrologischen Forschung zu widmen. Daher strebe ich die Habilitation im Fach Experimentelle Medizin an.

5. Literaturverzeichnis

Fett markiert sind meine original Erst- und Koautorschaften – Zeitraum 2011-2020.

1. Oda, M., Y. Satta, O. Takenaka, and N. Takahata, *Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications*. Mol Biol Evol, 2002. **19**(5): p. 640-53.
2. So, A. and B. Thorens, *Uric acid transport and disease*. J Clin Invest, 2010. **120**(6): p. 1791-9.
3. Crisan, T.O., M.C. Cleophas, M. Oosting, H. Lemmers, H. Toenhake-Dijkstra, M.G. Netea, T.L. Jansen, and L.A. Joosten, *Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra*. Ann Rheum Dis, 2016. **75**(4): p. 755-62.
4. Crisan, T.O., M.C.P. Cleophas, B. Novakovic, K. Erler, F.L. van de Veerdonk, H.G. Stunnenberg, M.G. Netea, C.A. Dinarello, and L.A.B. Joosten, *Uric acid priming in human monocytes is driven by the AKT-PRAS40 autophagy pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(21): p. 5485-5490.
5. Sautin, Y.Y., T. Nakagawa, S. Zharikov, and R.J. Johnson, *Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(2): p. C584-96.
6. Luo, N., J. Liu, B.H. Chung, Q. Yang, R.L. Klein, W.T. Garvey, and Y. Fu, *Macrophage adiponectin expression improves insulin sensitivity and protects against inflammation and atherosclerosis*. Diabetes, 2010. **59**(4): p. 791-9.
7. Khosla, U.M., S. Zharikov, J.L. Finch, T. Nakagawa, C. Roncal, W. Mu, K. Krotova, E.R. Block, S. Prabhakar, and R.J. Johnson, *Hyperuricemia induces endothelial dysfunction*. Kidney Int, 2005. **67**(5): p. 1739-42.
8. Choi, Y.J., Y. Yoon, K.Y. Lee, T.T. Hien, K.W. Kang, K.C. Kim, J. Lee, M.Y. Lee, S.M. Lee, D.H. Kang, and B.H. Lee, *Uric acid induces endothelial dysfunction by vascular insulin resistance associated with the impairment of nitric oxide synthesis*. FASEB J, 2014. **28**(7): p. 3197-204.
9. Park, J.H., Y.M. Jin, S. Hwang, D.H. Cho, D.H. Kang, and I. Jo, *Uric acid attenuates nitric oxide production by decreasing the interaction between endothelial nitric oxide synthase and calmodulin in human umbilical vein endothelial cells: a mechanism for uric acid-induced cardiovascular disease development*. Nitric Oxide, 2013. **32**: p. 36-42.
10. Parkinson Study Group, S.-P.D.I., M.A. Schwarzschild, A. Ascherio, M.F. Beal, M.E. Cudkowicz, G.C. Curhan, J.M. Hare, D.C. Hooper, K.D. Kieburtz, E.A. Macklin, D. Oakes, A. Rudolph, I. Shoulson, M.K. Tennis, A.J. Espay, M. Gartner, A. Hung, G. Bwala, R. Lenehan, E. Encarnacion, M. Ainslie, R. Castillo, D. Togasaki, G. Barles, J.H. Friedman, L. Niles, J.H. Carter, M. Murray, C.G. Goetz, J. Jaglin, A. Ahmed, D.S. Russell, C. Cotto, J.L. Goudreau, D. Russell, S.A. Parashos, P. Ede, M.H. Saint-Hilaire, C.A. Thomas, R. James, M.A. Stacy, J. Johnson, L. Gauger, J. Antonelle de Marcaida, S. Thurlow, S.H. Isaacson, L. Carvajal, J. Rao, M. Cook, C. Hope-Porche, L. McClurg, D.L. Grasso, R. Logan, C. Orme, T. Ross, A.F. Brocht, R. Constantinescu, S. Sharma, C. Venuto, J. Weber, and K. Eaton, *Inosine to increase serum and cerebrospinal fluid urate in Parkinson disease: a randomized clinical trial*. JAMA Neurol, 2014. **71**(2): p. 141-50.
11. Ascherio, A., P.A. LeWitt, K. Xu, S. Eberly, A. Watts, W.R. Matson, C. Marras, K. Kieburtz, A. Rudolph, M.B. Bogdanov, S.R. Schwid, M. Tennis, C.M. Tanner, M.F. Beal, A.E. Lang, D. Oakes, S. Fahn, I. Shoulson, M.A. Schwarzschild, and D.I. Parkinson Study Group, *Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease*. Arch Neurol, 2009. **66**(12): p. 1460-8.
12. Ames, B.N., R. Cathcart, E. Schwiers, and P. Hochstein, *Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(11): p. 6858-62.
13. Lai, K.J., C.T. Kor, and Y.P. Hsieh, *An Inverse Relationship between Hyperuricemia and Mortality in Patients Undergoing Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis*. J Clin Med, 2018. **7**(11).

