

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Die Rolle von TNF-Rezeptoren bei Oxalat-Nephropathie

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Jonathan Nicodemos Eberhard

aus Stuttgart

2021

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bärbel Lange-Sperandio
apl. Pro. Dr. Wolfgang Neuhofer

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2022

Affidavit

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

Die Rolle von TNF-Rezeptoren bei Oxalat-Nephropathie

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

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

Hamburg, 02.08.2022

Jonathan Nicodemos Eberhard

Inhaltsverzeichnis

Affidavit.....	3
Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	5
Publikationsliste.....	6
1. Arbeitsanteil an Publikationen.....	7-8
2. Einleitung.....	9
2.1. Oxalat-Nephropathie.....	9
2.1.1. Oxalat-Stoffwechsel.....	9
2.1.2. Primäre und sekundäre Hyperoxalurien.....	10-12
2.1.3. Pathophysiologie der Oxalat-Nephropathie.....	13-14
2.1.4. Mechanismen der Kristallbildung und Interaktion mit.....	15-16
dem Tubulusepithel	
2.2. Ziele der Studie/Doktorarbeit.....	17
2.2.1. “Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice”.....	17-19
2.2.2. “Hyperoxaluria Requires TNF Receptors to Initiate Crystal Adhesion and Kidney Stone Disease”.....	19-20
3. Zusammenfassung.....	21-22
4. Abstrakt.....	23-24
5. Publikation I.....	25
6. Publikation II.....	26
7. Literaturverzeichnis.....	27-31
Danksagung.....	32

Abkürzungsverzeichnis

SLC - Sodium Linked Carrier

PH – Primäre Hyperoxalurie

AGT - Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase

PRHPR - Glyoxylat-Reduktase/Hydroxypyruvat-Reduktase

HOGA - 4-Hydroxy-2-Oxoglutarat-Aldolase

CKD – chronic kidney disease

ESRD – end stage renal disease

GFR – glomeruläre Filtrationsrate

PAMP – Pathogen-associated molecular pattern

DAMP – Damage-associated molecular pattern

NLRP3 - NLR family pyrin domain containing 3

RIPK1/3 - Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3

MLKL - Mixed lineage kinase domain-like protein

WT - Wildtyp

TNFR – TNF-Rezeptor

BUN – blood urea nitrogen

Publikationsliste

Publikation I

Mulay SR*, **Eberhard JN***, Pfann V*, Marschner JA, Darisipudi MN, Daniel C, Romoli S, Desai J, Grigorescu M, Kumar SV, Rathkolb B, Wolf E, Hrabě de Angelis M, Bäuerle T, Dietel B, Wagner CA, Amann K, Eckardt KU, Aronson PS, Anders HJ*, Knauf F*. *Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice*. Am J Physiol Renal Physiol. 2016 Apr 15;310(8): F785-F795

**contributed equally to this work*

Publikation II

Mulay SR*, **Eberhard JN***, Desai J, Marschner JA, Kumar SV, Weidenbusch M, Grigorescu M, Lech M, Eltrich N, Müller L, Hans W, Hrabě de Angelis M, Vielhauer V, Hoppe B, Asplin J, Burzlaff N, Herrmann M, Evan A, Anders HJ. *Hyperoxaluria Requires TNF Receptors to Initiate Crystal Adhesion and Kidney Stone Disease*. J Am Soc Nephrol. 2017 Mar;28(3):761-768

**contributed equally to this work*

1. Arbeitsanteil an Publikationen

1.1 Publikation I

Der Doktorand Jonathan Eberhard war in der Publikation „Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57Bl/6 mice“ an der Entwicklung und dem Design der Studie beteiligt und führte in Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern folgende Experimente eigenständig durch:

1. Planung und Durchführung/Organisation der Tierhaltung und Sammlung der Gewebeproben (Blut, Urin, Nierengewebe für RNA und Histologie); Messungen von Blut-/Urinproben wurden hauptsächlich durch die Kooperationspartner durchgeführt (German Mouse Clinic des Helmholtz-Zentrum München)
2. Analyse der meisten Blut-/Urinmessungen
3. Durchführung und Analyse sämtlicher RT-PCR-Messungen
4. Durchführung einiger Histologie-Analysen (Kalziumoxalat, F4/80, Masson Trichrom, Silber, Collagen 1)
5. Durchführung und Analyse der GFR-Messungen
6. Erstellung von Teilen des Manuskripts
7. Revision von Teilen des Manuskripts

An folgenden Experimenten war Jonathan Eberhard NICHT direkt beteiligt: Histologie mit Lotus tetragonolobus lectin, Histologie der kardialen Fibrose, FGF23/PTH-Messungen, Blutdruckmessungen, Bildgebung mittels MRT

1.2 Publikation II

Im Rahmen der Publikation „Hyperoxaluria requires TNF receptors to initiate crystal adhesion and kidney stone disease“ war Jonathan Eberhard gemeinsam mit Shrikant R. Mulay maßgeblich an der Entwicklung und dem Design der Studie beteiligt. An der Durchführung folgender Experimente war Jonathan Eberhard NICHT direkt beteiligt:

1. Messungen von Kalzium/Oxalat-Konzentrationen im Urin
2. CT-Scans der Mäuse
3. X-Ray diffraction Analyse
4. Histologie der menschlichen TNFR Proben

Alle übrigen Experimente wurden größtenteils durch Jonathan Eberhard geplant, durchgeführt und analysiert. Ein Großteil des Manuskripts wurde von Shrikant R. Mulay erstellt (ca. 70%), Jonathan Eberhard hatte hierbei einen geringeren Anteil (ca. 30%). Eine Revision des Manuskripts erfolgte durch beide Hauptautoren in gleichen Anteilen.

2. Einleitung

2.1 Oxalat-Nephropathie

2.1.1 Oxalat-Stoffwechsel

Oxalsäure ist die einfachste Dicarbonsäure¹. Als Oxalat bezeichnet man die dissoziierte Form der Oxalsäure, die Komplexe mit Ionen bildet (u.a. mit Kalzium). Oxalsäure ist vor allem in Pflanzen enthalten, darunter Spinat, Rhabarber, Kakao und Rote Beete, und gelangt somit über die Nahrung in den menschlichen Körper. Nur ein kleiner Teil der oral aufgenommenen Oxalsäure (ca. 10%) gelangt über den Darm in den Blutkreislauf, der Großteil wird über die Fäzes ausgeschieden und von speziellen Darmbakterien verstoffwechselt²⁻⁵.

Ein weitaus größerer Teil – ca. 90% - der im Blutkreislauf zirkulierenden Oxalsäure fällt in der Leber als Stoffwechselabbauprodukt an. Zu den Ausgangsprodukten der Metabolisierung zählen u.a. Aminosäuren wie Glycin, Serin und Hydroxyprolin oder auch exogen zugeführte Stoffe wie Ethylenglykol und Vitamin C^{6,7}.

Überschüssige Oxalsäure bzw. dessen Salze (Oxalate) werden fast ausschließlich über die Niere durch glomeruläre Filtration, aber auch aktive Sekretion ausgeschieden, außerdem in geringem Ausmaß über intestinale Sekretion.

Verantwortlich für die aktive Absorption und Sekretion der Oxalsäure sind spezifische Transporter (Sodium Linked Carrier – SLC), welche in den verschiedenen Geweben (Hepatozyten, proximale Tubuluszellen, Magen, Duodenum, Ileum, Kolon) exprimiert werden⁸⁻¹⁰.

Ein kleiner Anteil (ca. 10%) der hepatisch anfallenden Oxalat-Mengen gelangt durch biliäre Sekretion wieder in den Darm und wird dort ausgeschieden².

Da die Oxalsäure und ihre Salze in höheren Konzentrationen toxisch für den menschlichen Organismus sind, ist eine funktionierende Oxalsäure-Homöostase durch die Niere unabdingbar^{11,12}.

2.1.2 Primäre und sekundäre Hyperoxalurien

Die Oxalat-Konzentration im Plasma beträgt beim Gesunden weniger als 2,5 $\mu\text{mol/l}$, bei Patienten mit primärer Hyperoxalurie und schon eingeschränkter Nierenfunktion ($\text{GFR} < 30\text{ml/min/1,73m}^2$) sind Werte $> 20 \mu\text{mol/l}$ charakteristisch. Bei Gesunden beträgt die Urin-Oxalatkonzentration $< 0,45\text{mmol/1,73m}^2/24\text{h}$. Werte über $1\text{mmol/1,73m}^2/24\text{h}$ werden als Hyperoxalurie bezeichnet. Als Krankheitsbild unterscheidet man zwischen primären und sekundären Hyperoxalurien¹³⁻¹⁵.

Primäre Hyperoxalurien (PH) sind seltene Erbkrankheiten mit autosomal-rezessivem Erbgang, bei denen es aufgrund von Mutationen in hepatozytären Leberenzymen zu einem erhöhten Anfall von Oxalat in der Leber kommt¹⁶. Am häufigsten (80% Anteil an der Gesamtprävalenz) und folgenschwersten ist hierbei die PH Typ 1, bei dem ein Defekt des leberspezifischen peroxismalen Enzyms Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (AGT) vorliegt. Bisher sind 178 verschiedene Mutationen beschrieben. Es gibt eine gewisse Heterogenität hinsichtlich des Phänotyps der Erkrankung (Schwere und Manifestationsalter)¹⁷⁻¹⁹.

Bei der PH Typ 2 (10% Anteil an der Gesamtprävalenz) liegt eine Mutation des Gens vor, welches für die Glyoxylat-Reduktase/Hydroxypyruvat-Reduktase (GRHPR) kodiert. Dieses Enzym kommt in vielen Geweben vor, primär jedoch im Cytosol der Hepatozyten. Es wandelt Glyoxylat in Glycolat und Hydroxypyruvat in D-Glycerat um. Sowohl bei Typ 1 also auch bei 2 fällt also vermehrt Glyoxylat an, welches durch die Laktatdehydrogenase zu Oxalat umgewandelt wird^{20, 21}.

Die primäre Hyperoxalurie Typ 3 hat wie Typ 2 einen Anteil von 10% an der Gesamtprävalenz und ist die mildeste der 3 Formen. Verantwortlich ist ein defektes Gen auf Chromosom 9, das für das mitochondriale leberspezifische Enzym 4-Hydroxy-2-Oxoglutarat-Aldolase (HOGA) kodiert. HOGA ist ein Schlüsselenzym des Hydroxyprolin-Abbaus und wandelt 4-Hydroxy-2-Oxoglutarat in Pyruvat und Glyoxylat um. Durch einen Enzymdefekt müsste in der Schlussfolgerung eigentlich weniger Glyoxylat und in der Folge weniger Oxalat anfallen, warum es dennoch zu einem erhöhten Anfall von Oxalat kommt ist noch nicht geklärt. Bei der PH Typ 3 sind bis jetzt 19 verschiedene Mutationen bekannt^{22, 23}.

Davon abzugrenzen sind die sekundären Hyperoxalurien, welche durch vermehrte exogene Zuführung von Oxalat bzw. Oxalat-Vorstufen hervorgerufen werden³.

Dies kann durch erhöhte Zufuhr von Oxalat-haltigen Lebensmitteln geschehen oder aber über die vermehrte Zufuhr von Oxalat-Vorstufen, welche in der Leber zu Oxalat verstoffwechselt werden, wie exzessiv zugeführtes Vitamin C oder Ethylenglycol^{5, 24-27}. Darüber hinaus kann eine veränderte bakterielle Darmflora die Ursache einer sekundären Hyperoxalurie sein, da das Bakterium *Oxalobacter formigenes* Oxalat als Energiequelle benötigt und somit die Menge des im Darm für die Resorption zu Verfügung stehenden Oxalats verringern kann²⁸⁻³⁰.

Außerdem kann eine Fett-Malabsorption zu einer erhöhten intestinalen Oxalat-Aufnahme führen, da die Permeabilität für Oxalat erleichtert wird und außerdem Fettsäuren mit Kalzium Komplexe bilden und somit weniger Kalzium für die Oxalat-Komplexierung zur Verfügung steht (komplexierte Oxalsäure kann das Darmepithel nicht überwinden)^{4, 31-34}.

Eine weitere wichtige Rolle scheinen verschiedene epitheliale intestinale Oxalat-Transporter zu spielen, die je nach Kompartiment zum einen für die Resorption, vor allem aber auch für die Exkretion von Oxalat verantwortlich sind^{8, 9, 34, 35}.

Das vermehrt anfallende Oxalat wird primär über die Niere durch freie glomeruläre Filtration und aktive tubuläre Sekretion ausgeschieden. Die hohen Oxalat-Konzentrationen im Urin zusammen mit der physiologisch bedingten Urinkonzentrierung fördern das Ausfallen von Kristallkomplexen im Urin sobald deren Sättigungswert erreicht ist. Daraus resultiert der erhöhte Anfall von vor allem Kalziumoxalat-Kristallen in der Niere, was zu diffusen Kristallablagerungen in den Nierentubuli und im Niereninterstitium (Nephrokalzinose) sowie zur Bildung von Nieren- und Harnsteinen (Nephro-/Urolithiasis) führen kann³⁶⁻³⁸.

Im weiteren Verlauf resultiert eine progrediente Verschlechterung der Nierenfunktion (CKD) und bei einem Großteil der Patienten ein terminales Nierenversagen (ESRD)³⁹. Ab einer GFR von 30-40ml/min pro 1,73m² kommt es zu einer zunehmenden Hyperoxalämie und in Folge dessen zu einer systemischen Oxalose mit Oxalat-Ablagerungen in Blutgefäßen, Myokard, Knochen und Knochenmark mit daraus resultierender Kardiomyopathie, Retinopathie, Anämie und erhöhter Anfälligkeit für Knochenbrüche^{11, 40, 41}.

Bei jeder Nephro-/Urolithiasis im Kindesalter und bei rezidivierenden Steinleiden im Erwachsenenalter sollte eine weiterführende Diagnostik hinsichtlich einer Hyperoxalurie erfolgen. Bildgebende Verfahren der Wahl zur Diagnose von Harnsteinen und Kristallablagerungen in der Niere sind Sonographie und Computertomographie (CT).

Jegliches Vorkommen von Kalziumoxalat-Kristallen in Urin und Plasma können auf eine Hyperoxalurie hinweisen. Oxalat-Konzentrationen im Urin von über 1 mmol/24h/1,73m² sind charakteristisch für die primäre Form, können aber auch bei der sekundären Form auftreten. Werte über 2 mmol/24h/1,37m² bei der primären Form kommen vor. Oxalat-Konzentrationen im Plasma bleiben bis zu einem gewissen CKD-Stadium (GFR <30 ml/min/1,37m²) unauffällig, weshalb deren Messung auch erst ab diesem Zeitpunkt sinnvoll erscheint. Plasma-Werte über 80 µmol/l sprechen stark für eine primäre Hyperoxalurie, während erhöhte Konzentrationen bis 80µmol/l auch durch anderweitige Niereninsuffizienz auftreten können^{14, 15, 19, 42}.

Eine weiterführende Steinanalyse kann Aufschluss über das Vorliegen einer primären oder sekundären Hyperoxalurie-Form geben⁴³. Zudem kann mittels Gen-Analyse eine endgültige Sicherung der Diagnose bei bestehendem Verdacht einer PH erfolgen^{19, 21}.