14. Komori, H., K. Yamada, and I. Tamai, *Hyperuricemia enhances intracellular urate accumulation via down-regulation of cell-surface BCRP/ABCG2 expression in vascular endothelial cells*. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2018. **1860**(5): p. 973-980.
15. Itahana, Y., R. Han, S. Barbier, Z. Lei, S. Rozen, and K. Itahana, *The uric acid transporter SLC2A9 is a direct target gene of the tumor suppressor p53 contributing to antioxidant defense*. *Oncogene*, 2015. **34**(14): p. 1799-810.
16. Hink, H.U., N. Santanam, S. Dikalov, L. McCann, A.D. Nguyen, S. Parthasarathy, D.G. Harrison, and T. Fukai, *Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(9): p. 1402-8.
17. Davies, K.J., A. Sevanian, S.F. Muakkassah-Kelly, and P. Hochstein, *Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid*. *Biochem J*, 1986. **235**(3): p. 747-54.
18. Einsele, H., M.R. Clemens, U. Wegner, and H.D. Waller, *Effect of free radical scavengers and metal ion chelators on hydrogen peroxide and phenylhydrazine induced red blood cell lipid peroxidation*. *Free Radic Res Commun*, 1987. **3**(1-5): p. 257-63.
19. Braga, T.T., M.F. Forni, M. Correa-Costa, R.N. Ramos, J.A. Barbutto, P. Branco, A. Castoldi, M.I. Hiyane, M.R. Davanzo, E. Latz, B.S. Franklin, A.J. Kowaltowski, and N.O. Camara, *Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 39884.
20. Kim, S.M., S.H. Lee, Y.G. Kim, S.Y. Kim, J.W. Seo, Y.W. Choi, D.J. Kim, K.H. Jeong, T.W. Lee, C.G. Ihm, K.Y. Won, and J.Y. Moon, *Hyperuricemia-induced NLRP3 activation of macrophages contributes to the progression of diabetic nephropathy*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015. **308**(9): p. F993-F1003.
21. Liang, W.Y., X.Y. Zhu, J.W. Zhang, X.R. Feng, Y.C. Wang, and M.L. Liu, *Uric acid promotes chemokine and adhesion molecule production in vascular endothelium via nuclear factor-kappa B signaling*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2015. **25**(2): p. 187-94.
22. Liu, S., Y. Yuan, Y. Zhou, M. Zhao, Y. Chen, J. Cheng, Y. Lu, and J. Liu, *Phloretin attenuates hyperuricemia-induced endothelial dysfunction through co-inhibiting inflammation and GLUT9-mediated uric acid uptake*. *J Cell Mol Med*, 2017. **21**(10): p. 2553-2562.
23. Kang, D.H., S.K. Park, I.K. Lee, and R.J. Johnson, *Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(12): p. 3553-62.
24. Eisenbacher, J.L., H. Schrezenmeier, B. Jahrsdorfer, C. Kaltenmeier, M.T. Rojewski, T. Yildiz, T. Beyer, A. Erle, D.S. Wiegmann, S. Grassl, R. Hang, S. Korper, M. Wiesneth, M.T. Lotze, and R. Lotfi, *S100A4 and uric acid promote mesenchymal stromal cell induction of IL-10+/IDO+ lymphocytes*. *J Immunol*, 2014. **192**(12): p. 6102-10.
25. Yang, Z., W. Xiaohua, J. Lei, T. Ruoyun, X. Mingxia, H. Weichun, F. Li, W. Ping, and Y. Junwei, *Uric acid increases fibronectin synthesis through upregulation of lysyl oxidase expression in rat renal tubular epithelial cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010. **299**(2): p. F336-46.
26. Romi, M.M., N. Arfian, U. Tranggono, W.A.W. Setyaningsih, and D.C.R. Sari, *Uric acid causes kidney injury through inducing fibroblast expansion, Endothelin-1 expression, and inflammation*. *BMC Nephrol*, 2017. **18**(1): p. 326.
27. Shi, Y.W., C.P. Wang, X. Wang, Y.L. Zhang, L. Liu, R.W. Wang, J.F. Ye, L.S. Hu, and L.D. Kong, *Uricosuric and nephroprotective properties of Ramulus Mori ethanol extract in hyperuricemic mice*. *J Ethnopharmacol*, 2012. **143**(3): p. 896-904.
28. Kuo, C.F., M.J. Grainge, C. Mallen, W. Zhang, and M. Doherty, *Rising burden of gout in the UK but continuing suboptimal management: a nationwide population study*. *Ann Rheum Dis*, 2015. **74**(4): p. 661-7.
29. Mikuls, T.R., J.T. Farrar, W.B. Bilker, S. Fernandes, H.R. Schumacher, Jr., and K.G. Saag, *Gout epidemiology: results from the UK General Practice Research Database, 1990-1999*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(2): p. 267-72.
30. Wallace, K.L., A.A. Riedel, N. Joseph-Ridge, and R. Wortmann, *Increasing prevalence of gout and hyperuricemia over 10 years among older adults in a managed care population*. *J Rheumatol*, 2004. **31**(8): p. 1582-7.
31. Annemans, L., E. Spaepen, M. Gaskin, M. Bonnemaire, V. Malier, T. Gilbert, and G. Nuki, *Gout in the UK and Germany: prevalence, comorbidities and management in general practice 2000-2005*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(7): p. 960-6.

32. Jing, J., J.T. Kielstein, U.T. Schultheiss, T. Sitter, S.I. Titze, E.S. Schaeffner, M. McAdams-DeMarco, F. Kronenberg, K.U. Eckardt, A. Kottgen, and G.S. Investigators, *Prevalence and correlates of gout in a large cohort of patients with chronic kidney disease: the German Chronic Kidney Disease (GCKD) study*. *Nephrol Dial Transplant*, 2015. **30**(4): p. 613-21.
33. Zhu, Y., B.J. Pandya, and H.K. Choi, *Comorbidities of gout and hyperuricemia in the US general population: NHANES 2007-2008*. *Am J Med*, 2012. **125**(7): p. 679-687 e1.
34. Richette, P. and T. Bardin, *Gout*. *Lancet*, 2010. **375**(9711): p. 318-28.
35. Neogi, T., *Clinical practice. Gout*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(5): p. 443-52.
36. Campion, E.W., R.J. Glynn, and L.O. DeLabry, *Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the Normative Aging Study*. *Am J Med*, 1987. **82**(3): p. 421-6.
37. Ryckman, C., S.R. McColl, K. Vandal, R. de Medicis, A. Lussier, P.E. Poubelle, and P.A. Tessier, *Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(8): p. 2310-20.
38. Russell, I.J., C. Mansen, L.M. Kolb, and W.P. Kolb, *Activation of the fifth component of human complement (C5) induced by monosodium urate crystals: C5 convertase assembly on the crystal surface*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1982. **24**(2): p. 239-50.
39. Tramontini, N., C. Huber, R. Liu-Bryan, R.A. Terkeltaub, and K.S. Kilgore, *Central role of complement membrane attack complex in monosodium urate crystal-induced neutrophilic rabbit knee synovitis*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(8): p. 2633-9.
40. Chen, C.J., Y. Shi, A. Hearn, K. Fitzgerald, D. Golenbock, G. Reed, S. Akira, and K.L. Rock, *MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(8): p. 2262-71.
41. Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp, *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome*. *Nature*, 2006. **440**(7081): p. 237-41.
42. Martin, W.J., M. Walton, and J. Harper, *Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(1): p. 281-9.
43. Chapman, P.T., H. Yarwood, A.A. Harrison, C.J. Stocker, F. Jamar, R.H. Gundel, A.M. Peters, and D.O. Haskard, *Endothelial activation in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation: in vitro and in vivo studies on the roles of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1*. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(5): p. 955-65.
44. Amulic, B., C. Cazalet, G.L. Hayes, K.D. Metzler, and A. Zychlinsky, *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 459-89.
45. Mitroulis, I., K. Kambas, A. Chrysanthopoulou, P. Skendros, E. Apostolidou, I. Kourtzelis, G.I. Drosos, D.T. Boumpas, and K. Ritis, *Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1beta and autophagy-related signaling in gout*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e29318.
46. **Desai, J., S. Steiger, and H.J. Anders, *Molecular Pathophysiology of Gout*. *Trends Mol Med*, 2017. **23**(8): p. 756-768.**
47. Schorn, C., C. Janko, V. Krenn, Y. Zhao, L.E. Munoz, G. Schett, and M. Herrmann, *Bonding the foe - NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 376.
48. **Desai, J., O. Foresto-Neto, M. Honarpisheh, S. Steiger, D. Nakazawa, B. Popper, E.M. Buhl, P. Boor, S.R. Mulay, and H.J. Anders, *Particles of different sizes and shapes induce neutrophil necroptosis followed by the release of neutrophil extracellular trap-like chromatin*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 15003.**
49. Yagnik, D.R., B.J. Evans, O. Florey, J.C. Mason, R.C. Landis, and D.O. Haskard, *Macrophage release of transforming growth factor beta1 during resolution of monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(7): p. 2273-80.
50. Landis, R.C., D.R. Yagnik, O. Florey, P. Philippidis, V. Emons, J.C. Mason, and D.O. Haskard, *Safe disposal of inflammatory monosodium urate monohydrate crystals by differentiated macrophages*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(11): p. 3026-33.
51. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(12): p. 953-64.
52. Abhishek, A., E. Roddy, and M. Doherty, *Gout - a guide for the general and acute physicians*. *Clin Med (Lond)*, 2017. **17**(1): p. 54-59.

53. Steiger, S. and J.L. Harper, ***Mechanisms of spontaneous resolution of acute gouty inflammation.*** *Curr Rheumatol Rep*, 2014. **16(1)**: p. 392.