Bei Vorliegen einer Hyperoxalurie sollte zunächst umgehend eine konservative Behandlung eingeleitet werden. Dazu zählt als erstes die ausreichende Flüssigkeitszufuhr von mindestens 2 bis 3 l/d damit eine überschießende lithogene Urinkonzentrierung ausbleibt⁴⁴. Zudem sollte eine Harnalkalisierung mit Kalium- bzw. Natriumcitrat (Ziel pH: 6,2-6,8) vorgenommen werden, da saurer Urin die Bildung von Kalziumoxalat-Kristallen begünstigt^{45, 46}. Als spezifische Therapie der PH Typ 1 kommt dem AGT-Coenzym Pyridoxal eine entscheidende Rolle zu⁴⁷. Die Therapie mit Probiotica (*Oxalobacter form.*) hatte in klinischen Studien keinen Einfluss auf die Oxalat-Konzentrationen im Urin⁴⁸.

Als neueste Entdeckung in der Therapie der PH Typ 1 zählt Lumasiran, ein RNA-interferierendes Medikament, welches über die Degradierung von mRNA, welche für das Enzym Glycolat-Oxidase kodiert, das Anfallen von Oxalat verringert⁴⁹.

Bei terminaler Niereninsuffizienz oder erhöhten Plasmaoxalat-Konzentrationen ist die Einleitung einer Dialysebehandlung notwendig⁵⁰. Bei primären Formen der Hyperoxalurie ist die frühzeitige Nierentransplantation bzw. kombinierte Leber/Nierentransplantation eine Therapieoption^{51, 52}.

2.1.3 Pathophysiologie der Oxalat-Nephropathie

Wie oben schon genauer beschrieben gibt es unterschiedliche Formen der Hyperoxalurie, welche sowohl unterschiedliche Ausprägungen hinsichtlich der klinischen Präsentation als auch Unterschiede im pathophysiologischen Zusammenhang aufweisen.

Grundsätzlich lassen sich drei unterschiedliche Formen der Nierenschädigung durch Kalziumoxalat-Kristalle unterscheiden: Schädigung durch Obstruktion, durch Inflammation und durch die direkte Zelltod-Induktion⁵³.

Kalziumoxalat-Steine sind im Rahmen einer Urolithiasis mit 70% am häufigsten. Unter entsprechenden Bedingungen kann ein lokales Ausfallen von Kalziumoxalat-Kristallen in den Nierentubuli und in der Folge weiterem Wachstum zu größeren Kristallkomplexen zu einer lokalen mechanischen Obstruktion von einzelnen Tubuli führen. Größere Kristallkomplexe können sich im Verlauf zu Nierensteinen zusammenlagern und im weiteren Verlauf durch Obstruktion der abführenden Harnwege mit konsekutivem Harnrückstau zu einem akuten postrenalen Nierenversagen führen^{54, 55}. Patienten mit Nephro-/Urolithiasis scheinen zudem ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer CKD zu haben⁵⁶. Der Ort der Entstehung von größeren Kalziumoxalat-Steinen bilden vorwiegend sog. Randall-Plaques an den Nierenkelchen. An der Basis eines Nidus aus Kalziumphosphat im Interstitium der Henle-Schleife nahe der Nierenkelche lagern sich Kalziumoxalat-Kristalle zu größeren Komplexen zusammen und bilden so größere Nierensteine⁵⁷.

In den letzten Jahren erlangte man ein immer weitreichenderes Verständnis der durch Kalziumoxalat-Kristalle hervorgerufenen entzündlichen Prozesse. Durch Interaktion der Kristalle mit dem Tubulusepithel und Aufnahme in die Zellen werden unterschiedliche Signalkaskaden induziert. Geringe Mengen von Kalziumoxalat-Kristallen können so auch bei Gesunden eliminiert werden. Bei anhaltendem Anfall im Rahmen der unter 2.1.2 genannten Erkrankungen können so dauerhaft entzündliche Prozesse angetrieben werden und zu einer akuten und chronischen Nierenschädigung führen.

Hierbei wurden in den letzten Jahren einige neue Mechanismen entdeckt, u.a. die Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren und infolgedessen der pro-entzündlichen NFκ-B-Kaskade, aber auch die Rolle des NLRP3-Inflammasoms^{58, 59}. Das NLRP3-Inflammasom ist ein zytoplasmatischer Proteinkomplex, welcher hauptsächlich in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten vorkommt und durch PAMPs (Bestandteile pathogener Erreger wie Lipopolysaccharide von Bakterienzellwänden) aber auch durch DAMPs (zelluläre Bestandteile, welche z.B. beim Absterben von Zellen freigesetzt werden) aktiviert wird. Hierbei wird das Enzym Caspase-1 aktiviert, welches pro-IL1-beta in das Zytokin IL1-beta spaltet. Das im Verlauf durch die Abwehrzellen sezernierte IL1-beta bewirkt über den auf allen Zellen ubiquitär exprimierten IL-1-Rezeptor eine systemische Entzündungsreaktion durch z.B. Aktivierung von Akut-Phase-Proteinen, Freisetzung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten aus dem Knochenmark und vermehrten Prostaglandin-E2-Synthese⁶⁰. Im Tiermodell zeigen NLRP3-Knockout-Mäuse ein deutlich verbessertes Überleben und verbesserte Nierenfunktion im Vergleich zu WT Mäusen⁶¹.

Darüber hinaus konnte in Studien gezeigt werden, dass Kalziumoxalat-Kristalle über regulierte Zelltod-Programme eine direkte Zelltoxizität besitzen.

Neben entzündlichen Signalkaskaden haben Kalziumoxalat-Kristalle auch das Potenzial zur direkten Zellschädigung. Ein hierbei erst in den letzten Jahren zunehmend erforschter Prozess ist der programmierte Zelltod, welcher durch verschiedene Kristallarten, u.a. eben auch Kalziumoxalat-Kristalle, induziert werden kann. Über die Aktivierung von TNF-Rezeptoren wird der intrazelluläre TNF-Rezeptor-Ligand RIP-Kinase-1 aktiviert, welcher in der Folge RIP-Kinase-3 sowie MLKL aktiviert. Dieser Komplex induziert letzten Endes den programmierten Zelltod, in diesem Falle auch Nekroptose genannt und führt dadurch zur Freisetzung von DAMPs, welche wiederum weitere entzündliche Prozesse antreiben^{53, 62, 63}.

2.1.4 Mechanismen der intratubulären Kristallbildung und Interaktion der Kristalle mit dem Tubulusepithel

Lösungsprozesse sind Gleichgewichtsreaktionen. Die Überschreitung des spezifischen Löslichkeitsproduktes für Kalziumoxalat ist Voraussetzung für das

Ausfallen von Kristallen im Harn⁶⁴. Dieses spezifische Löslichkeitsprodukt lässt sich für unterschiedliche Lösungen wie beispielsweise den Harn berechnen^{65, 66}. Entscheidend ist hierbei, dass es sich in der Praxis bei Harn um kein statisches System, sondern um eine Lösung im Fluss unter dem Einfluss verschiedenster Faktoren handelt. Je höher die Konzentrationen von Kalzium und Oxalat im Harn (z.B. im Rahmen einer Dehydratation) und je langsamer die Passage des Harns in der Niere desto leichter können sich Kristalle im Tubulussystem bilden⁴⁴. Zudem hat der pH des Harns Einfluss auf die Kristallbildung. Je niedriger der pH desto leichter fallen Kalziumoxalat-Kristalle aus⁶⁷.

Einzelne Kristalle lagern sich über mehrere Schritte zusammen zu einem sogenannten Nukleus, welcher durch Anlagerung weiterer Kristalle zu größeren Kristallaggregaten anwächst⁶⁸. Diverse Studien haben sich in der Vergangenheit mit der Zusammensetzung der Kristallmatrix (organisch/anorganisch Material) und deren Einfluss auf Förderung/Hemmung des Kristallisationsprozesse befasst. Verschiedenste spezifische Modulatoren in Form von Lipiden, Glycosaminoglycanen und diversen Proteinen (Tamm-Horsfall-Protein, Osteopontin, Hyaluron, Annexin II, CD 44 u.a.) scheinen auf diesen Prozess einen hemmenden bzw. fördernden Effekt zu haben^{69, 70, 71}.