54. Kramer, H.M. and G. Curhan, *The association between gout and nephrolithiasis: the National Health and Nutrition Examination Survey III, 1988-1994.* *Am J Kidney Dis*, 2002. **40(1)**: p. 37-42.
55. Krishnan, E., *Reduced glomerular function and prevalence of gout: NHANES 2009-10.* *PLoS One*, 2012. **7(11)**: p. e50046.
56. Ifudu, O., C.C. Tan, A.L. Dulin, B.G. Delano, and E.A. Friedman, *Gouty arthritis in end-stage renal disease: clinical course and rarity of new cases.* *Am J Kidney Dis*, 1994. **23(3)**: p. 347-51.
57. Ohno, I., K. Ichida, H. Okabe, M. Hikita, D. Uetake, H. Kimura, H. Saikawa, and T. Hosoya, *Frequency of gouty arthritis in patients with end-stage renal disease in Japan.* *Intern Med*, 2005. **44(7)**: p. 706-9.
58. Moe, O.W., *Posing the question again: does chronic uric acid nephropathy exist?* *J Am Soc Nephrol*, 2010. **21(3)**: p. 395-7.
59. Jalal, D.I., M. Chonchol, W. Chen, and G. Targher, *Uric acid as a target of therapy in CKD.* *Am J Kidney Dis*, 2013. **61(1)**: p. 134-46.
60. Obermayr, R.P., C. Temml, G. Gutjahr, M. Knechtelsdorfer, R. Oberbauer, and R. Klauser-Braun, *Elevated uric acid increases the risk for kidney disease.* *J Am Soc Nephrol*, 2008. **19(12)**: p. 2407-13.
61. Whelton, A., P.A. Macdonald, L. Zhao, B. Hunt, and L. Gunawardhana, *Renal function in gout: long-term treatment effects of febuxostat.* *J Clin Rheumatol*, 2011. **17(1)**: p. 7-13.
62. Levy, G.D., N. Rashid, F. Niu, and T.C. Cheetham, *Effect of urate-lowering therapies on renal disease progression in patients with hyperuricemia.* *J Rheumatol*, 2014. **41(5)**: p. 955-62.
63. Siu, Y.P., K.T. Leung, M.K. Tong, and T.H. Kwan, *Use of allopurinol in slowing the progression of renal disease through its ability to lower serum uric acid level.* *Am J Kidney Dis*, 2006. **47(1)**: p. 51-9.
64. Goicoechea, M., S.G. de Vinuesa, U. Verdalles, C. Ruiz-Caro, J. Ampuero, A. Rincon, D. Arroyo, and J. Luno, *Effect of allopurinol in chronic kidney disease progression and cardiovascular risk.* *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010. **5(8)**: p. 1388-93.
65. Sircar, D., S. Chatterjee, R. Waikhom, V. Golay, A. Raychaudhury, S. Chatterjee, and R. Pandey, *Efficacy of Febuxostat for Slowing the GFR Decline in Patients With CKD and Asymptomatic Hyperuricemia: A 6-Month, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial.* *Am J Kidney Dis*, 2015. **66(6)**: p. 945-50.
66. Chang, H.Y., C.W. Tung, P.H. Lee, C.C. Lei, Y.C. Hsu, H.H. Chang, H.F. Yang, L.C. Lu, M.C. Jong, C.Y. Chen, K.Y. Fang, Y.S. Chao, Y.H. Shih, and C.L. Lin, *Hyperuricemia as an independent risk factor of chronic kidney disease in middle-aged and elderly population.* *Am J Med Sci*, 2010. **339(6)**: p. 509-15.
67. Kim, H.A., Y.I. Seo, and Y.W. Song, *Four-week effects of allopurinol and febuxostat treatments on blood pressure and serum creatinine level in gouty men.* *J Korean Med Sci*, 2014. **29(8)**: p. 1077-81.
68. Tanaka, K., M. Nakayama, M. Kanno, H. Kimura, K. Watanabe, Y. Tani, Y. Hayashi, K. Asahi, H. Terawaki, and T. Watanabe, *Renoprotective effects of febuxostat in hyperuricemic patients with chronic kidney disease: a parallel-group, randomized, controlled trial.* *Clin Exp Nephrol*, 2015. **19(6)**: p. 1044-53.
69. Beddhu, S., R. Filipowicz, B. Wang, G. Wei, X. Chen, A.C. Roy, S.L. DuVall, H. Farrukh, A.N. Habib, T. Bjordahl, D.L. Simmons, M. Munger, G. Stoddard, D.E. Kohan, T. Greene, and Y. Huang, *A Randomized Controlled Trial of the Effects of Febuxostat Therapy on Adipokines and Markers of Kidney Fibrosis in Asymptomatic Hyperuricemic Patients With Diabetic Nephropathy.* *Can J Kidney Health Dis*, 2016. **3**: p. 2054358116675343.