Für die Entstehung von größerer Kalziumoxalat-Ablagerungen im Sinne einer Nephrokalzinose scheint jedoch mehr notwendig zu sein als die simple Bildung von Kristallkomplexen aufgrund von Übersättigung und Ausfallen im Harn mit konsekutiver Obstruktion der Tubuli. Ein entscheidender Faktor bildet die Interaktion von Kristallen mit dem apikalen Tubulusepithel^{72, 73}. Studien konnten zeigen, dass sich Kristalle vor allem an geschädigten bzw. regenerierenden/proliferierenden Tubuluszellen anlagern und so Kristallwachstum begünstigen sowie zur Endozytose von Kristallkomplexen beitragen^{74, 75}. An konfluenten und intakten Epithelien lagern sich keine Kristalle an. Zudem scheinen verschiedene Epithelien unterschiedlich anfällig für Kristalladhäsion zu sein. An Orten mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Kristallbildung scheinen die Zellen dementsprechend weniger anfällig (distaler Tubulus, Sammelrohr), wohingegen an Orten mit geringer Wahrscheinlichkeit eine größere Anfälligkeit besteht (proximaler Tubulus)⁷⁶. Ein Grund ist neben der Zusammensetzung des Harns die unterschiedliche Beschaffenheit der Epithelien. Im Falle von Schädigungen des Tubulusepithels kommt es zur Präsentation von verschiedenen Molekülen

(Kristalladhäsionsmoleküle), die eine Anlagerung der Kristalle an das Epithelium fördern (CD44, Annexin II u.a.)^{77, 78, 79}.

Verschiedenste pathologische Prozesse können zu einem Tubulusschaden und konsekutiv zu einer Exposition des Tubulusepithels mit Kristallen führen. Dazu zählen prinzipiell jegliche Formen von akuten Nierenschädigungen mit begleitender Tubulusschädigung. Auch Kristalle selbst können wie oben schon beschrieben eine direkte Zellschädigung hervorrufen und in deren Folge entzündliche Signalkaskaden in Gang setzen, die zu einer weiteren Schädigung führen^{53, 80}.

Erst durch die Anlagerung von Kristallen an das Tubulusepithel ist eine Aufnahme in die Zelle und ins Interstitium möglich. Die Aufnahme erfolgt in Form von Endozytose und in der Zelle durch lysosomale Prozessierung der Kristallkomplexe⁷⁵. Im Rahmen dessen kommt es zur Aktivierung von Entzündungszellen und entzündlichen Prozessen (s.o.), welche zur Entstehung einer Nephrokalzinose und progredienten Nierenschädigung und Nierenfunktionseinschränkung beitragen.

Darüber hinaus beschäftigten sich in der Vergangenheit mehrere Studien mit sog. Randall-Plaques als Ort der Bildung und des Wachstums von Nierensteinen. Hierbei bilden sich im Interstitium der Henle-Schleife nahe der Nierenkelche Kalziumphosphat-Ablagerungen, welche den Bildungsort größerer Kalziumoxalat-Steine darstellen^{57, 81, 82, 83}.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zur Kristallbildung und Kristallretention im Nierengewebe verschiedene Faktoren notwendig sind, wobei der Interaktion der Kristalle mit dem Tubulusepithel eine entscheidende Rolle zukommt.

2.2. Ziele der Studie/Doktorarbeit

Die erste unten aufgeführte Studie beschäftigt sich mit der Charakterisierung eines Mausmodells der Kalziumoxalat-Nephropathie und chronischen Niereninsuffizienz mit den typischen urämischen und kardiovaskulären Komplikationen.

Die zweite Studie untersucht auf Basis dieses Mausmodells den Einfluss von TNF-Rezeptoren und deren Signalkaskaden auf die Expression spezifischer Kalziumoxalat-Kristalladhäsionsmoleküle in renalen Tubuluszellen.

2.2.1. „Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice”

Zur weiteren Erforschung von Nierenerkrankungen, im speziellen der chronischen Niereninsuffizienz (CKD), sind geeignete Tiermodelle notwendig. In der Vergangenheit wurden hierfür in der Maus bzw. Ratte verschiedene Modelle eingesetzt, darunter chirurgische Modelle wie die unilaterale Uretherobstruktion und die 5/6-Nephrektomie aber auch Modelle, die über die Aufnahme von speziellen Stoffen wie Adenin, Aristolochiasäuren oder Folsäure Nierenschädigungen hervorrufen. Neben einigen Modell-spezifischen Vorteilen zeigen sich nach genauerer Betrachtung jedoch auch beträchtliche Mängel dieser Modelle, beispielsweise die Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention mit Anästhesie, das Ausbleiben einer relevanten Verschlechterung der Nierenfunktion gemessen an der GFR oder das Fehlen von typischen CKD-Komplikationen wie Hyperparathyreodismus, metabolische Azidose, Anämie oder arterieller Hypertonus^{84, 85}.

Ein ideales Tier-/ bzw. Mausmodell der chronischen Niereninsuffizienz sollte folgende Punkte erfüllen:

- Induktion in gängigen Rassen (z.B. C57BL/6-Mäuse) mit gleichermaßen auftretendem Nierenschaden in männlichen und weiblichen Tieren
- Induktion einer auch im weiteren Verlauf stabilen chronischen Nierenschädigung mit Reduktion der GFR
- Induktion in überschaubarem Zeitrahmen (Einsparen von Kosten und Wartezeit)
- Induktion ohne chirurgische Intervention um den Einfluss von Stress und Medikamenten auf die Tiere zu minimieren

- Verfügbarkeit von ausreichendem Nierengewebe für die weitere Untersuchung (Histologie, Genexpression, Bildgebung u.a.)
- Induktion von typischen CKD-Komplikationen wie z.B. normochrome Anämie, Hyperparathyreodismus, Hyperkaliämie, metabolische Azidose und arterieller Hypertonus

All diese Punkte sind in dem hier neu präsentierten Modell der Kalziumoxalat-Nephropathie erfüllt. Zur Induktion einer chronischen Nierenschädigung erhielten 8-12 Wochen alte C57BL/6-Mäuse über insgesamt 21 Tage Oxalat-reiches und Kalzium-freies Futter (enthält 50µmol/g Natriumoxalat). Durch das Fehlen von Kalzium wird eine vollständige intestinale Aufnahme des enthaltenen Oxalats ohne Komplexbildung mit Kalzium im Darm garantiert³⁴. Die Kontrollgruppe erhielt eine Oxalat-/Kalzium-freie Diät. Sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Tieren zeigte sich im Verlauf der 21 Tage eine erhöhte Oxalat-Konzentration im Urin und Plasma sowie eine kontinuierliche Verschlechterung der Nierenfunktion. Diese wurde durch die wöchentliche Messung der Nierenretentionsparameter Serum-Kreatinin und Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN) sowie die direkte GFR-Messung detektiert. Außerdem blieben diese Parameter auch nach der Umstellung von der Oxalat-Diät auf die Kontroll-Diät, trotz dann wieder abnehmenden Urin-/Plasmaoxalat-Konzentrationen, stabil.

In der Histologie zeigte sich mittels PAS-Färbung und Färbung mit Lotus tetragonolobus lectin ein progredienter signifikanter Tubulusschaden bis hin zur Tubulusatrophie und atubulären Glomeruli. Außerdem fand sich in der Masson-Trichrom-Färbung, Collagen1a1-Färbung sowie Silberfärbung ein progredienter fibrotischer Umbau des Nierengewebes. Darüber hinaus konnten wir mittels F4/80- und CD3-Färbung die über 21 Tage hinweg zunehmende Infiltration von Entzündungszellen (Makrophagen und Lymphozyten) feststellen.

Die histologischen Ergebnisse spiegeln sich in der Untersuchung der Genexpression mittels PCR-Analyse des Nierengewebes wider. Hierbei zeigt sich eine progrediente Induktion von Nierenschädigungs-/Fibrose- und Inflammationsmarkern.