70. Yood, R.A., F.D. Ottery, W. Irish, and M. Wolfson, *Effect of pegloticase on renal function in patients with chronic kidney disease: a post hoc subgroup analysis of 2 randomized, placebo-controlled, phase 3 clinical trials.* *BMC Res Notes*, 2014. **7**: p. 54.
71. Hosoya, T., I. Ohno, S. Nomura, I. Hisatome, S. Uchida, S. Fujimori, T. Yamamoto, and S. Hara, *Effects of topiroxostat on the serum urate levels and urinary albumin excretion in hyperuricemic stage 3 chronic kidney disease patients with or without gout.* *Clin Exp Nephrol*, 2014. **18(6)**: p. 876-84.
72. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation.* *Nat Rev Immunol*, 2008. **8(12)**: p. 958-69.

73. Jaramillo, M., M. Godbout, P.H. Naccache, and M. Olivier, *Signaling events involved in macrophage chemokine expression in response to monosodium urate crystals*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52797-805.
74. Jaramillo, M., P.H. Naccache, and M. Olivier, *Monosodium urate crystals synergize with IFN-gamma to generate macrophage nitric oxide: involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and NF-kappa B*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5734-42.
75. Guiteras, R., M. Flaquer, and J.M. Cruzado, *Macrophage in chronic kidney disease*. Clin Kidney J, 2016. **9**(6): p. 765-771.
76. Murakami, Y., T. Akahoshi, I. Hayashi, H. Endo, S. Kawai, M. Inoue, H. Kondo, and H. Kitasato, *Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in murine resident peritoneal macrophages by monosodium urate monohydrate crystals*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(2): p. 455-62.
77. Sil, P., H. Wicklum, C. Surell, and B. Rada, *Macrophage-derived IL-1beta enhances monosodium urate crystal-triggered NET formation*. Inflamm Res, 2017. **66**(3): p. 227-237.
78. Hall, C.J., L.E. Sanderson, L.M. Lawrence, B. Pool, M. van der Kroef, E. Ashimbayeva, D. Britto, J.L. Harper, G.J. Lieschke, J.W. Astin, K.E. Crosier, N. Dalbeth, and P.S. Crosier, *Blocking fatty acid-fueled mROS production within macrophages alleviates acute gouty inflammation*. J Clin Invest, 2018. **128**(5): p. 1752-1771.
79. **Martin, W.J., O. Shaw, X. Liu, S. Steiger, and J.L. Harper, Monosodium urate monohydrate crystal-recruited noninflammatory monocytes differentiate into M1-like proinflammatory macrophages in a peritoneal murine model of gout. Arthritis Rheum, 2011. 63(5): p. 1322-32.**
80. Wang, Y. and D.C. Harris, *Macrophages in renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(1): p. 21-7.
81. Meng, X.M., D.J. Nikolic-Paterson, and H.Y. Lan, *Inflammatory processes in renal fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(9): p. 493-503.
82. Anders, H.J. and M. Ryu, *Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis*. Kidney Int, 2011. **80**(9): p. 915-925.
83. Ricardo, S.D., H. van Goor, and A.A. Eddy, *Macrophage diversity in renal injury and repair*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3522-30.
84. Braga, T.T., M. Correa-Costa, Y.F. Guise, A. Castoldi, C.D. de Oliveira, M.I. Hyane, M.A. Cenedeze, S.A. Teixeira, M.N. Muscara, K.R. Perez, I.M. Cuccovia, A. Pacheco-Silva, G.M. Goncalves, and N.O. Camara, *MyD88 signaling pathway is involved in renal fibrosis by favoring a TH2 immune response and activating alternative M2 macrophages*. Mol Med, 2012. **18**: p. 1231-9.
85. Henderson, N.C., A.C. Mackinnon, S.L. Farnworth, T. Kipari, C. Haslett, J.P. Iredale, F.T. Liu, J. Hughes, and T. Sethi, *Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis*. Am J Pathol, 2008. **172**(2): p. 288-98.
86. Lopez-Guisa, J.M., X. Cai, S.J. Collins, I. Yamaguchi, D.M. Okamura, T.H. Bugge, C.M. Isacke, C.L. Emson, S.M. Turner, S.J. Shankland, and A.A. Eddy, *Mannose receptor 2 attenuates renal fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(2): p. 236-51.
87. Huen, S.C., G.W. Moeckel, and L.G. Cantley, *Macrophage-specific deletion of transforming growth factor-beta1 does not prevent renal fibrosis after severe ischemia-reperfusion or obstructive injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **305**(4): p. F477-84.
88. Chen, T., Q. Cao, Y. Wang, and D.C.H. Harris, *M2 macrophages in kidney disease: biology, therapies, and perspectives*. Kidney Int, 2019. **95**(4): p. 760-773.