Auch in der MRT-Bildgebung zeigten sich konsistente Ergebnisse mit einem erhöhten Nierenrindenvolumen und einer erhöhten T2-Zeit (assoziiert mit Inflammation) sowie eine erhöhte T1-Zeit bei reduziertem Diffusionskoeffizienten in der Nierenrinde (assoziiert mit Fibrose).

Im zeitlichen Verlauf entwickelten alle Tiere typische CKD-Komplikationen wie erhöhte FGF23 und Parathormon-Werte, eine normochrome Anämie, eine Hyperkaliämie sowie eine metabolische Azidose. Zudem fand sich ein arteriellen Hypertonus sowie eine kardiale Fibrose, welcher auch nach der Umstellung auf die Kontroll-Diät bestehen blieb.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass in diesem Modell alle notwendigen Anforderungen an ein CKD-Tiermodell erfüllt werden. In verschiedenen weiteren Studien zeigte dieses Modell reproduzierbare Daten. Als möglichen Nachteil dieses Modells lässt sich anmerken, dass es sich um eine vorwiegend tubuläre Schädigung handelt, anstatt wie in einigen anderen für die Forschung wichtigen Nierenerkrankungen vorliegenden glomerulären Schädigung (Basalmembran, Podozyten).

2.2.2. „Hyperoxaluria requires TNF receptors to initiate crystal adhesion and kidney stone disease”

Die Pathophysiologie von Nierensteinen und Kristall-Nephropathien, vor allem im Rahmen von Kalziumoxalat-Ablagerungen, ist Bestandteil langjähriger Forschung (s.o.). Verschiedene Schritte erscheinen hierbei als wichtig, beispielsweise das Anfallen von Kalzium und Oxalat im Tubuluslumen mit konsekutivem Ausfallen von Kristallen bei Überschreiten des Löslichkeitsproduktes. Diverse Promotoren und Inhibitoren des Kristallisationsprozesses wurden bisher untersucht. Als essentieller Schritt eines pathologischen Effektes von Kalziumoxalat-Kristallen wird mittlerweile die Interaktion und Bindung der Kristalle mit dem Tubulusepithel angesehen. Nur so kann eine Aufnahme in die Zelle bzw. Induktion von Signalkaskaden und entzündlichen Prozessen erfolgen. Nach intrazellulärer und interstitieller Prozessierung der Kristallfragmente kommt es zur Inflammation (NLRP3-Inflammasom) und Zelltod-Induktion (u.a. Nekroptose) und in weiteren Schritten zur Schädigung des Nierengewebes. Inflammation und Zelltod werden u.a. über TNF-Rezeptoren und deren Signalkaskaden vermittelt. In humanem Nierengewebe von Patienten mit Kalziumoxalat-Nephropathie zeigte sich eine im Vergleich zu gesunden Kontrollbiopsien eine deutlich gesteigerte Expression von TNFR1/2 in Tubulusepithelien. Um den Einfluss von TNF-Rezeptoren bei Kalziumoxalat-

Nephropathie weiter zu untersuchen induzierten wir das in 2.2.1. beschriebene Mausmodell in Wildtyp-Mäusen und TNFR1-, TNFR2- und TNFR1/2-Knockout Mäusen. Überraschenderweise fanden sich in allen Knockout-Mäusen trotz vergleichbarer Oxalat-Konzentrationen im Urin keinerlei renale Kalziumoxalat-Ablagerungen oder Einschränkung der Nierenfunktion. In anderen Studien konnte eine direkte Bindung von Kristallen mit spezifischen Zellrezeptoren gezeigt werden^{86, 87}. Aufgrund der überraschenden Ergebnisse bestand die initiale Vermutung, dass TNFR als spezifische Bindungsrezeptoren von Kalziumoxalat-Kristallen fungieren. In speziellen Versuchen gelang uns allerdings kein Nachweis einer solchen direkten Kristalle-Rezeptor-Bindung.

Eine andere Erklärung war die mögliche Induktion von speziellen Kristalladhäsionsmolekülen über TNFR-Signalkaskaden. In der Vergangenheit waren hier mehrere dieser Moleküle beschrieben worden. Wir beschränkten uns auf die Messung zweier Proteine: Annexin II und CD44. Sowohl in vitro in isolierten Maus-Tubuluszellen als auch in vivo konnten wir eine deutliche Induktion dieser beiden Proteine im WT im Vergleich zu den TNFR-Knockout-Mäusen feststellen.

Zur weiteren Untermauerung unserer Hypothese behandelten wir die WT-Mäuse mit einem speziellen TNFR-Inhibitor (R-7050). In der Tat zeigten diese Mäuse nach Induktion der Kalziumoxalat-Nephropathie eine verbesserte Nierenfunktion sowie signifikant weniger Expression der beiden Adhäsionsmoleküle. Auch der tubuläre Schaden sowie Inflammation und Fibrosierung waren in den mit R-7050 behandelten Mäusen signifikant geringer ausgeprägt. Im Gegensatz zu den Knockout-Mäusen zeigte sich jedoch kein vollständiger Schutz. Dies könnte in der Pharmakodynamik bzw. der verwendeten Dosis von R-7050 begründet sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TNFR-Signalkaskaden über die Induktion von speziellen Kristalladhäsionsmolekülen in den Tubulusepithelien und konsekutiv der Bindung von Kalziumoxalat-Kristallen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Kalziumoxalat-Nephropathie spielen. Zur genaueren Untersuchung induzierten wir das oben beschriebene Mausmodell in WT-/- und TNFR-Knockout-Mäusen. TNFR-Knockout-Mäuse zeigten keinerlei Kalziumoxalat-Ablagerungen oder Verschlechterung der Nierenfunktion. Eine medikamentöse TNFR-Inhibierung führte zu einer signifikant verbesserten Nierenfunktion und geringeren Induktion von Kristalladhäsionsmolekülen sowie in dessen Folge zu einer geringeren renalen Ablagerung von Kalziumoxalat-Kristallen.

3. Zusammenfassung

Nephro- / bzw. Urolithiasis ist ein häufiges Krankheitsbild mit einer Prävalenz zwischen 5-15% in Europa und den USA. Patienten präsentieren sich primär mit kolikartigen Beschwerden, eine langfristige Verschlechterung der Nierenfunktion aufgrund eines postrenalen Nierenversagens ist eher selten. Ein höheres Risiko für eine chronische Niereninsuffizienz ist in diesen Patientenpopulationen dennoch beschrieben. Ein Großteil der Nierensteine besteht aus Kalziumoxalat (75%). Im Rahmen von Erkrankungen, die zu einem Anfall von Oxalat im Körper führen, kann eine primäre bzw. sekundäre Hyperoxalurie mit konsekutiven Ablagerungen von Kalziumoxalat-Kristallen im renalen Gewebe zu einer Nephrokalzinose führen. Um die Pathophysiologie der Kalziumoxalat-Nephropathie genauer zu verstehen und so neue Therapieansätze zu generieren ist die präklinische Untersuchung im Mausmodell bisher unabdingbar.

Wir erstellten und charakterisierten zunächst ein neues Mausmodell der Kalziumoxalat-Nephropathie in C57BL/6-Mäusen. C57BL/6-Mäuse gelten als geläufigste Mauslinie im Rahmen von präklinischen Studien in der Grundlagenwissenschaft. Mit Hilfe dieses reproduzierbaren Modells lassen sich konstante Level einer chronischen Niereninsuffizienz mit den gängigen CKD-Komplikationen induzieren. Im Speziellen ist mit Hilfe dieses Modells aber auch die weitere Untersuchung der Pathophysiologie der Kalziumoxalat-Nephropathie möglich. In der Vergangenheit wurden hierzu wegweisende neue Erkenntnisse publiziert, u.a. die Rolle der Inflammation und speziell des NLRP3-Inflammasoms sowie die Rolle der Nekroptose, einer speziellen kontrollierten Form des Zelltods, welche durch Kalziumoxalat-Kristalle induziert wird. Auch TNF-Rezeptoren sind maßgeblich an diesen Signalkaskaden beteiligt. In histologischen Analysen von Nierengewebe von Patienten mit Kalziumoxalat-Nephropathie zeigte sich eine deutliche Induktion von TNF-Rezeptoren im Tubulusepithel. Um die Rolle von TNF-Rezeptoren bei Kalziumoxalat-Nephropathie weiter zu untersuchen, induzierten wir das oben beschriebene Mausmodell in WT- / und TNFR-Knockout-Mäusen. Während die WT-Mäuse den typischen Phänotyp zeigten, zeigten TNFR-Knockout-Mäuse trotz vergleichbarer Hyperoxalurie keinerlei Kalziumoxalat-Ablagerungen. In weiteren Experimenten fanden wir eine mögliche Erklärung:

Eine direkte Kalziumoxalat-TNFR-Bindung konnte nicht nachgewiesen werden, dafür aber die Induktion spezifischer Kristalladhäsionsmoleküle (Annexin II und CD44) im Nierentubulusepithel über TNFR-Signalkaskaden. Auch die medikamentöse Behandlung von Mäusen mit einem speziellen TNFR-Inhibitor (R-7050) zeigte eine signifikante Verbesserung der Nierenfunktion und weniger Kristallablagerungen in den behandelten Mäusen.

Wir postulieren hiermit, dass TNFR eine essentielle Rolle bei der Entstehung der Kalziumoxalat-Nephropathie durch Induktion von spezifischen Kristalladhäsionsmolekülen im Nierentubulusepithel spielen. Eine medikamentöse Inhibierung dieses Signalweges könnte somit einen neuen Therapieansatz bei Nephro-/Urolithiasis und speziell bei Kalziumoxalat-Nephropathien darstellen.

4. Abstract

Nephro-/Urolithiasis is quite common in the European and American population with a prevalence in between 5-15%. Patients suffering from this disease mainly present with renal colic, a decline of renal function due to postrenal AKI occurs less frequently. Nevertheless, it is described a higher prevalence of CKD in this population. The vast majority of renal stones consists of calcium oxalate (about 75%).

Furthermore, hyperoxaluria is described in other diseases, which can be summarized in primary and secondary hyperoxalurias. Both entities lead to an accumulation of oxalate and thus to supersaturation and crystallization within the renal tubules, a so called nephrocalcinosis. To understand the underlying pathophysiology of calcium oxalate-Nephropathy and create new therapeutic strategies there is a need for a suitable mouse model for preclinical studies.

We therefore first established and characterized a new mouse model for calcium oxalate nephropathy in C57BL/6 mice. This mouse strain is mostly used for generating preclinical basic science studies. With this new mouse model, we are able to induce stable conditions of CKD and its established complications. In addition, we can induce this model to investigate the pathophysiology of calcium oxalate nephropathy. Seminal studies report the role of inflammation and especially the NLRP3 inflammasome in calcium oxalate nephropathy as well as the undergoing necroptosis, a form of controlled cell death, induced by calcium oxalate crystals. TNFR signaling pathways are significantly involved in these processes. In human kidney biopsy samples from patients suffering from calcium oxalate nephropathy, we can state an induction of TNFR in the tubule epithelium.

To further investigate the role of TNFR in calcium oxalate nephropathy we induced the above described mouse model in WT and TNFR ko mice. While WT mice showed the classic phenotype of calcium oxalate nephropathy, the TNFR ko mice lacked any signs of the disease especially any calcium oxalate crystal deposits. In further experiments we found a possible reason: a direct crystal-receptor interaction could not be detected, however there was an induction of specific crystal binding molecules (Annexin II and CD44) via TNFR signaling pathways. Moreover, we could see a significant improvement of renal function and less calcium oxalate crystal deposits in mice treated with a special TNFR inhibitor (R-7050).

Thus, we postulate the essential role of TNFR in the development of calcium oxalate nephropathy via induction of special crystal binding molecules in the renal tubular epithelium. An inhibition of this signaling pathway could be a future target of treatment in this disease.

5. Publikation I

Mulay SR*, **Eberhard JN***, Pfann V*, Marschner JA, Darisipudi MN, Daniel C, Romoli S, Desai J, Grigorescu M, Kumar SV, Rathkolb B, Wolf E, Hrabě de Angelis M, Bäuerle T, Dietel B, Wagner CA, Amann K, Eckardt KU, Aronson PS, Anders HJ*, Knauf F*. *Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice*. Am J Physiol Renal Physiol. 2016 Apr 15;310(8): F785-F795

**contributed equally to this work*

Fundstelle/DOI: 10.1152/ajprenal.00488.2015

6. Publikation II

Mulay SR*, **Eberhard JN***, Desai J, Marschner JA, Kumar SV, Weidenbusch M, Grigorescu M, Lech M, Eltrich N, Müller L, Hans W, Hrabě de Angelis M, Vielhauer V, Hoppe B, Asplin J, Burzlaff N, Herrmann M, Evan A, Anders HJ. *Hyperoxaluria Requires TNF Receptors to Initiate Crystal Adhesion and Kidney Stone Disease*. J Am Soc Nephrol. 2017 Mar;28(3):761-768

**contributed equally to this work*

Fundstelle/DOI: 10.1681/ASN.2016040486

7. Literaturverzeichnis

1. Oxalsäure. In: Römpf Online. Georg Thieme Verlag <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-15-01135> abgerufen am 28.06.2021
2. Brzica H, Breljak D, Burckhardt BC, Burckhardt G, Sabolić I. Oxalate: from the environment to kidney stones. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2013 Dec;64(4):609-30.
3. Singh PP, Kothari LK, Sharma DC, Saxena SN. Nutritional value of foods in relation to their oxalic acid content. *Am J Clin Nutr.* 1972 Nov;25(11):1147-52.
4. Robijn S, Hoppe B, Vervaet BA, D'Haese PC, Verhulst A. Hyperoxaluria: a gut-kidney axis? *Kidney Int.* 2011 Dec;80(11):1146-58.
5. Holmes RP, Goodman HO, Assimos DG. Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. *Kidney Int.* 2001 Jan;59(1):270-6.
6. Holmes RP, Assimos DG. Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. *J Urol.* 1998 Nov;160(5):1617-24.
7. Gambardella RL, Richardson KE. The pathways of oxalate formation from phenylalanine, tyrosine, tryptophan and ascorbic acid in the rat. *Biochim Biophys Acta.* 1977 Aug 25;499(1):156-68.
8. Sindić A, Chang MH, Mount DB, Romero MF. Renal physiology of SLC26 anion exchangers. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007 Sep;16(5):484-90.
9. Mount DB, Romero MF. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch.* 2004 Feb;447(5):710-21.
10. Weinman EJ, Frankfurt SJ, Ince A, Sansom S. Renal tubular transport of organic acids. Studies with oxalate and para-aminohippurate in the rat. *J Clin Invest.* 1978 Mar;61(3):801-6.
11. Ben-Shalom E, Cytter-Kuint R, Rinat C, Becker-Cohen R, Tzvi-Behr S, Goichberg J, Peles V, Frishberg Y. Long-term complications of systemic oxalosis in children-a retrospective single-center cohort study. *Pediatr Nephrol.* 2021 Mar 2.
12. Latus J, Kimmel M, Alscher MD, Braun N. Ethylene glycol poisoning: a rare but life-threatening cause of metabolic acidosis-a single-centre experience. *Clin Kidney J.* 2012 Apr;5(2):120-3.
13. Asplin JR. Hyperoxaluric calcium nephrolithiasis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002 Dec;31(4):927-49.
14. Milliner DS. The primary hyperoxalurias: an algorithm for diagnosis. *Am J Nephrol.* 2005 Mar-Apr;25(2):154-60.
15. Bhasin B, Ürekli HM, Atta MG. Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma. *World J Nephrol.* 2015 May 6;4(2):235-44.
16. Cochat P, Rumsby G. Primary hyperoxaluria. *N Engl J Med.* 2013 Aug 15;369(7):649-58. doi: 10.1056/NEJMra1301564. Erratum in: *N Engl J Med.* 2013 Nov 28;369(22):2168.
17. Purdue PE, Takada Y, Danpure CJ. Identification of mutations associated with peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of alanine/glyoxylate aminotransferase in primary hyperoxaluria type 1. *J Cell Biol.* 1990 Dec;111(6 Pt 1):2341-51.
18. Cochat P, Deloraine A, Rotily M, Olive F, Liponski I, Deries N. Epidemiology of primary hyperoxaluria type 1. *Société de Néphrologie and the Société de Néphrologie Pédiatrique. Nephrol Dial Transplant.* 1995;10 Suppl 8:3-7.