89. **Ma, Q., M. Honarpisheh, C. Li, M. Sellmayr, M. Lindenmeyer, C. Bohland, P. Romagnani, H.J. Anders, and S. Steiger, Soluble Uric Acid Is an Intrinsic Negative Regulator of Monocyte Activation in Monosodium Urate Crystal-Induced Tissue Inflammation. J Immunol, 2020. 205(3): p. 789-800.**
90. Iwata, H., S. Nishio, M. Yokoyama, A. Matsumoto, and M. Takeuchi, *Solubility of uric acid and supersaturation of monosodium urate: why is uric acid so highly soluble in urine?* J Urol, 1989. **142**(4): p. 1095-8.
91. **Honarpisheh, M., O. Foresto-Neto, S. Steiger, F. Kraft, P. Koehler, E. von Rauchhaupt, J. Potempa, K. Adamowicz, J. Koziel, and M. Lech, Aristolochic acid I determine the phenotype and activation of macrophages in acute and chronic kidney disease. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 12169.**

92. Doria, A., A.T. Galecki, C. Spino, R. Pop-Busui, D.Z. Cherney, I. Lingvay, A. Parsa, P. Rossing, R.J. Sigal, M. Afkarian, R. Aronson, M.L. Caramori, J.P. Crandall, I.H. de Boer, T.G. Elliott, A.B. Goldfine, J.S. Haw, I.B. Hirsch, A.B. Karger, D.M. Maahs, J.B. McGill, M.E. Molitch, B.A. Perkins, S. Polsky, M. Pragnell, W.N. Robiner, S.E. Rosas, P. Senior, K.R. Tuttle, G.E. Umpierrez, A. Wallia, R.S. Weinstock, C. Wu, M. Mauer, and P.S. Group, *Serum Urate Lowering with Allopurinol and Kidney Function in Type 1 Diabetes*. *N Engl J Med*, 2020. **382**(26): p. 2493-2503.
93. Badve, S.V., E.M. Pascoe, A. Tikunov, N. Boudville, F.G. Brown, A. Cass, P. Clarke, N. Dalbeth, R.O. Day, J.R. de Zoysa, B. Douglas, R. Faull, D.C. Harris, C.M. Hawley, G.R.D. Jones, J. Kanellis, S.C. Palmer, V. Perkovic, G.K. Rangan, D. Reidlinger, L. Robison, R.J. Walker, G. Walters, D.W. Johnson, and C.-F.S. Investigators, *Effects of Allopurinol on the Progression of Chronic Kidney Disease*. *N Engl J Med*, 2020. **382**(26): p. 2504-2513.
94. Sato, Y., D.I. Feig, A.G. Stack, D.H. Kang, M.A. Lanasa, A.A. Ejaz, L.G. Sanchez-Lozada, M. Kuwabara, C. Borghi, and R.J. Johnson, *The case for uric acid-lowering treatment in patients with hyperuricaemia and CKD*. *Nat Rev Nephrol*, 2019. **15**(12): p. 767-775.
95. **Steiger, S., Q. Ma, and H.J. Anders, *The case for evidence-based medicine for the association between hyperuricaemia and CKD*. *Nat Rev Nephrol*, 2020.**
96. Awad, A.S., L. Huang, H. Ye, E.T. Duong, W.K. Bolton, J. Linden, and M.D. Okusa, *Adenosine A2A receptor activation attenuates inflammation and injury in diabetic nephropathy*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **290**(4): p. F828-37.
97. O, I., O. M, A.S. A, C.H. Hh, S.F. W, and M. Rahman, *Evaluation of Aspirin and Clopidogrel resistance in patients with Acute Coronary Syndrome by using Adenosine Diphosphate Test and Aspirin Test*. *Pak J Med Sci*, 2013. **29**(1): p. 97-102.
98. Garcia, G.E., L.D. Truong, J.F. Chen, R.J. Johnson, and L. Feng, *Adenosine A(2A) receptor activation prevents progressive kidney fibrosis in a model of immune-associated chronic inflammation*. *Kidney Int*, 2011. **80**(4): p. 378-88.
99. Truong, L.D., J. Trostel, R. McMahan, J.F. Chen, and G.E. Garcia, *Macrophage A2A Adenosine Receptors Are Essential to Protect from Progressive Kidney Injury*. *Am J Pathol*, 2016. **186**(10): p. 2601-13.
100. Xiao, H., H.Y. Shen, W. Liu, R.P. Xiong, P. Li, G. Meng, N. Yang, X. Chen, L.Y. Si, and Y.G. Zhou, *Adenosine A2A receptor: a target for regulating renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e60173.
101. Wang, Y.M., J.L. McRae, S.C. Robson, P.J. Cowan, G.Y. Zhang, M. Hu, T. Polhill, Y. Wang, G. Zheng, Y. Wang, V.W. Lee, R.J. Unwin, D.C. Harris, K.M. Dwyer, and S.I. Alexander, *Regulatory T cells participate in CD39-mediated protection from renal injury*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(9): p. 2441-51.