19. Cochat P, Hulton SA, Acquaviva C, Danpure CJ, Daudon M, De Marchi M, Fargue S, Groothoff J, Harambat J, Hoppe B, Jamieson NV, Kemper MJ, Mandrile G, Marangella M, Picca S, Rumsby G, Salido E, Straub M, van Woerden CS; OxalEurope. Primary hyperoxaluria Type 1: indications for screening and guidance for diagnosis and treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 May;27(5):1729-36.
20. Milliner DS, Wilson DM, Smith LH. Phenotypic expression of primary hyperoxaluria: comparative features of types I and II. *Kidney Int*. 2001 Jan;59(1):31-6.
21. Cregeen DP, Williams EL, Hulton S, Rumsby G. Molecular analysis of the glyoxylate reductase (GRHPR) gene and description of mutations underlying primary hyperoxaluria type 2. *Hum Mutat*. 2003 Dec;22(6):497.
22. Belostotsky R, Seboun E, Idelson GH, Milliner DS, Becker-Cohen R, Rinat C, Monico CG, Feinstein S, Ben-Shalom E, Magen D, Weissman I, Charon C, Frishberg Y. Mutations in DHAPSL are responsible for primary hyperoxaluria type III. *Am J Hum Genet*. 2010 Sep 10;87(3):392-9.
23. Williams EL, Bockenhauer D, van't Hoff WG, Johri N, Laing C, Sinha MD, Unwin R, Viljoen A, Rumsby G. The enzyme 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase is deficient in primary hyperoxaluria type 3. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Aug;27(8):3191-5.
24. Holmes RP, Kennedy M. Estimation of the oxalate content of foods and daily oxalate intake. *Kidney Int*. 2000 Apr;57(4):1662-7.
25. Nasr SH, Kashtanova Y, Levchuk V, Markowitz GS. Secondary oxalosis due to excess vitamin C intake. *Kidney Int*. 2006 Nov;70(10):1672.
26. Getting JE, Gregoire JR, Phul A, Kasten MJ. Oxalate nephropathy due to 'juicing': case report and review. *Am J Med*. 2013 Sep;126(9):768-72.
27. Stapenhorst L, Hesse A, Hoppe B. Hyperoxaluria after ethylene glycol poisoning. *Pediatr Nephrol*. 2008 Dec;23(12):2277-9.
28. Mittal RD, Kumar R. Gut-inhabiting bacterium *Oxalobacter formigenes*: role in calcium oxalate urolithiasis. *J Endourol*. 2004 Jun;18(5):418-24.
29. Kaufman DW, Kelly JP, Curhan GC, Anderson TE, Dretler SP, Preminger GM, Cave DR. *Oxalobacter formigenes* may reduce the risk of calcium oxalate kidney stones. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Jun;19(6):1197-203.
30. Tasian GE, Jemielita T, Goldfarb DS, Copelovitch L, Gerber JS, Wu Q, Denburg MR. Oral Antibiotic Exposure and Kidney Stone Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Jun;29(6):1731-1740.
31. Worcester EM. Stones from bowel disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2002 Dec;31(4):979-99.
32. Lieske JC, Kumar R, Collazo-Clavell ML. Nephrolithiasis after bariatric surgery for obesity. *Semin Nephrol*. 2008 Mar;28(2):163-73.
33. Ferraz RR, Tiselius HG, Heilberg IP. Fat malabsorption induced by gastrointestinal lipase inhibitor leads to an increase in urinary oxalate excretion. *Kidney Int*. 2004 Aug;66(2):676-82.
34. von Unruh GE, Voss S, Sauerbruch T, Hesse A. Dependence of oxalate absorption on the daily calcium intake. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jun;15(6):1567-73.
35. Jiang Z, Asplin JR, Evan AP, Rajendran VM, Velazquez H, Nottoli TP, Binder HJ, Aronson PS. Calcium oxalate urolithiasis in mice lacking anion transporter *Slc26a6*. *Nat Genet*. 2006 Apr;38(4):474-8.

36. Asplin JR. Hyperoxaluric calcium nephrolithiasis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002 Dec;31(4):927-49.
37. Osswald H, Hautmann R. Renal elimination kinetics and plasma half-life of oxalate in man. *Urol Int.* 1979;34(6):440-50.
38. Williams HE, Johnson GA, Smith LH Jr. The renal clearance of oxalate in normal subjects and patients with primary hyperoxaluria. *Clin Sci.* 1971 Sep;41(3):213-8.
39. Rule AD, Krambeck AE, Lieske JC. Chronic kidney disease in kidney stone formers. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011 Aug;6(8):2069-75.
40. Harambat J, van Stralen KJ, Espinosa L, Groothoff JW, Hulton SA, Cerkauskiene R, Schaefer F, Verrina E, Jager KJ, Cochat P; European Society for Pediatric Nephrology/European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (ESPN/ERA-EDTA) Registry. Characteristics and outcomes of children with primary oxalosis requiring renal replacement therapy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012 Mar;7(3):458-65.
41. Bobrowski AE, Langman CB. Hyperoxaluria and systemic oxalosis: current therapy and future directions. *Expert Opin Pharmacother.* 2006 Oct;7(14):1887-96.
42. Marangella M, Petrarulo M, Vitale C, Cosseddu D, Linari F. Plasma and urine glycolate assays for differentiating the hyperoxaluria syndromes. *J Urol.* 1992 Sep;148(3 Pt 2):986-9.
43. Daudon M, Jungers P, Bazin D. Peculiar morphology of stones in primary hyperoxaluria. *N Engl J Med.* 2008 Jul 3;359(1):100-2.
44. Borghi L, Meschi T, Amato F, Briganti A, Novarini A, Giannini A. Urinary volume, water and recurrences in idiopathic calcium nephrolithiasis: a 5-year randomized prospective study. *J Urol.* 1996 Mar;155(3):839-43.
45. Leumann E, Hoppe B, Neuhaus T. Management of primary hyperoxaluria: efficacy of oral citrate administration. *Pediatr Nephrol.* 1993 Apr;7(2):207-11.
46. Marangella M, Bagnis C, Bruno M, Vitale C, Petrarulo M, Ramello A. Crystallization inhibitors in the pathophysiology and treatment of nephrolithiasis. *Urol Int.* 2004;72 Suppl 1:6-10.
47. Monico CG, Rossetti S, Olson JB, Milliner DS. Pyridoxine effect in type I primary hyperoxaluria is associated with the most common mutant allele. *Kidney Int.* 2005 May;67(5):1704-9.
48. Hoppe B, Groothoff JW, Hulton SA, Cochat P, Niaudet P, Kemper MJ, Deschênes G, Unwin R, Milliner D. Efficacy and safety of Oxalobacter formigenes to reduce urinary oxalate in primary hyperoxaluria. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Nov;26(11):3609-15.
49. Garrelfs SF, Frishberg Y, Hulton SA, Koren MJ, O'Riordan WD, Cochat P, Deschênes G, Shasha-Lavsky H, Saland JM, Van't Hoff WG, Fuster DG, Magen D, Moochhala SH, Schalk G, Simkova E, Groothoff JW, Sas DJ, Meliambro KA, Lu J, Sweetser MT, Garg PP, Vaishnav AK, Gansner JM, McGregor TL, Lieske JC; ILLUMINATE-A Collaborators. Lumasiran, an RNAi Therapeutic for Primary Hyperoxaluria Type 1. *N Engl J Med.* 2021 Apr 1;384(13):1216-1226.
50. Hoppe B, Graf D, Offner G, Latta K, Byrd DJ, Michalk D, Brodehl J. Oxalate elimination via hemodialysis or peritoneal dialysis in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol.* 1996 Aug;10(4):488-92.
51. Saborio P, Scheinman JI. Transplantation for primary hyperoxaluria in the United States. *Kidney Int.* 1999 Sep;56(3):1094-100.