102. Zhang, W., Y. Zhang, W. Wang, Y. Dai, C. Ning, R. Luo, K. Sun, L. Glover, A. Grenz, H. Sun, L. Tao, W. Zhang, S.P. Colgan, M.R. Blackburn, H.K. Eltzschig, R.E. Kellems, and Y. Xia, *Elevated ecto-5'-nucleotidase-mediated increased renal adenosine signaling via A2B adenosine receptor contributes to chronic hypertension*. *Circ Res*, 2013. **112**(11): p. 1466-78.
103. Suarez-Alvarez, B., H. Liapis, and H.J. Anders, *Links between coagulation, inflammation, regeneration, and fibrosis in kidney pathology*. *Lab Invest*, 2016. **96**(4): p. 378-90.
104. Huang, S.C., A.M. Smith, B. Everts, M. Colonna, E.L. Pearce, J.D. Schilling, and E.J. Pearce, *Metabolic Reprogramming Mediated by the mTORC2-IRF4 Signaling Axis Is Essential for Macrophage Alternative Activation*. *Immunity*, 2016. **45**(4): p. 817-830.
105. Pearce, E.L. and E.J. Pearce, *Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence*. *Immunity*, 2013. **38**(4): p. 633-43.
106. **Shaw, O.M., S. Steiger, X. Liu, J.A. Hamilton, and J.L. Harper, *Brief report: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor drives monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammatory macrophage differentiation and NLRP3 inflammasome up-regulation in an in vivo mouse model*. *Arthritis Rheumatol*, 2014. **66**(9): p. 2423-8.**
107. Geissmann, F., M.G. Manz, S. Jung, M.H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley, *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. *Science*, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
108. Mulay, S.R., J.N. Eberhard, V. Pfann, J.A. Marschner, M.N. Darisipudi, C. Daniel, S. Romoli, J. Desai, M. Grigorescu, S.V. Kumar, B. Rathkolb, E. Wolf, M. Hrabe de Angelis, T. Bauerle, B. Dietel, C.A. Wagner, K. Amann, K.U. Eckardt, P.S. Aronson, H.J. Anders, and F. Knauf, *Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016. **310**(8): p. F785-F795.

109. Mulay, S.R., O.P. Kulkarni, K.V. Rupanagudi, A. Migliorini, M.N. Darisipudi, A. Vilaysane, D. Muruve, Y. Shi, F. Munro, H. Liapis, and H.J. Anders, *Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1beta secretion*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 236-46.
110. Anders, H.J., B. Suarez-Alvarez, M. Grigorescu, O. Foresto-Neto, S. Steiger, J. Desai, J.A. Marschner, M. Honarpisheh, C. Shi, J. Jordan, L. Muller, N. Burzlaff, T. Bauerle, and S.R. Mulay, *The macrophage phenotype and inflammasome component NLRP3 contributes to nephrocalcinosis-related chronic kidney disease independent from IL-1-mediated tissue injury*. Kidney Int, 2018. **93**(3): p. 656-669.
111. Steiger, S. and J.L. Harper, *Neutrophil cannibalism triggers transforming growth factor beta1 production and self regulation of neutrophil inflammatory function in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in mice*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(3): p. 815-23.
112. Higgins, S.P., Y. Tang, C.E. Higgins, B. Mian, W. Zhang, R.P. Czekay, R. Samarakoon, D.J. Conti, and P.J. Higgins, *TGF-beta1/p53 signaling in renal fibrogenesis*. Cell Signal, 2018. **43**: p. 1-10.
113. Liang, X., H.W. Schnaper, T. Matsusaka, I. Pastan, S. Ledbetter, and T. Hayashida, *Anti-TGF-beta Antibody, 1D11, Ameliorates Glomerular Fibrosis in Mouse Models after the Onset of Proteinuria*. PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0155534.
114. Duffield, J.S., *Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis*. J Clin Invest, 2014. **124**(6): p. 2299-306.
115. Steiger, S., J.F. Grill, Q. Ma, T. Bauerle, J. Jordan, M. Smolle, C. Bohland, M. Lech, and H.J. Anders, *Anti-Transforming Growth Factor beta IgG Elicits a Dual Effect on Calcium Oxalate Crystallization and Progressive Nephrocalcinosis-Related Chronic Kidney Disease*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 619.
116. Marschner, J.A., S.R. Mulay, S. Steiger, L. Anguiano, Z. Zhao, P. Boor, K. Rahimi, A. Inforzato, C. Garlanda, A. Mantovani, and H.J. Anders, *The Long Pentraxin PTX3 Is an Endogenous Inhibitor of Hyperoxaluria-Related Nephrocalcinosis and Chronic Kidney Disease*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2173.
117. Wesche, H., X. Gao, X. Li, C.J. Kirschning, G.R. Stark, and Z. Cao, *IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 19403-10.
118. Steiger, S., S.V. Kumar, M. Honarpisheh, G. Lorenz, R. Gunthner, S. Romoli, R. Grobmayr, H.E. Susanti, J. Potempa, J. Koziel, and M. Lech, *Immunomodulatory Molecule IRAK-M Balances Macrophage Polarization and Determines Macrophage Responses during Renal Fibrosis*. J Immunol, 2017. **199**(4): p. 1440-1452.
119. Siedlecki, A., W. Irish, and D.C. Brennan, *Delayed graft function in the kidney transplant*. Am J Transplant, 2011. **11**(11): p. 2279-96.
120. Schrier, R.W. and W. Wang, *Acute renal failure and sepsis*. N Engl J Med, 2004. **351**(2): p. 159-69.
121. Venkatachalam, M.A., J.M. Weinberg, W. Kriz, and A.K. Bidani, *Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(8): p. 1765-76.
122. Kemmner, S., Q. Bachmann, S. Steiger, G. Lorenz, M. Honarpisheh, O. Foresto-Neto, S. Wang, J. Carbajo-Lozoya, V. Alt, C. Schulte, S. Chmielewski, H.A.R. Bluysen, U. Heemann, M. Baumann, M. Lech, and C. Schmaderer, *STAT1 regulates macrophage number and phenotype and prevents renal fibrosis after ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2019. **316**(2): p. F277-F291.
123. Bottcher, R.T., C. Stremmel, A. Meves, H. Meyer, M. Widmaier, H.Y. Tseng, and R. Fassler, *Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of beta1 integrins by binding to the beta1-integrin tail*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(6): p. 584-92.
124. Kurz, A.R., M. Pruenster, I. Rohwedder, M. Ramadass, K. Schafer, U. Harrison, G. Gouveia, C. Nussbaum, R. Immler, J.R. Wiessner, A. Margraf, D.S. Lim, B. Walzog, S. Dietzel, M. Moser, C. Klein, D. Vestweber, R. Haas, S.D. Catz, and M. Sperandio, *MST1-dependent vesicle trafficking regulates neutrophil transmigration through the vascular basement membrane*. J Clin Invest, 2016. **126**(11): p. 4125-4139.
125. Cera, M.R., M. Fabbri, C. Molendini, M. Corada, F. Orsenigo, M. Rehberg, C.A. Reichel, F. Krombach, R. Pardi, and E. Dejana, *JAM-A promotes neutrophil chemotaxis by controlling integrin internalization and recycling*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 2): p. 268-77.

126. Wu, X., M. Wakamiya, S. Vaishnav, R. Geske, C. Montgomery, Jr., P. Jones, A. Bradley, and C.T. Caskey, *Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(2): p. 742-6.
127. Lu, J., X. Hou, X. Yuan, L. Cui, Z. Liu, X. Li, L. Ma, X. Cheng, Y. Xin, C. Wang, K. Zhang, X. Wang, W. Ren, R. Sun, Z. Jia, Z. Tian, Q.S. Mi, and C. Li, *Knockout of the urate oxidase gene provides a stable mouse model of hyperuricemia associated with metabolic disorders*. Kidney Int, 2018. **93**(1): p. 69-80.
128. Cohen, G. and W.H. Horl, *Immune dysfunction in uremia*; an update. Toxins (Basel), 2012. **4**(11): p. 962-90.
129. Powe, N.R., B. Jaar, S.L. Furth, J. Hermann, and W. Briggs, *Septicemia in dialysis patients: incidence, risk factors, and prognosis*. Kidney Int, 1999. **55**(3): p. 1081-90.
130. O'Seaghda, C.M. and R.N. Foley, *Septicemia, access, cardiovascular disease, and death in dialysis patients*. Perit Dial Int, 2005. **25**(6): p. 534-40.
131. Chonchol, M., *Neutrophil dysfunction and infection risk in end-stage renal disease*. Semin Dial, 2006. **19**(4): p. 291-6.
132. Huttunen, K., E. Lampainen, S. Silvennoinen-Kassinen, and A. Tiilikainen, *The neutrophil function of uremic patients treated by hemodialysis or CAPD*. Scand J Urol Nephrol, 1984. **18**(2): p. 167-72.
133. Cohen, G., M. Rudnicki, and W.H. Horl, *Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils*. Kidney Int Suppl, 2001. **78**: p. S48-52.
134. Ando, M., A. Shibuya, K. Tsuchiya, T. Akiba, and K. Nitta, *Reduced expression of Toll-like receptor 4 contributes to impaired cytokine response of monocytes in uremic patients*. Kidney Int, 2006. **70**(2): p. 358-62.
135. Schreiner, O., E. Wandel, F. Himmelsbach, P.R. Galle, and E. Marker-Hermann, *Reduced secretion of proinflammatory cytokines of monosodium urate crystal-stimulated monocytes in chronic renal failure: an explanation for infrequent gout episodes in chronic renal failure patients?* Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(5): p. 644-9.

Es handelt sich hier um eine kumulative Habilitationsschrift. Um die Einhaltung des Urheberrechtsgesetzes zu gewährleisten, wurden alle Erst- oder Koauthorschaften als Quellen/Zitate entsprechend gekennzeichnet, aber nicht als Anhang beigefügt.