52. Brinkert F, Ganschow R, Helmke K, Harps E, Fischer L, Nashan B, Hoppe B, Kulke S, Müller-Wiefel DE, Kemper MJ. Transplantation procedures in children with primary hyperoxaluria type 1: outcome and longitudinal growth. *Transplantation*. 2009 May 15;87(9):1415-21.
53. Mulay SR, Anders HJ. Crystallopathies. *N Engl J Med*. 2016 Jun 23;374(25):2465-76.
54. Worcester EM, Coe FL. Clinical practice. Calcium kidney stones. *N Engl J Med*. 2010 Sep 2;363(10):954-63.
55. Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2598-608.
56. Tang X, Lieske JC. Acute and chronic kidney injury in nephrolithiasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014 Jul;23(4):385-90.
57. Evan AP, Lingeman JE, Coe FL, Parks JH, Bledsoe SB, Shao Y, Sommer AJ, Paterson RF, Kuo RL, Grynopas M. Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *J Clin Invest*. 2003 Mar;111(5):607-16.
58. Mulay SR, Evan A, Anders HJ. Molecular mechanisms of crystal-related kidney inflammation and injury. Implications for cholesterol embolism, crystalline nephropathies and kidney stone disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Mar;29(3):507-14.
59. Mulay SR, Kulkarni OP, Rupanagudi KV, Migliorini A, Darisipudi MN, Vilaysane A, Muruve D, Shi Y, Munro F, Liapis H, Anders HJ. Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1 β secretion. *J Clin Invest*. 2013 Jan;123(1):236-46.
60. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 2012 Jan 18;481(7381):278-86.
61. Knauf F, Asplin JR, Granja I, Schmidt IM, Moeckel GW, David RJ, Flavell RA, Aronson PS. NALP3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy. *Kidney Int*. 2013 Nov;84(5):895-901.
62. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med*. 2014 Jan 30;370(5):455-65.
63. Mulay SR, Desai J, Kumar SV et al. Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL-mediated necroptosis. *Nat Commun*. 2016 Jan 28;7:10274.
64. Khan SR, Pearle MS, Robertson WG, Gambaro G, Canales BK, Doizi S, Traxer O, Tiselius HG. Kidney stones. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Feb 25;2:16008.
65. Marshall RW, Robertson WG. Nomograms for the estimation of the saturation of urine with Calcium oxalate, Calcium phosphate, magnesium ammonium phosphate, uric acid, sodium acid urate, ammonium acid urate and cystine. *Clin Chim Acta*. 1976 Oct 15;72(2):253-60.
66. Werness PG, Brown CM, Smith LH, Finlayson B. EQUIL2: a BASIC computer program for the calculation of urinary saturation. *J Urol*. 1985 Dec;134(6):1242-4.
67. Sakhaee K, Adams-Huet B, Moe OW, Pak CY. Pathophysiologic basis for normouricosuric uric acid nephrolithiasis. *Kidney Int*. 2002 Sep;62(3):971-9.
68. Aggarwal KP, Narula S, Kakkar M, Tandon C. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. *Biomed Res Int*. 2013;2013:292953.

69. De Yoreo JJ, Qiu SR, Hoyer JR. Molecular modulation of Calcium oxalate crystallization. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Dec;291(6):F1123-31.
70. Kletzmayer A, Mulay SR, Motrapu M, Luo Z, Anders HJ, Ivarsson ME, Leroux JC. Inhibitors of Calcium Oxalate Crystallization for the Treatment of Oxalate Nephropathies. *Adv Sci (Weinh)*. 2020 Feb 27;7(8):1903337.
71. Hess B, Nakagawa Y, Coe FL. Inhibition of Calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *Am J Physiol*. 1989 Jul;257(1 Pt 2):F99-106.
72. Khan SR. Calcium oxalate crystal interaction with renal tubular epithelium, mechanism of crystal adhesion and its impact on stone development. *Urol Res*. 1995;23(2):71-9.
73. Khan SR. Role of renal epithelial cells in the initiation of calcium oxalate stones. *Nephron Exp Nephrol*. 2004;98(2):e55-60.
74. Verkoelen CF, Verhulst A. Proposed mechanisms in renal tubular crystal retention. *Kidney Int*. 2007 Jul;72(1):13-8.
75. Kanlaya R, Sintiprungrat K, Chaiyarit S, Thongboonkerd V. Macropinocytosis is the major mechanism for endocytosis of calcium oxalate crystals into renal tubular cells. *Cell Biochem Biophys*. 2013;67(3):1171-9.
76. Schepers MS, van Ballegooijen ES, Bangma CH, Verkoelen CF. Crystals cause acute necrotic cell death in renal proximal tubule cells, but not in collecting tubule cells. *Kidney Int*. 2005 Oct;68(4):1543-53.
77. Asselman M, Verhulst A, De Broe ME, Verkoelen CF. Calcium oxalate crystal adherence to hyaluronan-, osteopontin-, and CD44-expressing injured/regenerating tubular epithelial cells in rat kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Dec;14(12):3155-66.
78. Sheng X, Jung T, Wesson JA, Ward MD. Adhesion at calcium oxalate crystal surfaces and the effect of urinary constituents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 11;102(2):267-72.
79. Lieske JC, Norris R, Swift H, Toback FG. Adhesion, internalization and metabolism of calcium oxalate monohydrate crystals by renal epithelial cells. *Kidney Int*. 1997 Nov;52(5):1291-301.
80. Hammes MS, Lieske JC, Pawar S, Spargo BH, Toback FG. Calcium oxalate monohydrate crystals stimulate gene expression in renal epithelial cells. *Kidney Int*. 1995 Aug;48(2):501-9. doi: 10.1038/ki.1995.320. PMID: 7564119.
81. Randall A. The origin and growth of renal calculi. *Ann Surg*. 1937 Jun;105(6):1009-27.
82. Evan A, Lingeman J, Coe FL, Worcester E. Randall's plaque: pathogenesis and role in calcium oxalate nephrolithiasis. *Kidney Int*. 2006 Apr;69(8):1313-8.
83. Chung HJ. The role of Randall plaques on kidney stone formation. *Transl Androl Urol*. 2014 Sep;3(3):251-4.
84. Becker GJ, Hewitson TD. Animal models of chronic kidney disease: useful but not perfect. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Oct;28(10):2432-8.
85. Huang L, Scarpellini A, Funck M, Verderio EA, Johnson TS. Development of a chronic kidney disease model in C57BL/6 mice with relevance to human pathology. *Nephron Extra*. 2013 Jan 11;3(1):12-29.
86. Kiyotake R, Oh-Hora M, Ishikawa E, Miyamoto T, Ishibashi T, Yamasaki S. Human Mincle Binds to Cholesterol Crystals and Triggers Innate Immune Responses. *J Biol Chem*. 2015 Oct 16;290(42):25322-32.
87. Neumann K, Castiñeiras-Vilariño M, Höckendorf U, Hanneschläger N, et al. Clec12a is an inhibitory receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death. *Immunity*. 2014 Mar 20;40(3):389-99.

Danksagung

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, insbesondere an meine Frau Barbara, für die fortwährende Unterstützung und das immer wieder notwendige kritische Hinterfragen meines Tuns und Handelns.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Personen und Kollegen, die an den oben beschriebenen Publikationen mitgewirkt haben, insbesondere den Kollegen im Labor für die lehrreiche und freundschaftliche Zeit.